



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPG/BIOTEC



Estudo botânico, fitoquímico e avaliação *in silico* e
in vitro de atividades biológicas de folhas de
Humulus lupulus L. (Cannabaceae) cultivadas no
Brasil

Discente: Regislainy Gomes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa

Ouro Preto, 11 de dezembro de 2020.

REGISLAINY GOMES DA SILVA

Estudo botânico, fitoquímico e avaliação *in silico* e
in vitro de atividades biológicas de folhas de
Humulus lupulus L. (Cannabaceae) cultivadas no
Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial ao título de Doutora em Biotecnologia.

Ouro Preto, 11 de dezembro de 2020.

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586e Silva, Regislainy Gomes da .
Estudo botânico, fitoquímico e avaliação in silico e in vitro de atividades biológicas de folhas de Humulus lupulus L. (Cannabaceae) cultivadas no Brasil. [manuscrito] / Regislainy Gomes da Silva. - 2020. 192 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.
Coorientador: Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Antioxidantes. 2. Flavonoides. 3. Humulus lupulus. 4. Simulação (Computadores). I. Sousa, Hildeberto Caldas de. II. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:616

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Regislainy Gomes da Silva

Estudo botânico, fitoquímico e avaliação *in silico* e *in vitro* de atividades biológicas de folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) cultivadas no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Aprovada em 11 de dezembro de 2020

Membros da banca

Doutor - Gustavo Henrique Bianco de Souza - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Fernando Batista da Costa - (Universidade de São Paulo)
Doutor - João Paulo Viana Leite - (Universidade Federal de Viçosa)
Doutora - Maria Elvira Poletti Martucci - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Thiago Belarmino de Souza - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Gustavo Henrique Bianco de Souza, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 07/01/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/01/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0111280** e o código CRC **2484C095**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.009369/2020-27

SEI nº 0111280

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: - www.ufop.br

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe (*in memoriam*) e ao meu pai,
essa tese é resultado de uma longa trajetória de amor, desafios e fé!

“Deus está na surpresa e no inesperado.
Quando menos imaginamos, sua
presença se irrompe nos lugares
cotidianos mais inusitados.”

(Padre Fábio de Melo *in* *É Sagrado Viver*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora da Glória e ao Divino Espírito Santo, por tanto me inspirarem na fé e continuarem segurando a minha mão, e me conduzindo aos meus sonhos.

A minha mãe, Geni Gomes Pinto da Silva, que lá do céu, junto com Nossa Senhora, me abençoa e conduz os meus passos. Ao meu pai, José Raimundo da Silva, por ser minha âncora, fé, luz e inspiração. Todo amor do mundo!

Aos meus irmãos: Reginaldo, pelo carinho e atenção, e por me mostrar que sonhos se realizam; Regiany, por me permitir perceber o quanto sou forte e capaz, seguindo os caminhos que Deus desejou pra mim; Regisley, por acreditar em mim e me mostrar que posso sempre ir mais longe; Regisvander, por sempre me fazer perceber as maravilhas escondidas nos mínimos detalhes; Regisleny, pelo carinho, apoio e conversas. Ao meu sobrinho Yuri por todo amor e companheirismo e aos meus sobrinhas Larissa, Lílian, Leonardo, Víctor, Matheus, Bruna, Alícia, Luísa, Breno e Luara, por todo apoio e amor!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, pelos ensinamentos, apoio e pela presença. Muito obrigada por não ter desistido e por ser tão humano e acolhedor.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa, por me permitir dar os primeiros passos no caminho acadêmico. Sou muito grata por todos esses 11 anos de pesquisa, amizade e aconselhamentos. Por tornar tudo mais leve e por nunca ter desistido de mim.

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão, por tantos ensinamentos e por todo apoio, sempre pronto e disponível a ajudar e compartilhar seu conhecimento e ao Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios, pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar, em especial à Adriana Cota, pela parceria nas pesquisas.

À Profa. Dra. Glenda Nicioli Silva, pelo apoio na realização dos experimentos. Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas, pela parceria, em especial à Tamires Cunha, pelo apoio acadêmico e pessoal, pela amizade e pelos sorrisos em todos os dias.

Ao Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pelo enorme apoio nas pesquisas, por acreditar em mim e em nossos resultados, e pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, pelas discussões e sugestões, que tanto agregaram ao estudo.

À Profa Dra. Alaíde Braga de Oliveira do Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas análises.

Ao Prof. Dr. Júlio Lopes e à Profa. Dra. Vera Lúcia pela parceria nas análises *in silico*.

Ao Prof. Dr. Thiago Rodrigues, Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC pela parceria nos experimentos de citotoxicidade.

Ao produtor de lúpulo Klaus Dietrich Guth, pelo fornecimento do material.

Aos amigos do Herbário Prof. José Badini, por estarem sempre dispostos a me receber com um sorriso acolhedor! Em especial à Profa. Dra. Maria Cristina por todo carinho, à Profa. Dra. Lívia Echternacht pelos ensinamentos, às técnicas Dra. Viviane Scalon e Dra. Débora Aragão por todo o apoio.

Aos amigos do Laboratório de Fitotecnologia, pelo apoio, convivência e por me ensinarem tanto nessa caminhada, em especial à Karen e Simone, pelas ótimas discussões acadêmicas, pela amizade e pelos cafés!

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela parceria, amizade e aprendizado. Em especial à Bruna Rossi, pelo apoio, pelos cafés e pela amizade ao longo de toda essa trajetória.

Aos meus padrinhos Sérgio e Maria Aparecida pelas orações, carinho, incentivo e votos de sucesso.

Aos alunos de iniciação científica Mariana Anderata, Élcio Ribeiro, Vanessa dos Santos, Giulia Bócoli e Daniela Couto, por terem compartilhado a caminhada comigo.

À CAPES e à UFOP, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Escola de Farmácia e à Universidade Federal de Ouro Preto, aos professores, técnicos, amigos e funcionários que contribuíram na realização desse estudo.

RESUMO

A espécie *Humulus lupulus* L. (lúpulo) possui grande importância na indústria cervejeira, sendo suas flores femininas utilizadas para conferir o amargor e aroma característicos da bebida. Suas folhas são um subproduto agrícola, de potencial relevante. Devido à sua histórica utilização medicinal, é válido investigar outras possíveis aplicações biológicas. Nesse contexto, foram realizados estudos botânicos, fitoquímicos, predição de atividades biológicas e citotoxicidade de suas folhas. A coleta foi realizada em Baependi-MG e a exsiccata depositada (OUPR 29768). Folhas adultas foram fixadas em FAA₇₀ e armazenadas em etanol 70%, para os estudos botânicos. Outra parte do material foi seca, pulverizada e extraída em etanol, extrato etanólico bruto (EEB), que foi submetido a fracionamentos, obtendo-se frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM). A identificação das substâncias se deu por técnicas hifenadas. Foi realizada também a quantificação de fenólicos e flavonoides, bem como determinação da atividade sequestrante de radical DPPH. Os estudos *in silico* foram realizados através dos softwares *Pass on line* e *Active-IT*. Ao corte transversal, as folhas apresentaram mesofilo heterogêneo, com idioblastos cristalíferos contendo drusas; estômatos anomocíticos, somente na face abaxial, tricomas tectores em ambas as faces e glandulares apenas na face abaxial, sendo providos de cistólitos na epiderme adaxial. A quantificação de fenólicos e flavonoides no EEB foi 75,40 ± 8,04 mg EAG/g e 0,96 ± 0,12 mg ER/g, respectivamente; e na fração HM, os teores foram 89 ± 6,15 mg EAG/g e 7,13 ± 1,07 mg ER/g. Na avaliação do potencial antioxidante, obteve-se CE₅₀ de 105,60 µg/mL, 675,71 µg/mL e 126,72 µg/mL para o EEB, FH e HM. Através das análises por CLUE-DAD-EM/EM, foram identificados os flavonoides astragalina, nicotiflorina, caempferol-7-O-rutinosídeo, robinina, hiperina, rutina, quercetina-7-O-rutinosídeo e mangaslina. EEB (800 µg/mL) e HM (1200 µg/mL) reduziram a viabilidade celular da linhagem T24 e estimularam o crescimento de MRC5 a 25 µg/mL, evidenciando a citotoxicidade seletiva. Após 24h de tratamento, não foi observada parada no ciclo celular em T24. A predição da atividade biológica dos flavonoides apresentou potenciais atividades antitumoral, citotóxica, entre outras. EEB reduziu a viabilidade das linhagens SK-mel-147 e HaCat (500 µg/mL), FH apresentou maior citotoxicidade em células tumorais, e, HM em células não tumorais.

Palavras-chave: citotoxicidade, flavonoides, *Humulus lupulus*, *in silico*.

ABSTRACT

Humulus lupulus L. (lúpulo), has great importance in the brewery industry and it's the female flowers are responsible for the bitter flavor of beer. The leaves are a byproduct, with a relevant potential. Then, due to the historical importance, it's valid to investigate its biological activities. In this project, were realized botanical, phytochemical, biological activity prediction, and cytotoxicity studies in *H. lupulus* leaves. The vegetal material was collected in Baependi-MG and the exsiccate deposited (OUPR 29768). Fully expanded leaves were fixed at FAA₇₀, and preserved on ethanol 70%, aiming botanical studies. Another part of the collected material was dried and pulverized and then subjected to extractions using ethanol, crude ethanolic extract (EB), that was fractionated in hexanic (SH) and hydromethanolic (SEM) fractions. The identification of metabolite classes was made by hyphenated techniques. The quantification of phenolic compounds and flavonoids were made, and the determination of antioxidant capacity, by the DPPH assay. The *in silico* predictions were realized by the software Pass online and Active-IT. The leaf lamina is dorsiventral, with idioblast containing druse; stomata are anomocytic, on abaxial epidermis tectors trichomes on both sides and glandular trichomes on abaxial face and cistolites on adaxial face. The phenolic compounds and flavonoids contents on EB was 75.40 ± 8.04 mgEGA and 0.96 ± 0.12 mgEqR, respectively and on SEM was 89 ± 6.15 mg EqGA and 7.13 ± 1.07 mg EqR. On DPPH assay, CE₅₀ were 105.60 µg/mL, 675.71 µg/mL and 126.72 µg/mL to EB, SH and SEM respectively. The flavonoids identified by UPLC-DAD-MS/MS were astragalin, nicotiflorin, kaempferol-7-O-rutinoside, robinin, hyperin, rutin, quercetin-7-O-rutinoside and manghaslin. EB (800 µg/mL) and SEM (1200 µg/mL) reduce T24 cell viability and stimulate MRC5 growth at 25 µg/mL, evidencing a selective cytotoxicity. After 24h, was not observed cycle arrest of T24 cells. The bioactivity prediction indicated potential activity as antitumoral, cytotoxic, and others. EEB reduces SK-mel-147 and HaCat Cell viability (500 µg/mL), FH was more citotoxic to tumoral cells and SEM, on non-tumoral cells.

Key-words: cytotoxicity, flavonoids, *Humulus lupulus*, *in silico*.

SUMÁRIO:

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. EMBASAMENTO TEÓRICO.....	5
2.1. O metabolismo vegetal.....	5
2.1.1. Flavonoides.....	5
2.2. A família Cannabaceae Martinov.....	8
2.3. A espécie <i>Humulus lupulus</i> L.....	11
2.3.1. Botânica.....	11
2.3.2. História.....	14
2.3.3. O lúpulo e a produção de cerveja.....	15
2.3.4. Fitoquímica.....	17
2.3.5. Aplicações farmacológicas.....	18
2.3.6. Potencial farmacológico de subprodutos agrícolas.....	19
2.4. Estudos <i>in silico</i> de potenciais atividades biológicas.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Obtenção do material vegetal.....	25
4.2. Estudo Botânico.....	25
4.2.1. Cortes histológicos.....	25
4.2.2. Dissociação de epidermes.....	25
4.2.3. Diafanização.....	26
4.2.4. Coloração histológica.....	26
4.2.5. Fotomicrografias.....	26
4.3. Estudo Fitoquímico.....	27
4.3.1. Obtenção do extrato etanólico bruto.....	27
4.3.2. Fracionamento do extrato etanólico bruto.....	27

4.3.3. Identificação dos metabólitos majoritários.....	27
4.4. Determinação do teor de fenólicos totais.....	28
4.5. Determinação do teor de flavonoides totais.....	29
4.6. Estudo <i>in silico</i> para Predição de Potenciais Atividades Biológicas.....	29
4.6.1. Software <i>PASS on line</i>	30
4.6.2. Software Active-IT.....	30
4.6.2.1. Validação da metodologia com bioensaios conhecidos.....	31
4.6.2.2. Análise do ponto de corte (<i>cutoff</i>) nos <i>scores SVM</i>	32
4.7. Capacidade Sequestrante de Radical DPPH.....	34
4.8. Avaliação da Citotoxicidade.....	35
4.8.1. Linhagens celulares.....	35
4.8.2. Preparo das amostras.....	36
4.8.3. Citotoxicidade e proliferação celular.....	36
4.8.4. Análise de ciclo celular.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. Estudo Botânico.....	40
5.2. Estudo Fitoquímico.....	46
5.2.1. Obtenção do extrato etanólico bruto e frações e refracionamento.....	46
5.2.2. Identificação dos flavonoides majoritários.....	46
5.2.3. Determinação do teor de fenólicos totais.....	55
5.2.4. Determinação do teor de flavonoides totais.....	57
5.3. Estudo <i>in silico</i> para Predição de Potenciais Atividades Biológicas.....	59
5.3.1. Software <i>Pass on line</i>	59
5.3.2. Software Active-IT.....	60
5.4. Avaliação da Capacidade Sequestrante de Radical DPPH.....	71
5.5. Teste de Citotoxicidade.....	73
5.6. Análise de Ciclo Celular.....	77
6. CONCLUSÃO.....	80
7. REFERÊNCIAS.....	82
8. ANEXOS.....	97
8.1. Anexo I – Cálculos utilizados no <i>software Active-IT</i>	97
8.2. Anexo II – Tabelas A1 e A2.....	101
8.2. Anexo III – Artigo publicado.....	123

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1:	Biossíntese de flavonoides.....	7
Figura 2:	Espécies economicamente importantes da família Cannabaceae.....	9
Figura 3:	Inflorescências de <i>Humulus lupulus</i> L.....	12
Figura 4:	Etapas envolvidas na produção da cerveja.....	16
Figura 5:	Reação de isomerização do xantohumulol em isoxantohumulol.....	16
Figura 6:	Estruturas químicas dos α -ácidos e β -ácidos presentes em <i>H. lupulus</i> L.....	18
Figura 7:	Fluxograma da metodologia do estudo botânico de folhas de <i>H. lupulus</i> L...	26
Figura 8:	Fluxograma da metodologia do estudo fitoquímico de extrato etanólico bruto e frações de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	28
Figura 9:	Variações de Pa, Pi e Pa-Pi em relação ao score SVM apurado utilizado na predição da atividade dos flavonoides 1-8 identificados em folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	33
Figura 10:	Variações de Pa, Pi e Pa-Pi em relação ao score Naive Bayes apurado utilizado na predição da atividade dos flavonoides 1-8 identificados em folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	34
Figura 11:	Foto de indivíduo feminino de <i>H. lupulus</i> L.....	40
Figura 12:	Fotomicrografia da folha diafanizada de <i>H. lupulus</i> L.....	41
Figura 13:	Fotomicrografias de cortes transversais de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	42
Figura 14:	Fotomicrografia de corte transversal da nervura central da folha de <i>H. lupulus</i> L.....	43
Figura 15:	Fotomicrografia da epiderme dissociada de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	44
Figura 16:	Cromatogramas do extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>H. lupulus</i> obtido por CLUE-DAD-EM/EM.....	47
Figura 17:	Propostas de fragmentação dos possíveis flavonoides encontrados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	49
Figura 18:	Propostas das estruturas dos possíveis flavonoides identificados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	54
Figura 19:	Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	56

Figura 20:	Quantificação de fenólicos totais no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	56
Figura 21:	Reação de complexação do flavonoide quercetina como o cloreto de alumínio.....	58
Figura 22:	Quantificação de flavonoides totais no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	58
Figura 23:	Curva ROC (TPR versus FPR) utilizada na validação dos flavonoides astragalina (1), nicotiflorina (2), hiperina (5) e rutina (6) encontrados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	62
Figura 24:	<i>Word cloud</i> com as doenças mais citadas no <i>PubChem</i> para os flavonoides analisados.....	68
Figura 25:	Reação do DPPH com a espécie reativa.....	71
Figura 26:	Capacidade sequestrante do radical DPPH do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) das folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.	72
Figura 27:	Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	74
Figura 28:	Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem SK-mel-147, 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	75
Figura 29:	Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens SK-mel-147 e HaCat 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de <i>Humulus lupulus</i> L.....	76
Figura 30:	Porcentagem de células T24 nas fases mitóticas G1, S e G2M, após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	78
Figura 31:	Porcentagem de células MRC5 nas fases mitóticas G1, S e G2M, após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	78

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1:	Proposta de flavonoides identificados por CLUE-DAD-EM/EM no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de <i>H. lupulus</i> L.....	53
Tabela 2:	Predição <i>in silico</i> de potenciais atividades biológicas de constituintes químicos identificados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de <i>Humulus lupulus</i> L. utilizando a ferramenta <i>PASS on line</i>	59
Tabela 3:	Sumário dos resultados obtidos na validação usando 3 compostos e também a validação global.....	60
Tabela 4:	Atividades dos compostos avaliados, segundo o <i>PubChem</i>	63
Tabela 5:	Uso etnofarmacológico de <i>H. lupulus</i> L., atividade biológica dos extratos e compostos isolados e atividades preditas utilizando o software Active-IT.....	69

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Humulus lupulus* L., popularmente conhecida como lúpulo, possui ampla utilização tradicional, com várias atividades biológicas atribuídas. As inflorescências são indicadas como sedativo (BLUMENTHAL,1998), diurético, antiespasmódico e anafrodisíaco (DUKE, 1985; BLUMENTHAL, 1998); o óleo essencial, contra cefaleia, dor de dente e neuralgia, além de estimulante de apetite (GRIEVE, 1971). Na Índia, a Farmacopeia Ayurvedica indica a utilização de inflorescências para combate à dor de dente e indigestão (KARNICK, 1994) e na Medicina Tradicional Chinesa, para tratar insônia e falta de apetite (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Na aromaterapia, o óleo essencial do lúpulo é indicado para tratamento de pele e condições relacionadas ao estresse (LAWLESS, 1995).

Importante na indústria cervejeira, o lúpulo é uma das quatro matérias-primas essenciais para sua fabricação, juntamente com a água, o malte e a levedura (SIQUEIRA *et al.* 2008). Confere estabilidade à espuma, além de proporcionar amargor e aroma à cerveja (REINOLD, 1997); o amargor é dado pela adição do lúpulo no início do processo de fervura para a promoção da isomerização do xantohumulol; e o aroma é obtido pela sua adição no final da fervura ou no terço final da fermentação na forma de *dry hop*, sob a forma de *pellets*, inflorescências ou essências (HUGHES & SIMPSON, 1993; SANDRA, 1976).

É uma planta nativa da Europa (BEHRE, 1999), pertence à família Cannabaceae, é herbácea e dioica, podendo atingir 7-9 m de altura (HEALE *et al.* 1989). Possui folhas cordiformes lobadas verde-escuro, com extremidades recortadas, geralmente opostas (HILLER *et al.* 1996). Suas flores são unissexuais, e apenas os indivíduos femininos são utilizados comercialmente, pois as substâncias requeridas para produção de cervejas como sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, fitoestrógenos e flavonoides como o xantohumulol, existem essencialmente nessas flores (HILLER *et al.*, 1996).

Grandes quantidades de folhas de lúpulo apresentam-se como um sub-produto agrícola não explorado em todo o seu potencial. Segundo a APROLÚPULO (2019), após a realização da colheita das inflorescências, realiza-se uma poda total da planta, que já foi cortada para a colheita e apresenta apenas ramos rasteiros ainda com folhas, importante para armazenamento de energia nas raízes e nos rizomas. Após o inverno, a poda deve ser feita totalmente, deixando somente 5 cm de ramo principal

no máximo, seguida de uma cobertura com palhada seca ou adubação verde de inverno (APROLÚPULO, 2019).

Vários subprodutos agrícolas têm sido estudados como potenciais fontes de antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, e alguns desses produtos apresentaram potencial no que diz respeito à sua comparação com antioxidantes sintéticos (MOURE *et al.*, 2001; PESCHEL *et al.*, 2006; SCHIEBER *et al.*, 2001). Alguns estudos preliminares têm demonstrado que a concentração de compostos fenólicos nos extratos de folhas de lúpulo corresponde à sua atividade antioxidante, o que mostra o potencial dessa análise (CEH *et al.*, 2007), como no estudo de ABRAM *et al.* (2015), que relataram ações antioxidante e antimicrobiana das folhas e flores do lúpulo.

Por ser uma planta de difícil cultivo, o lúpulo é plantado, para fins comerciais, em zonas de clima moderado. Entretanto, no município de Baependi-MG, foi implantada uma área de cultivo que prosperou, de onde foram fornecidas as folhas para o desenvolvimento desse estudo.

Logo, devido aos metabólitos secundários e histórica utilização medicinal, torna-se importante avaliar outras possíveis aplicações dessa planta, principalmente de suas folhas, que são um sub-produto agrícola de potencial pouco explorado, de modo a considerar sua utilização além da produção de cerveja. Nesse projeto, realizou-se um estudo botânico e fitoquímico, além de avaliação de potenciais atividades biológicas *in silico* e *in vitro* das folhas de *Humulus lupulus* cultivado no Brasil.

2. EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1. O metabolismo vegetal:

Todos os organismos necessitam transformar e interconverter um amplo número de compostos orgânicos para sobreviver, crescer e reproduzir. Precisam prover sua própria energia na forma de ATP e suprimentos para construir seus próprios tecidos. Um conjunto de reações químicas integradas, mediadas por enzimas são usadas para esse propósito, o metabolismo intermediário; e, os caminhos envolvidos, são conhecidos como rota metabólica. Algumas das moléculas cruciais a esse processo são carboidratos, proteínas, ácidos graxos e ácidos nucleicos. Os organismos variam amplamente na sua capacidade de sintetizar e transformar compostos químicos (DEWICK, 2009).

Essas rotas metabólicas compreendem o metabolismo primário e o metabolismo secundário (SANTOS, 2010). Por serem essenciais à vida e comuns aos seres vivos, as rotas definidas como metabolismo primário sintetizam, degradam e geralmente interconvertem compostos comumente encontrados em todos os organismos, sendo essa uma área do metabolismo que compreende todos os compostos que têm uma distribuição mais limitada na natureza. O metabolismo secundário, por outro lado, está envolvido na sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema, mas não são necessariamente essenciais para o organismo produtor (SANTOS, 2010). Em muitos casos, seus benefícios ainda não são conhecidos. Alguns são produzidos para defesa contra o ataque de herbívoros, ou para atribuir coloração para atração de polinizadores. Esses produtos do metabolismo secundário são responsáveis pela maioria das ações farmacológicas atribuídas aos produtos naturais (DEWICK, 2009).

2.1.1. Flavonoides:

São produtos do metabolismo secundário, de biossíntese mista, derivados de das vias acetato e chiquimato (SIMÕES et al., 2007). As chalconas são precursoras de uma ampla variedade de derivados dos flavonoides encontrados no reino vegetal (DEWICK, 2009). A maioria dos flavonoides contem um anel heterocíclico de 6 membros, formado por um ataque nucleofílico, do tipo Michael, de um grupo fenol, a uma cetona insaturada dando origem à flavanona. A isomerização pode ocorrer quimicamente, em condições ácidas deslocando o equilíbrio para a formação da flavanona ou em meio básico deslocando o equilíbrio para a formação da chalcona.

Na natureza, entretanto, essa reação é estereoespecífica resultando na formação de um único enantiômero da flavanona. O esqueleto básico das flavanonas pode dar origem a muitas variantes, como flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas. A maioria dos sistemas enzimáticos mostra alta especificidade e converte os compostos com diferentes graus de oxigenação e padrões de substituição do grupo aril. Modificações dos padrões de hidroxilação podem ocorrer em qualquer um dos anéis aromáticos, geralmente na flavanona ou no di-hidroflavonol; e a metilação, glicosilação e dimetilação são também possíveis, aumentando a possibilidade de compostos formados. Uma alta proporção de flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos solúveis em água (DEWICK, 2009).

Sua biossíntese é descrita na figura 1:

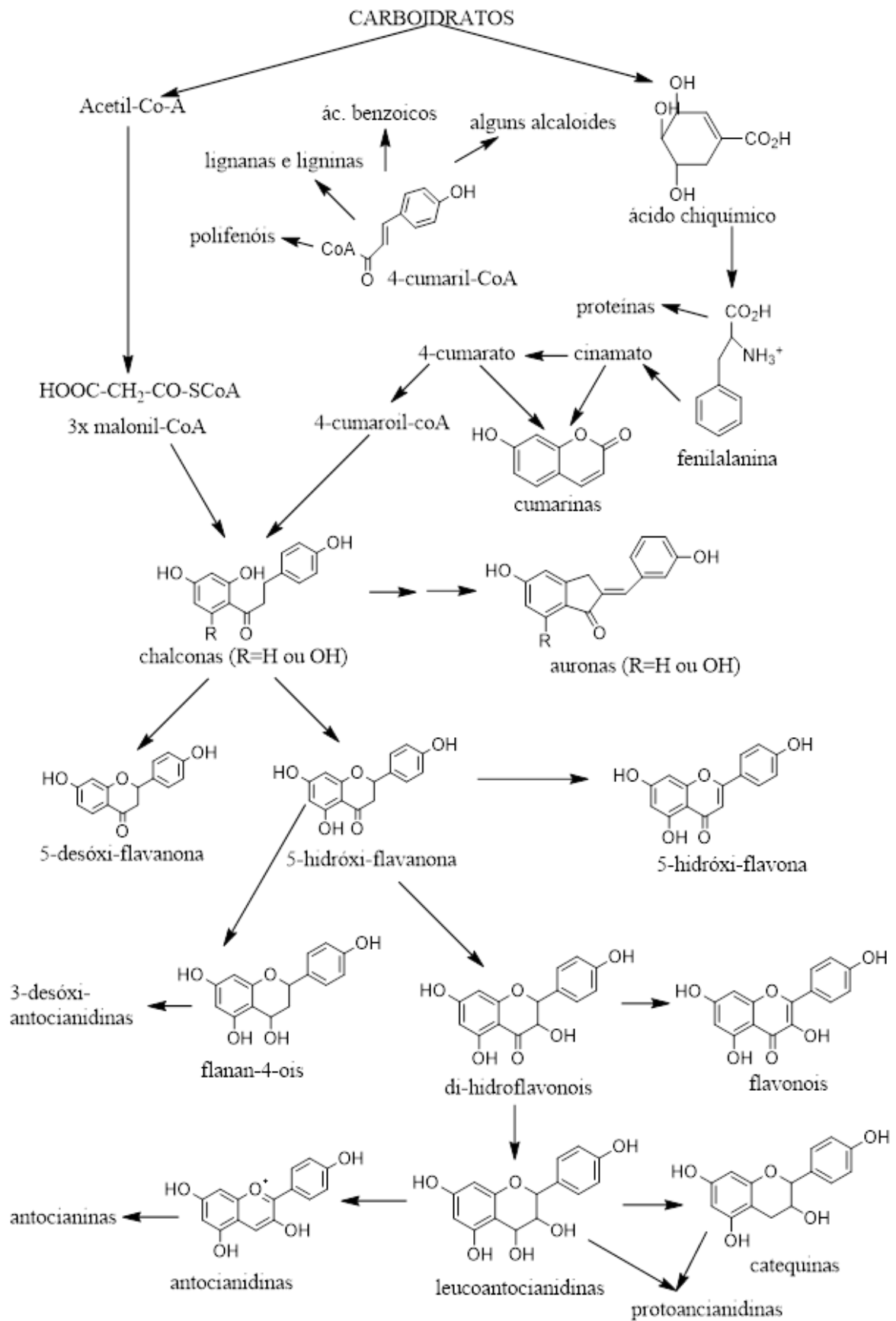


Figura 1: Biossíntese de flavonoides. Adaptada de ZUANAZZI & MONTANHA (2010).

Uma considerável quantidade de flavonoides é consumida diariamente através dos vegetais da dieta, então, efeitos biológicos adversos são raros. Além disso, existe um crescente argumento acerca dos benefícios dos flavonoides, agindo como antioxidante e conferindo proteção contra doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer. É discutida a sua ação contra a degeneração de componentes celulares com o envelhecimento, pois sua natureza polifenólica permite que eles sequestram radicais livres (DEWICK, 2009).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas, pode-se citar: proteção dos vegetais contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; atividade antioxidante; controle de ação dos hormônios vegetais; ação como agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1988; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Vale destacar que, segundo FERREIRA *et al.* (2008), flavonas e flavonóis não estão presentes apenas nas flores, podendo ser encontrados nas folhas de todas as plantas verdes.

2.2. A família Cannabaceae Martinov.

Nativa e não endêmica no Brasil, a família Cannabaceae é composta pelos gêneros *Aphananthe*, *Cannabis*, *Celtis*, *Gironniera*, *Humulus*, *Lozanella*, *Pteroceltis* e *Trema* (THE PLANT LIST, 2010).

Sua importância econômica está relacionada à produção de madeira e espécies ornamentais pelo gênero *Celtis* (Fig. 2a), além de frutos que são ocasionalmente consumidos. *Cannabis* (Fig. 2b) é fonte de fibra (*hemp*), de drogas psicotrópicas (maconha e haxixe) e destaca-se o uso da canabidiol no tratamento da epilepsia (MALCHER-LOPES, 2014). *Humulus lupulus* (lúpulo), pertencente ao gênero *Humulus* (Fig. 2c) é utilizado como aromatizante de cerveja (fornecendo óleos essenciais amargos), sendo *Cannabis* o gênero *typus* (JUDD *et al.*, 2009).

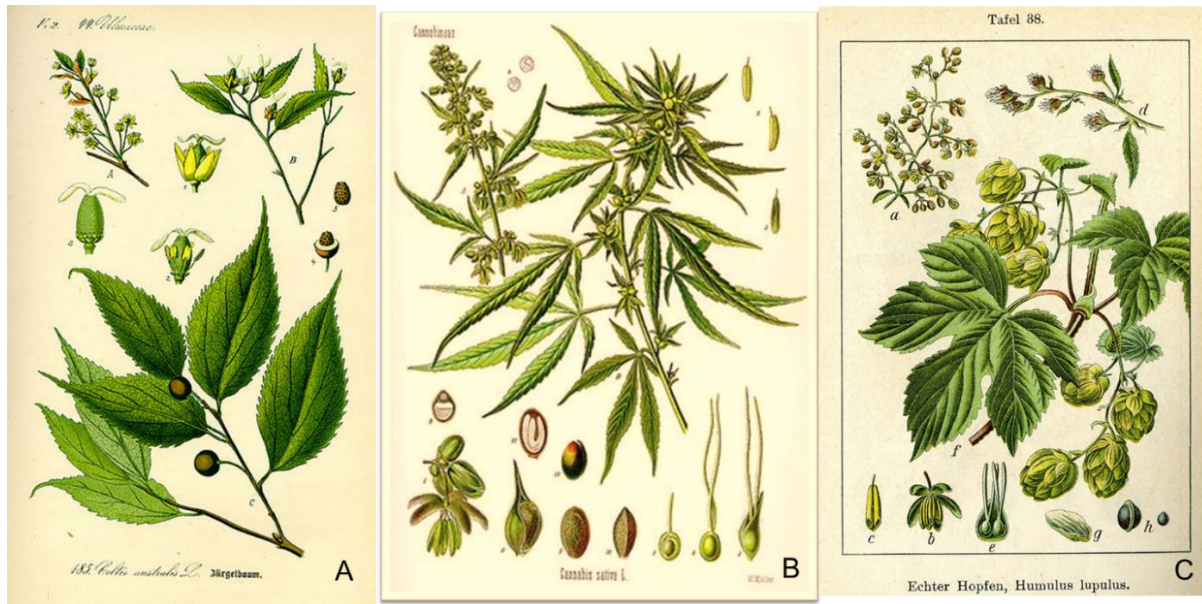


Figura 2: Espécies economicamente importantes da família Cannabaceae. 2a: *Celtis australis* L. (commons.wikimedia.org/wiki), 2b: *Cannabis sativa* L. (commons.wikimedia.org/wiki), 2c: *Humulus lupulus* L. (commons.wikimedia.org/wiki/).

WATSON & DALLWITZ (1992) descreveram as espécies dessa família como plantas mesófitas, ervas ou lianas, laticíferos, quando presentes, com ou sem conteúdo colorido, resinoso ou não resinoso. Anual ou perene. Não escandente (*Cannabis*) ou trepadeira (*Humulus*); quando trepadeira com caule volúvel, dextrorso no gênero *Humulus*. Folhas alternas, ou opostas; peciolada; sem bainha; sem glândulas; aromáticas; simples ou compostas; quando compostas, palmadas. Lâmina, quando simples, dissecta ou inteira; quando lobada, palmada; venação palmada; venação cruzada. Presença de estípulas intrapeciolares; livres; persistentes. Desenvolvimento da folha não “gramináceo”.

Quanto à sua anatomia, plantas com ou sem laticíferos (estes sempre cenocíticos, não segmentados e não ramificados, com conteúdo resinoso em *Cannabis*, e sem coloração em *Humulus*). Existem laticíferos nas folhas, caules e nos frutos. A anatomia foliar demonstra lâmina foliar dorsiventral com estômatos anomocíticos. Presença de tricomas (e conspícuos); sem glândulas ou glandulares (os pelos sem glândulas são frequentemente silicificados, geralmente unicelulares, algumas vezes biramificados, menos frequentemente unisseriados; os glandulares variam entre capitados e unicelulares, unisseriados ou parcialmente bisseriados na haste, discoide com haste unicelular, ou crateriforme). Lâmina com cavidades ou sem

cavidades secretoras. Cavidades secretoras no floema (*Cannabis*), contendo resina. Cistólitos de vários tamanhos são comumente presentes (geralmente associados à base dos tricomas). Nervuras secundárias sem células de transferência no floema (*Humulus*).

O seu eixo caulinar possui cavidades secretoras presentes (em ambos gêneros); com resina, ou com látex. Felogênio presente; inicialmente superficial. Cilindro vascular primário colateral, sem feixes separados, compondo um anel (o xilema primário agrupado em *Humulus* é mais bem distinguível na formação tardia, cilindro contínuo em *Cannabis*). Floema interno ausente. Feixes corticais ausentes. Feixes medulares ausentes. Crescimento secundário a partir do câmbio vascular. Vasos com placas de perfuração simples horizontais (ou não mais que levemente oblíquas). Vasos sem pontoações ornamentadas. Sistema axial do xilema com fibras libríformes.

A reprodução dos gêneros dessa família se dá por polinização. Indivíduos masculinos, femininos, ou masculinos e femininos. Flores unissexuais presentes. Planta dioica ou monoica (raramente). Polinização por anemofilia.

Morfologicamente, as flores são agregadas em inflorescências terminais cimosas. Inflorescências geralmente condensada e espiciforme. Flores com brácteas, bractéolas; regulares, pentâmeras, cíclicas. Apresentam perianto sepalino com um único verticilo; 5 sépalas livres (flor masculina), e gamo ou parcialmente gamossépalo (feminina). Cálice regular; persistente; imbricado, com 5 peças, polissépalo (flor masculina) ou parcialmente gamossépalo (feminina). Androceu pentâmero (em flores masculinas). Estames livres do perianto, todos iguais, livres entre si. Androceu exclusivamente com estames férteis. Estames 5; opositessépalos; eretos no broto. Anteras dorsifixas, deiscência longitudinal; tetraesporogênicas. Epiderme da antera persistente. Microsporogênese simultânea. Tétrade tetraédrica de micrósporos. Parede da antera inicialmente com mais de uma camada. Tapete glandular. Grãos de pólen com 3, usualmente, ou 2 aberturas), ou 4 aberturas, ou 6 aberturas; porados; com 2 células. Gineceu bicarpelar, sincárpico. 1 Pistilo; estiletos unidos e ovário súpero. Ovário unilocular. Gineceu sem estilete ou com estilete bem curto. 1 estilete apical. Estigmas 2 (longos); do tipo seco; papilado, tipo do grupo 2. Placentação apical. Óvulos em uma única cavidade; pêndulos; sem arilo; anatropos;

bitegmentados; crassinucelados. Desenvolvimento do saco embrionário do tipo Polygonum. Fusão de núcleos polares antes da fertilização. 3 células formadas nas antipodas; sem proliferação; efêmeras. Sinérgidas curtas em forma de pera. Formação de endosperma nuclear. Embriogênese do tipo crucífero (onagrad).

O fruto é não carnosos, indeiscente, uma semente, sementes endospermicas, endosperma resinoso, semente com amido. Dicotiledônea. Embrião curvo (*Cannabis*), ou circular (*Humulus*). Radícula dorsal. A germinação é fanerocotiledonar.

Quanto à sua fitoquímica, possui alcaloides, proantocianidinas presentes (*Humulus*), ou ausentes (*Cannabis*); cianidina e delphinidina (*Humulus*). Flavonóis presentes; canferol, quercetina e miricetina. Ácido elágico ausente (ambos gêneros). Plastídeos dos elementos de tubo crivado, tipo S (com grãos de amido).

2.3. A espécie *Humulus lupulus* L.

2.3.1. Botânica

A família Cannabaceae pertence à ordem Rosales, onde se localiza o gênero *Humulus*, que possui 5 espécies: *H. scandens* (Lour.) Merr., *H. yunnanensis* Hu, *H. lupulus* var. *lupuloides* E. Small e *Humulus lupulus* var. *neomexicanus* A. Nelson & Cockerell e *H. lupulus* L. (THE PLANT LIST, 2010).

H. lupulus L., espécie de estudo, está presente em todos os cultivos de lúpulo (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991) e distribui-se em regiões tropicais a temperadas (JUDD *et al.*, 2009).

É uma planta perene que cresce a partir de rizomas e enxertos. Pode chegar de 7-9 m de comprimento e seus caules crescem no sentido horário (NEVE, 1991), sendo uma espécie herbácea e dioica (HEALE *et al.*, 1989). Possui folhas cordiformes, trilobadas ou pentalobadas, que podem ocorrer no mesmo indivíduo, alcançando mais de 20 cm de comprimento, com disposição oposta, possuindo coloração verde-escuro a amarelo-amarronzada com pecíolos longos, margem serrada e superfície rugosa (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991; HILLER *et al.*, 1996; HAUNOLD, 1991). Uma resina amarelada, chamada lupulina, é secretada por tricomas glandulares amarelos encontrados na base das brácteas da inflorescência e pode ser coletada agitando-se

as inflorescências (NEVE, 1991) (Figs 3a-3d). Essa substância é utilizada na indústria cervejeira para conferir o amargor característico da cerveja (VENTURINI, 2005). As flores masculinas (Fig. 3e) são utilizadas no desenvolvimento e cruzamento de espécies, por meio de técnicas de hibridização (NEVE, 1991).

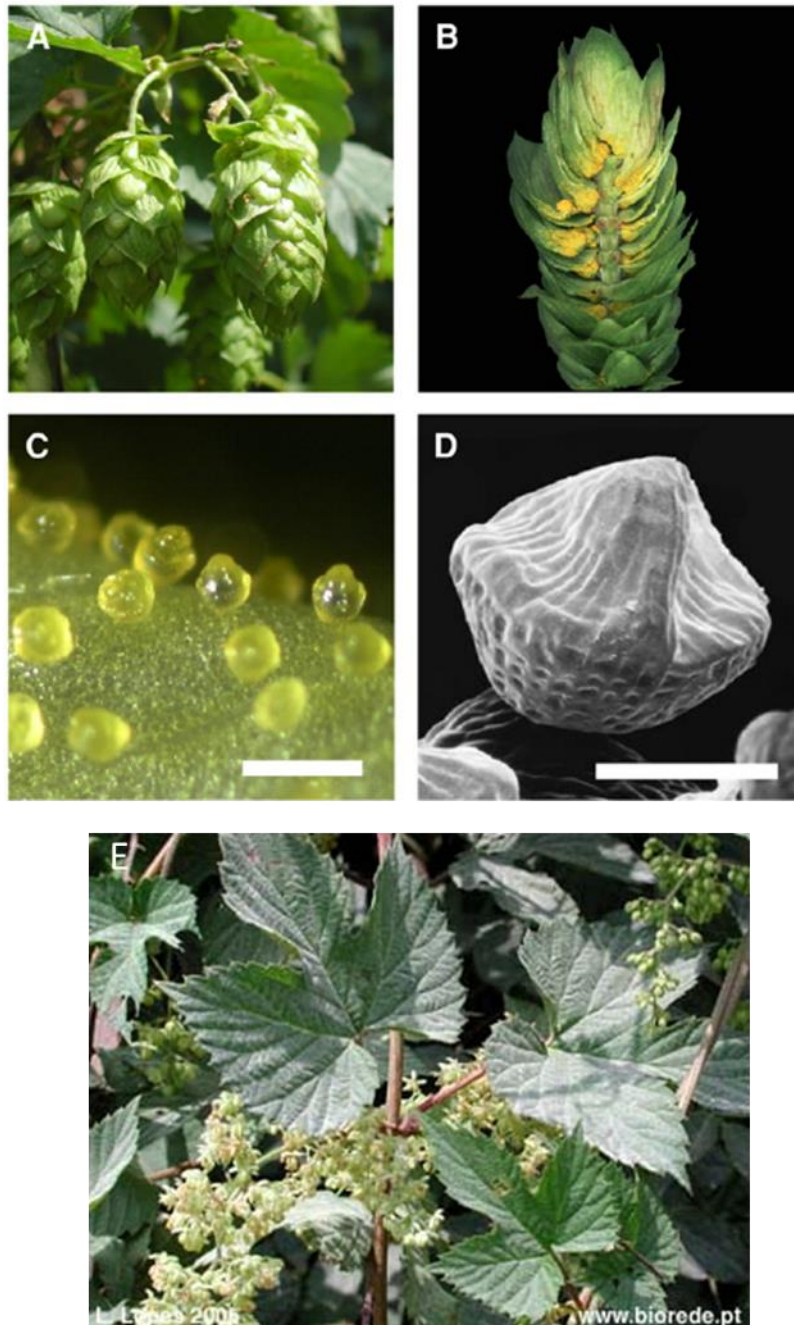


Figura 3: Inflorescências de *Humulus lupulus* L. 3a: Inflorescência feiminina de *H. lupulus*. 3b: Corte longitudinal destacando as glândulas de lupulina nas bases das brácteas. 3c: Fotomicroscopia das glândulas (Barra: 500 μ m). 3d: Fotomicroscopia da glândula de lupulina por microscopia eletrônica de varredura (Barra: 100 μ m). 3e: Indivíduo masculino de *Humulus lupulus* L. Fonte: 3a-3d (NAGEL *et al.* 2008); 3e: (<http://www.biorede.pt>).

O cultivo de lúpulo foi introduzido em Flandres no século XIV e estimulado pela Ordem do Lúpulo, iniciada por João, o bravo, duque de Borgonha. A importância do lúpulo como matéria-prima da indústria cervejeira aumentou na Europa e sua introdução na América foi pela companhia Massachusetts, em 1629, mas a plantação comercial iniciou-se apenas no século XIX, e, em seguida, no Japão e na ex-URSS (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991). Os cultivos para fins comerciais são mais comuns em zonas de clima moderado, estando em latitudes próximas a 43°- 54° (Europa), 38°- 51° (América do Norte), 38°- 51° (Japão), 37°- 43° (Austrália), 41°- 42° (Nova Zelândia) e 35°- 40° (Argentina). As maiores áreas de cultivo estão situadas no Sudeste e Centro-Oeste da Inglaterra, alguns distritos na Checoslováquia, na região de Hallertau na Alemanha, Eslovênia e nos estados de Washington, Oregon e Califórnia nos Estados Unidos (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991).

De difícil adaptação ao clima brasileiro, o lúpulo necessita de condições de baixa temperatura e tempo de exposição à luz variado (EBY, 2011), entre nove a quatorze horas por dia. Para sua germinação, as sementes do lúpulo necessitam de baixas temperaturas; em condições normais, as sementes germinam na primavera, quando o solo se aquece após meses de frio intenso. Exige solos bem drenados, ricos em húmus e com pH variando entre 5,7 e 7,5 (JEZEK et al., 2013; EBY, 2011).

Um fator importante a se destacar é que a região onde o lúpulo é plantado altera seu sabor e aroma, uma vez que a produção dos metabólitos secundários, os responsáveis por esses fatores, são vinculados à necessidade da planta (SIMÕES et al., 2010).

Seu cultivo comercial produz melhores resultados nas regiões entre 45-55° de latitude (DEL VALLE et al., 2003), o que não inclui o Brasil. Entretanto, tem se desenvolvido várias tentativas de cultivo dessa planta em território nacional, visando à produção de uma cerveja genuinamente brasileira. Existem comprovações de êxito no cultivo de lúpulo no Brasil, onde agricultores utilizaram melhoramento de técnicas agrícolas visando o aumento do fotoperíodo e estímulo de brotação uniforme durante a estação (MEGA et al., 2011; JEZEK et al., 2013). Recentemente, no município de Baependi-MG, foi implantada uma área de cultivo que prosperou, de onde foram fornecidos os materiais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Segundo a APROLÚPULO (2019), após a realização da colheita das inflorescências, realiza-se uma poda total da planta, que já foi cortada para a colheita e apresenta apenas ramos rasteiros com folhas, importante para armazenamento de energia nas raízes e nos rizomas. Após o inverno, a poda deve ser feita totalmente, deixando somente 5 cm de ramo principal, no máximo, seguida de uma cobertura com palhada seca ou adubação verde de inverno. Em sistema de condução latada, a planta fica toda na estrutura até o momento certo de sua poda.

Quando se pensa no estudo de uma planta visando sua utilização medicinal, a qualidade do produto final depende fundamentalmente da obtenção de matéria-prima de qualidade. Dessa forma, a identificação e a classificação corretas das plantas de acordo com as normas botânicas oficiais geram um esclarecimento imprescindível (SIMÕES et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1991). Segundo SIMÕES et al. (1988); ZUCCOLOTTO et al. (1999); ZAUPA et al. (2000) e FARIAS (2000) fazem-se necessários estudos morfoanatômicos de espécies vegetais para uma identificação botânica correta por comparação de lâminas de cortes histológicos, por meio de técnicas de Anatomia Vegetal.

O controle botânico associado ao controle fitoquímico faz parte das exigências da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), quando se pensa em estudo de determinada espécie. Diante disso, é necessário descrever comparativamente a anatomia foliar do lúpulo, de forma a garantir seu controle de qualidade botânico e conhecer possíveis variações morfoanatômicas dessa espécie aclimatada ao território brasileiro.

2.3.2. História:

O lúpulo tem sua origem como uma planta selvagem na Europa e no Nordeste da Ásia. Plinius cita o lúpulo em "Naturalis Historia" no final do século I d.C. como uma planta de jardim, sendo comum o seu consumo como um tipo de aspargo. O lúpulo crescia entre árvores de salgueiro como "um lobo em pele de cordeiro", o que explica o nome "*Lupus salictarius*", dado pelos romanos, de onde derivou o nome "*Humulus lupulus*" (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991). O nome vulgar lúpulo, atribuído à espécie, deriva do termo em latim *lupus*, que se refere à sua forma de crescimento

rápida e por ser uma liana, destacando também a sua facilidade de subir sobre outras plantas (GRIEVE, 1971).

Possui amplo histórico de utilização medicinal, onde várias atividades biológicas já lhe foram atribuídas, como sedativo (BLUMENTHAL, 1998), no combate à cefaleia, dor de dente e neuralgia, estimulante de apetite (GRIEVE, 1971), antiespasmódico, diurético e anafrodisíaco (DUKE, 1985; WEISS, 1988; BLUMENTHAL, 1998). Na Índia, a Farmacopeia Ayurvedica indica a sua utilização para tratamento da dor de dente e indigestão (KARNICK, 1994) e na Medicina Tradicional Chinesa, para tratar insônia e falta de apetite (BLUMENTHAL et al., 2000). Na aromaterapia, o lúpulo é indicado para tratamento de pele e condições relacionadas ao estresse (LAWLESS, 1995).

Foi utilizado na produção de cerveja por sumérios e egípcios cerca de 3000 anos atrás. Os babilônios e filisteus conheciam a cerveja, mas não se sabe se eles usavam lúpulo na sua produção. O lúpulo saiu de cena um tempo e só voltou após Pepin, o breve, mencioná-lo em um Ato de Doação em 768. Nos séculos VIII e IX, conventos e mosteiros possuíam grandes jardins de lúpulo.

Documentos de 822 indicam que monges de Picardia reintroduziram o uso de lúpulo na produção de cerveja quando fundaram o convento de Corbay na Alemanha. Nos séculos XII e XIII o lúpulo era utilizado amplamente na Alemanha, com o nome de "Hopfo" e existem evidências da utilização de grãos, alecrim e outras ervas aromáticas para aromatizar a cerveja (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991).

2.3.3. O lúpulo e a produção de cerveja:

O lúpulo é uma das quatro matérias-primas essenciais para a fabricação de cerveja, juntamente com a água, o malte e a levedura. Primeiramente, ocorre a etapa de maltagem, que é a germinação das sementes sob temperatura controlada, seguindo-se a moagem do malte, mosturação, fervura, fermentação e maturação (SIQUEIRA et al., 2008) (Figura 4).

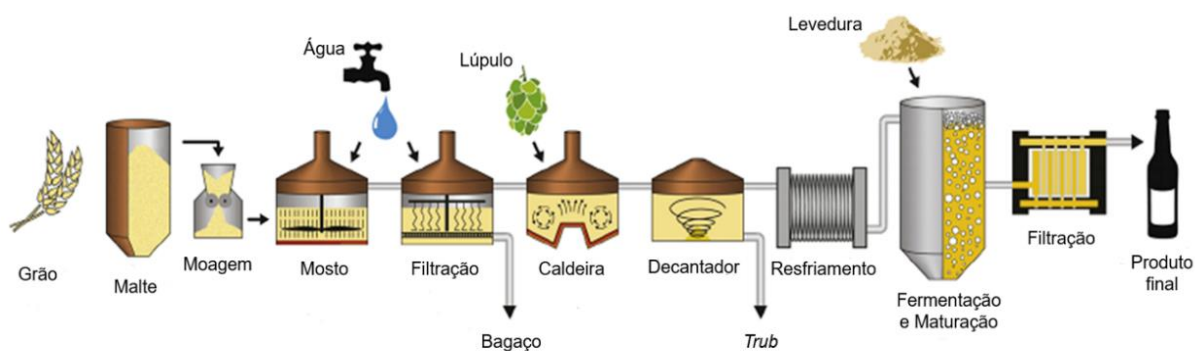


Figura 4: Etapas envolvidas na produção da cerveja (Adaptada de Anderson *et al.*, 2019).

A lupulina corresponde a aproximadamente 15-30 % do peso seco, dependendo da variedade do lúpulo. As substâncias presentes na lupulina podem ser classificadas em duas categorias: resinas duras e brandas. Os compostos não solúveis em hexano presentes na lupulina são chamados de resinas duras, sendo solúveis em metanol e éter dietílico.

O principal composto desse grupo é o xantohumulol, uma chalcona prenilada, que, submetida a condições específicas, como altos valores de pH e altas temperaturas, podem ser isomerizadas em uma flavanona, o isoxantohumulol (TANIGUCHI *et al.*, 2014; ALMAGUER *et al.*, 2014), uma forma mais solúvel e mais amarga que os ácidos de origem. Essa característica é importante na indústria cervejeira, sendo o isoxanthohumulol, o principal prenilflavonoide presente na cerveja (STEVENS *et al.*, 1998, 1999) (Figura 5).

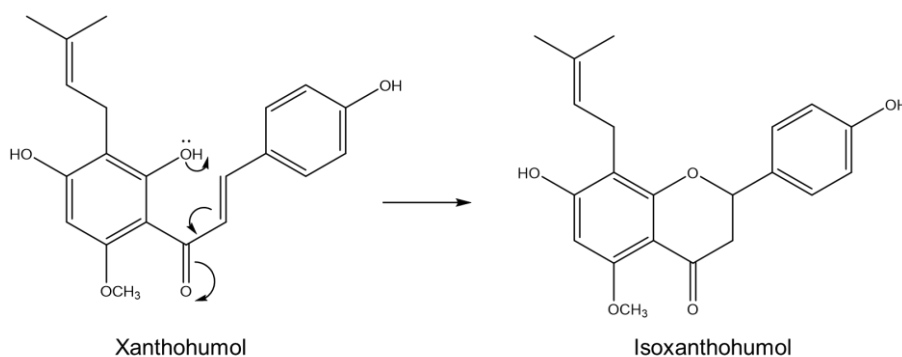


Figura 5: Reação de isomerização do xantohumulol em isoxantohumulol.

2.3.4. Fitoquímica:

Os estudos fitoquímicos relacionados ao lúpulo são, em sua maioria, aqueles que utilizam as flores femininas, devido à sua importância econômica na indústria cervejeira, de onde os principais flavonoides identificados, em sua maioria nas inflorescências femininas, são chalconas e outros flavonoides, como caempferol, quercetina, quercitrina e rutina (SÄGESSER & DEINZER, 1996). Alguns flavonoides prenilados foram identificados em suas inflorescências, sendo o mais importante a chalcona xanthohumol (cerca de 1% do peso seco) (STEVENS *et al.*, 1999), que pode ser convertida em isoxanthohumol, em decorrência do aumento de pH e tratamento térmico (STEVENS *et al.*, 1998, 1999), sendo o isoxanthohumol o principal flavonoide prenilado presente na cerveja.

Outras chalconas ocorrem em menor proporção, mas também sofrem isomerização formando sua flavanona correspondente, como xanthogalenol, identificada em algumas variedades de lúpulo ocorrentes na América do Norte e no leste da Ásia (STEVENS *et al.*, 2000). A substância 2', 4', 6', 4-tetrahidróxi-3'-C-prenilchalcona, conhecida como desmetilxanthohumol é considerada como precursora da maioria dos flavonoides presentes no lúpulo (CHADWICK *et al.*, 2006), que, através de uma isomerização, leva à formação da maioria dos estrogênios do lúpulo, identificados como uma mistura racêmica de (\pm)-8-prenilnaringenina, juntamente com a (\pm)-6-prenilnaringenina (HÄNSEL & SCHULZ, 1988). Durante o desenvolvimento da flor feminina do lúpulo, os níveis desses flavonoides aumentam gradualmente, dependendo da variedade do lúpulo e das condições climáticas (De KEUKELEIRE *et al.*, 2003, 2007), sofrendo influências de acordo com as necessidades da planta, bem como o teor dos demais metabólitos secundários (DEWICK, 2009).

Substâncias solúveis em hexano pertencem às resinas brandas. Essas são compostas por humulonas, correspondendo aos α -ácidos e aos β -ácidos. Os α -ácidos são derivados do floroglucinol e possuem dois grupos prenila ligados. Os β -ácidos possuem dois grupos prenila em C6, o que totaliza três prenilas (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991) (Figura 6).

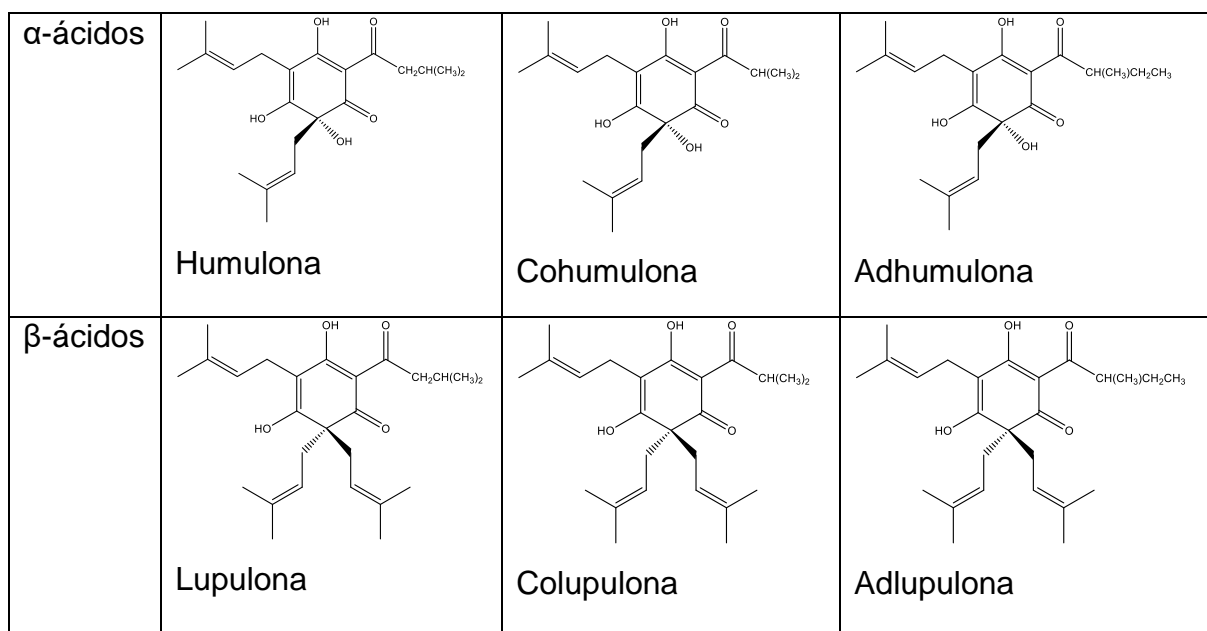


Figura 6: Estruturas químicas dos α-ácidos e β-ácidos presentes em *Humulus lupulus* L.

2.3.5. Aplicações farmacológicas:

Alguns estudos relatam potenciais atividades farmacológicas de substâncias presentes no lúpulo. MIRANDA *et al.* (1999) relataram a atividade antiproliferativa *in vitro* de flavonoides prenilados do lúpulo em células da linhagem MCF-7 (tumor de mama humano), HT-29 (tumor de cólon humano) e A2780 (tumor de ovário humano) sendo os componentes majoritários o xanthohumol (XH), dehidrocicloxanthohumol (DX) e isoxanthohumol (IX), apresentando valores de CE_{50} 0,5-15 μ M. DELMULLE *et al.* (2006, 2008) avaliaram a mesma atividade para células das linhagens PC-3 e DU145 (tumor de próstata humano), tendo como componentes majoritários XH, desmetilxanthohumol (DMX), IX, além da 6-prenilnaringenina (6-PN) e 8-prenilnaringenina (8-PN), na concentração de 12-53 μ M.

ALBINI *et al.* (2006) avaliaram a atividade antiproliferativa do XH com valores de CE_{50} menores que 10 μ M para a linhagem HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana). MIRANDA *et al.* (2000b) encontraram valores de 5-25 μ M para atividade antioxidante e antiperoxidante do XH e DMX em LDL isolado de humanos. Na avaliação da inibição da angiogênese em vasos da placenta humana, BERTL *et al.* (2004) encontraram valores de CE_{50} menores que 10 μ M para XH e IX. Para avaliação da indução de apoptose em células tumorais de câncer de cólon humano, PAN *et al.* (2005) relataram valores de CE_{50} de 5-15 μ M.

Em estudo realizado por VANHOECKE *et al.* (2005a) em células de tumor de mama humano, das linhagens MCF-7 e T47-D, o CE₅₀ apresentou valores menores que 10 µM na avaliação da indução da apoptose em células tumorais. COLGATE *et al.* (2007) encontraram valores de CE₅₀ de 10-20 µM em células de hiperplasia benigna de próstata humana da linhagem BPH-1 e células de tumor de próstata da linhagem PC-3.

Em estudos que avaliaram os α-ácidos e β-ácidos em relação ao seu potencial quimiopreventivo como agente antitumoral, TOBE *et al.* (1997b) avaliaram o potencial de inibição da apoptose em células de leucemia monoblástica humana, da linhagem U937, onde o composto majoritário era a humulona, encontrou valores de 1-100 µg/mL como concentração ativa. LAMY *et al.* (2007) avaliaram o mesmo potencial em células de carcinoma de cólon humano metastático, tendo como composto majoritário a lupulona, na concentração de 40 µg/mL.

Segundo KARABÍN *et al.* (2016), tanto os α-ácidos e β-ácidos quanto os flavonoides prenilados demonstraram atividade antioxidante, sendo o xantohumol o que apresenta maior atividade. Em relação aos efeitos antimicrobianos, ambos também apresentam atividade, entretanto, os β-ácidos são mais ativos. Os α-ácidos são também conhecidos pelo seu potencial sedativo (KARABÍN *et al.*, 2016). Outras atividades foram atribuídas aos flavonoides prenilados, com destaque para a forte ação do xantohumol, como antiproliferativa, anti-obesidade, inibidores da diacilglicerol acil-transferase, no transporte de triglicerídeos e secreção da apolipoproteína B (KARABÍN *et al.*, 2016) Cerca de 0,3 - 1 % do peso seco da flor feminina é composto por óleos voláteis, enquanto que os α-ácidos e β-ácidos correspondem a 5 - 20 % do seu peso (VERZELE & De KEUKELEIRE, 1991).

2.3.6. Potencial farmacológico de subprodutos agrícolas:

Vários subprodutos agrícolas têm sido estudados como potenciais fontes de antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, e alguns desses produtos apresentaram potencial no que diz respeito à sua comparação com antioxidantes sintéticos (MOURE *et al.*, 2001; PESCHEL *et al.*, 2006; SCHIEBER *et al.*, 2001).

Alguns estudos preliminares têm demonstrado que a concentração de compostos fenólicos nos extratos de folhas de lúpulo corresponde à sua atividade antioxidante (CEH *et al.*, 2007). O teor de compostos fenólicos e a capacidade de sequestrar radicais pelo método do DPPH foram comparados com a literatura, de onde concluiu-se que o teor total de fenólicos nas folhas de lúpulo é próximo aos valores encontrados por SALAHEEN *et al.* (2014) em polpa de mirtilo, mas sua atividade antioxidante é menor.

Embora as flores tenham teores majoritários de compostos, De KEUKELERE *et al.* (2003, 2007), destacaram a presença de ácido amargos e chalconas em menor quantidade nas folhas e estritamente relacionados à variedade de lúpulo.

Como somente as inflorescências femininas do lúpulo são utilizadas na indústria cervejeira, grandes quantidades de folhas são um sub-produto agrícola, que não é explorado em todo o seu potencial. As folhas também podem ser utilizadas como fonte de compostos fenólicos. Diante disso, deve-se considerar o relevante potencial de atividades biológicas de folhas de lúpulo, além de dar uma nova destinação a esse subproduto.

2.4. Estudos *in silico* de potenciais atividades biológicas

As pesquisas com produtos naturais utilizam métodos de triagem virtual para direcionar as pesquisas com as substâncias identificadas. Os meios utilizados integradamente para alcançar esse objetivo são: a criação de um banco de dados 3D de substâncias com descrição de atividades biológicas, obtidas a partir de uma triagem *in vitro* de produtos de fontes etnofarmacológicas; seleção daqueles biologicamente ativos, com base nesse banco de dados; e *screening* em paralelo de substâncias naturais não estudadas (ROLLINGER *et al.*, 2008). Acredita-se que apenas uma parte da diversidade estrutural existente em produtos naturais tem sido explorada quanto ao seu potencial farmacológico (EHRMAN *et al.*, 2007).

Dessa forma, essas predições de atividades biológicas são úteis na pesquisa acadêmica, providenciando um direcionamento efetivo para ensaios biológicos, ao prever efeitos farmacológicos de substâncias identificadas. Realizada por meio técnicas de quimioinformática (*in silico*), representa um paradigma no que diz respeito

à descoberta e desenvolvimento de compostos bioativos, tanto em níveis acadêmicos como em níveis industriais (SCHMIDT *et al.*, 2013). No que diz respeito ao estudo de produtos naturais associados aos estudos *in silico*, é relevante a sua contribuição no processo de descobrimento de novos fármacos e no direcionamento de aplicações de testes farmacológicos e do suporte financeiro na pesquisa. Os resultados são baseados no estudo da relação estrutura-atividade quantitativa (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) (LAGUNIN *et al.* 2000; LAGUNIN *et al.* 2010).

O processo usado é uma triagem virtual e pode ser complexo e de difícil interpretação. No entanto, existem ferramentas computacionais disponibilizadas gratuitamente, através de servidores que facilitam e apresentam resultados das predições de maneira rápida. De uma maneira geral, os resultados são produzidos por métodos que comparam a estrutura as substâncias com aquelas disponíveis em bancos de dados de compostos ativos utilizados em ensaios biológicos realizados *in vitro* e/ou *in vivo*, novos compostos em desenvolvimento e fármacos utilizados em medicina e veterinária (WANG *et al.*, 2014).

Entre os programas utilizados para realização dessa triagem, está o *PASS on line* (*Prediction Activity Spectra of Substances*), que possibilita realizar a predição envolvendo mais de 3500 tipos de atividades biológicas, incluindo efeitos adversos ou tóxicos, ou ainda ação contra vírus, bactérias, entre outros (GONG *et al.*, 2013). Outra ferramenta utilizada é o sistema Active-IT, uma nova forma de predizer a performance de uma dada substância em um *screening* virtual e utilizando QSAR. Essa avaliação é definida como a razão positiva dividida pela soma das razões positivas e falso positivas para um determinado *cutoff*. A sua performance é comparada com outros *softwares* alternativos para uma melhor determinação dos dados. O objetivo é ter resultados robustos com as respectivas variações no *cutoff* utilizado e a razão do número de compostos ativos em relação ao número total de compostos, apresentando sensibilidade às variações na qualidade do modelo (LOPES *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Descrever a morfoanatomia foliar de *H. lupulus*, cultivado no Brasil, atentando para possíveis variações comparadas à literatura, em associação à investigação de sua fitoquímica e potenciais atividades biológicas, através de estudos *in silico* e *in vitro*, visando possível utilização dessa planta além da indústria cervejeira.

3.2. Objetivos específicos:

- Descrever a anatomia foliar de *H. lupulus*, observando a presença de possíveis variações morfoanatômicas, quando comparadas à literatura;
- Identificar os metabólitos majoritários;
- Realizar quantificação de fenólicos e flavonoides do EEB e frações;
- Realizar estudo predição de atividade biológica de substâncias identificadas no EEB e frações;
- Realizar teste de atividade sequestrante de radical do EEB e frações;
 - Realizar estudo de citotoxicidade do EEB e frações frente à diferentes linhagens celulares.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do material vegetal

As folhas de *Humulus lupulus* utilizadas nesse estudo foram obtidas de área de cultivo, gentilmente cedidas pelo produtor Klaus Dietrich Guth, na região do Vale do Gamarra (21° 57' 32" S 44° 53' 24" O), no município de Baependi/MG, em Janeiro/2018, com depósito de exsicata no Herbário Prof. José Badini DEBIO/ICEB/UFOP, sob número de registro OUPR 29768. Foi realizado registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob número A07DBB0.

4.2. Estudo Botânico

Visando à confecção de laminário para fins de estudo morfoanatômico do material fresco-fixado, folhas totalmente expandidas, entre o terceiro e quartos nós, foram coletadas e fixadas em FAA₇₀ (formaldeído Proquímios[®], ácido acético glacial Reagen[®] e álcool etílico Proquímios[®] 70%) e, após 48 horas, conservadas em etanol 70%, segundo JOHANSEN (1940).

4.2.1. Cortes histológicos:

A partir do material fresco-fixado, foram confeccionados cortes transversais seriados em micrótomo rotativo e à mão livre, de amostras da região mediana (incluindo a nervura central), entre o meio e a margem, margem, ápice e base da folha. Para a obtenção de cortes seriados, fragmentos foliares da planta fresca-fixada foram desidratados pela série etanólica e incluídos em parafina Sulfal[®], de acordo com adaptações da metodologia apresentada em KRAUS & ARDUIN (1997). Em seguida, desparafinizados com xilol Proquímios[®], reidratados na série etanólica, corados com a dupla coloração azul de Astra e fucsina básica e montados em bálsamo-do-canadá Proquímios[®].

4.2.2. Dissociação de epidermes:

Com o intuito de observar parâmetros morfo-anatômicos na superfície do limbo foliar, foi realizada a dissociação de epidermes foliares, onde fragmentos da folha fresca-fixada foram colocados na mistura de Jeffrey (ácido crômico Proquímios[®] a 10% e ácido nítrico Alphatec[®] a 10% 1:1 v/v), segundo JOHANSEN (1940). Após limpeza da face interna, com auxílio de pincel, a epiderme de ambas as faces foi

corada com azul de Astra e fucsina básica, as lâminas montadas em glicerina e vedadas com base incolor.

4.2.3. Diafanização:

Fragmentos foliares foram diafanizados em hidróxido de potássio Dinâmica[®] a 5% para observação e identificação do padrão de nervação das folhas (KRAUS & ARDUIN, 1997). Depois de clarificadas, as folhas foram coradas com safranina 1% e, após passagem pela série etanólica e em xilol, foram montadas em bálsamo-do-canadá e classificadas quanto ao padrão de nervação segundo HICKEY (1973).

4.2.4. Coloração histológica:

Epidermes dissociadas, cortes à mão livre e em micrótomo rotativo Zeiss[®], Hyrak M40 foram corados por dupla coloração, com azul de Astra (Sigma[®]) e fucsina básica (Nuclear[®]). As folhas diafanizadas foram coradas com safranina 1% (Vetec[®]) (KRAUS & ARDUIN, 1997).

4.2.5. Fotomicrografias

Todo o material produzido foi analisado em microscópio óptico Leica DMLS do Laboratório de Anatomia Vegetal, DEBIO/ICEB/UFOP e os registros feitos fotomicroscópio Zeiss Scope A1, com Axiocam Zeiss ICc3 do Laboratório de Fitotecnologia, DEFAR/UFOP.

O fluxograma dos estudos botânicos está demonstrado a seguir (Figura 7).

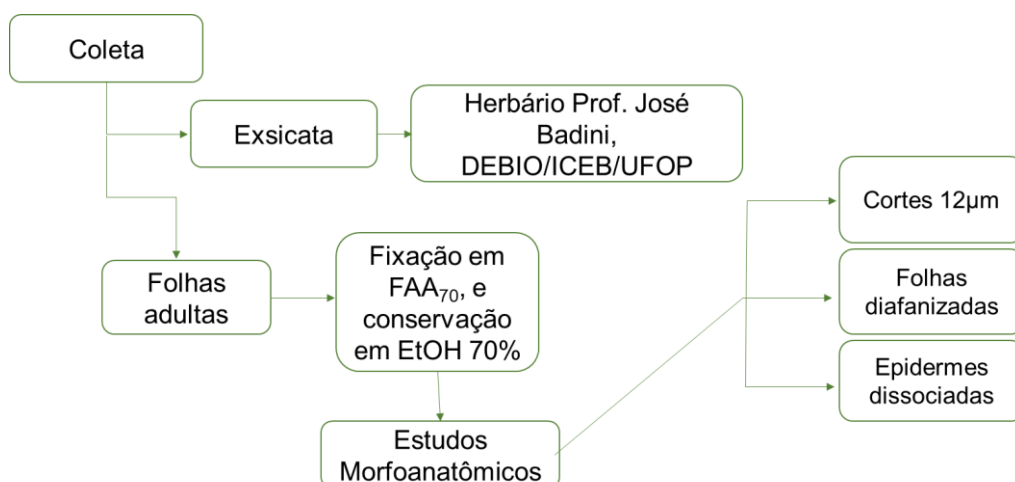


Figura 7: Fluxograma da metodologia do estudo botânico de folhas de *H. lupulus* L.

4.3. Estudo Fitoquímico:

4.3.1. Obtenção do extrato etanólico bruto

Após a coleta, cerca de 1,5 kg de folhas frescas foram submetidas ao processo de secagem em estufa de ar circulante Nova Ética[®] a 40°C e à trituração até o estado de pó fino em moinho de facas Manesco e Ranieri[®] Ltda., modelo MR 340, obtendo-se 600 g de droga vegetal. Esse material vegetal triturado foi submetido à extração por percolação exaustiva com etanol 92,8° INPM (Isofar[®]), a temperatura ambiente, seguindo a recomendação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). O volume total de etanol utilizado foi 4.450 mL.

A cada dois dias, o percolado foi recolhido e concentrado em rotaevaporador Fisatom[®], temperatura não superior a 40°C, retirando-se o etanol. Esse processo foi repetido até o esgotamento, quase que total, da droga, obtendo o extrato etanólico bruto (EEB).

A percolação teve duração de 12 dias, obtendo-se o rendimento de aproximadamente 60 g, representando 10%.

4.3.2. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

Cerca de 30 g do EEB foi ressuspenso em 300 mL de metanol:água (8:2) e particionado em 100 mL hexano Impex[®]. As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador a temperatura não superior a 40°C para a retirada do solvente, de onde obteve-se 19,5 g (65%) da fração hexânica (FH) e 10,5 g (35%) da fração hidrometanólica (HM).

4.3.3. Identificação de flavonoides majoritários por CLUE-DAD-EM/EM

Para o preparo de amostras a serem enviadas à análise para fins de identificação, pesou-se o EEB e a HM (5mg/mL em metanol grau HPLC). Em seguida, foram filtradas em filtro seringa de 0,2 µm (Millipore). Os filtrados foram analisados em equipamento ACQUITY[®] TQD *ion* acoplado com espectrômetro de massas (Waters) equipado com instrumento quadrupolo associado a uma fonte de *eletronspray* nos modos positivo e negativo (ESI) e pressão atmosférica com ionização química (APCI). A análise ocorreu nas seguintes condições: ionização: -4 kV; voltagem do orifício: -60 V; voltagem do capilar: 3500 V; temperatura do capilar: 320 °C; cone: 5 kV;

dessolvatação: 320°C; corrente: 5 mA; gás de arraste: nitrogênio, 27 psi; e o modo de operação foi *full scan* (100–2000 Da). As análises LC-ESI-EM/EM foram adicionalmente feitas com gás de colisão: hélio e a energia de colisão: 30 eV. A separação cromatográfica foi em coluna de fase reversa ACQUITY UPLC BEH (1,7 µm, 50 × 2 mm i.d.) (Waters). A fase móvel consistiu em água acidificada com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B). O protocolo de eluição foi 0–11 min com gradiente linear (5 to 95% B). O fluxo foi 0,3 mL/min e o volume de injeção da amostra foi 4,0 µL. O espectro UV-Vis foi registrado (190 to 450 nm) (GONTIJO *et al.*, 2017).

O fluxograma dos estudos fitoquímicos está demonstrado a seguir (Fig. 8):

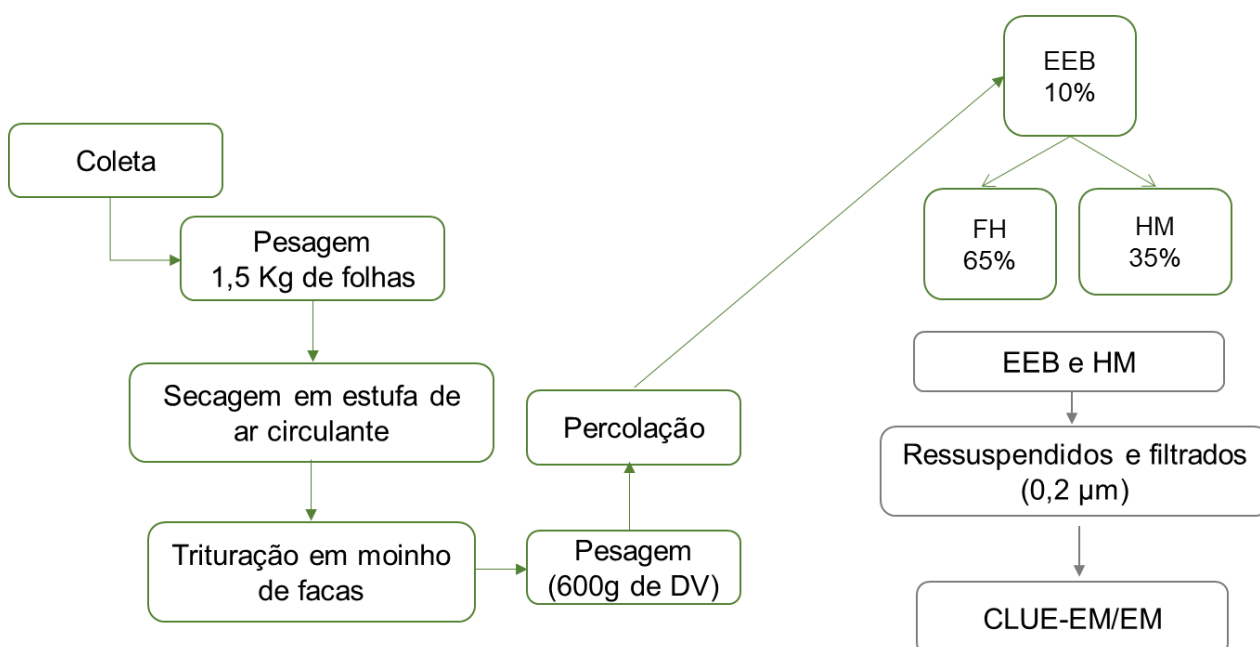


Figura 8: Fluxograma da metodologia do estudo fitoquímico de extrato etanólico bruto e frações de folhas de *H. lupulus* L. EEB: extrato etanólico bruto; FH: fração hexânica; HM: fração hidrometanólica; CLUE-DAD-EM/EM {UPLC® BEH [1,7µm, 50x2mm, FM: água:ác. fórmico 0,1% (A) e acetonitrila:ác. fórmico 0,1% (B), 0-11 min. gradiente linear 5-95%B, com fluxo de 0,3mL/min, 4,0µL], UV 190–450 nm}.

4.4. Determinação de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos do EEB e HM foi determinado pelo método de Follin Ciocauteau (BONOLI *et al.*, 2004), utilizando ácido gálico como padrão. Para realização do teste, foi preparada uma solução estoque das amostras a serem testadas na concentração de 2,5 mg/mL em etanol (Biotec®). Pipetou-se uma alíquota de 80 µL, à qual foram adicionados 30 µL de água destilada, 10 µL do reagente de

Follin Ciocauteau (Cromoline[®]), ao abrigo da luz. Após 1 minuto, adicionou-se 40 µL de solução de carbonato de sódio (Vetec[®]) a 15%, e homogeneizou-se por 30 segundos. Ao final do processo, adicionou-se 40 µL de água destilada, e, após 2 horas, procedeu-se a leitura em leitor de microplacas Molecular Devices[®], a 650 nm. Elaborou-se o branco, adicionando 80 µL de solução estoque da amostra e 120 µL de água destilada. As soluções padrões de ácido gálico foram preparadas em diferentes concentrações, 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg/mL, em água destilada, repetindo, para o padrão o mesmo procedimento realizado com as amostras. O teor de compostos fenólicos foi determinado pela interpolação dos valores obtidos de acordo com a relação absorvância X concentração. A dosagem foi realizada em triplicata.

4.5. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais em EEB e HM foi determinada pelo método do cloreto de alumínio (CHANG *et al.*, 2002), utilizando rutina como padrão. Para realização do teste, foi preparada uma solução estoque das amostras a serem testadas na concentração de 2,5 mg/mL em etanol (Biotec[®]). Pipetou-se uma alíquota de 100 µL, à qual foram adicionados 40 µL de etanol, 4 µL da solução a 10% de cloreto de alumínio (Fluka Analytical[®]), 4 µL da solução de acetato de potássio (Synth[®]) 1mol/L e 52 µL de água destilada, ao abrigo da luz, por 40 minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura em leitor de microplacas Molecular Devices[®], a 450 nm. Elaborou-se o branco, adicionando 100 µL de solução estoque da amostra, 44 µL de etanol, 4 µL de acetato de potássio e 52 µL de água destilada. As soluções padrões de rutina foram preparadas em diferentes concentrações, 2; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 e 45 µg/mL, em água destilada, repetindo, para os padrões, os mesmos procedimentos realizados com a amostras. O teor de flavonoides totais foi determinado pela interpolação dos valores obtidos de acordo com a relação absorvância X concentração. A dosagem foi realizada em triplicata.

4.6. Estudo *in silico* para Predição de Potenciais Atividades Biológicas:

Com o objetivo de predizer as atividades biológicas potenciais dos flavonoides identificados no EEB e na fração HM, pela técnica de CLUE-DAD-EM/EM, esses flavonoides glicosilados foram analisados pelos *softwares* *Pass on line* e Active-IT.

4.6.1. Software *PASS on line*:

O *software PASS online* provê informações acerca de várias atividades biológicas baseadas na estrutura química de cada composto, mostrando a possibilidade de ser ativo (Pa) ou inativo (Pi) (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>). Para desenvolver o estudo, é necessário desenhar a estrutura na forma 2D descrita e comparar com a descrição de sua atividade biológica disponível no banco de dados. Os resultados são expressos pela diferença (Pa – Pi) (LAGUNIN *et al.*, 2000).

Mediante esses resultados dos estudos *in silico* para os compostos identificados, foram selecionadas atividades com Pa – Pi > 0,6 (FILHO *et al.*, 2014).

4.6.2. Software Active-IT:

Para construir os modelos, os três pontos farmacofóricos potenciais obtidos pelo *software in-house 3DPharma* foram usados para estabelecer os vetores que foram subsequentemente utilizados para construir os modelos preditivos.

Cada conformação de cada substância estudada foi tratada separadamente, e os átomos de maior peso foram convertidos em pontos farmacofóricos potenciais, que podem ser de seis tipos: doador de ligação de hidrogênio, aceitor de ligação de hidrogênio, carregados positivamente, carregados negativamente, aromático e lipofílico. Para cada conformação, calculado com o *software OMEGA* (HAWKINS *et al.*, 2012), todas as combinações dos três pontos farmacofóricos potenciais no espaço 3D foram calculadas para compor um vetor binário. De acordo com WANG *et al.* (2018), a união dos vetores uniconformacionais produzem um único *fingerprint* modal para cada substância. Os vetores multiconformacionais (modal) de substâncias ativas e inativas de cada banco de dados (obtidos do *PubChem* ou de outras fontes) foram submetidos ao *software* interno ExCVBA (HAWKINS *et al.*, 2012) para construir e validar os modelos de aprendizado da máquina utilizando o *support vector machine* (SVM) e Naive Bayes (Anexo I).

As estruturas dos flavonoides glicosilados foram buscadas no *PubChem* e tratadas com o programa *3DPharma* para geração dos *fingerprints* de farmacóforos. Em seguida foi realizada uma predição das atividades potenciais com o sistema

Active-IT utilizando 2000 modelos disponíveis e 2 métodos de aprendizado de máquina, SVM e Naive Bayes.

Foi realizada uma busca no *Pubchem* para os bioensaios conhecidos, principalmente aqueles associados aos modelos disponíveis para predição. Utilizando os dados de atividade conhecidos e as predições realizadas para esses compostos foi realizada uma validação prévia do método. A validação foi realizada por substância, quando possível, e também para o conjunto de substâncias. Essa validação também foi utilizada para definir os pontos de corte nos resultados que irão definir suas atividades biológicas mais prováveis.

As estruturas e nomes de cada substância são relacionados a doenças e genes relacionados a essas na literatura (disponíveis na página do *PubChem* de cada substância). Essas associações são realizadas por buscas automáticas no *PubMed*, sem curagem manual, e não há garantia de que a associação realmente seja válida. É necessário confirmar por buscas mais minuciosas. No entanto, esses dados facilitam a análise dos resultados e auxiliam na validação da metodologia empregada.

Para realizar as predições é necessário que as estruturas 3D e suas conformações estejam disponíveis no *PubChem*. Para duas substâncias identificadas, robinina e mangaslina, o excessivo número de ligações simples não permite, de acordo com o protocolo do *PubChem*, que as suas conformações sejam calculadas. Deste modo, apenas as demais foram submetidas ao sistema Active-IT para a realização das predições.

4.6.2.1. Validação da metodologia com bioensaios conhecidos:

Para esta validação foram utilizados os dados disponíveis no *PubChem Bioassay* para os compostos rutina, astragalina, nicotiflorina e hiperosídeo. Dentre esses bioensaios foram encontrados 169 modelos correspondentes no sistema Active-IT, totalizando 171 dados de atividade, sendo 11 resultados positivos (ativos) para algum dos 4 compostos analisados. O número de dados excede o número de modelos pois alguns bioensaios são compartilhados por dois ou mais compostos selecionados.

4.6.2.2. Análise do ponto de corte (*cutoff*) nos *scores SVM*:

Uma vez validada a metodologia, foi necessário estimar o melhor de valor de corte para a análise das predições realizadas. Para isso foram utilizados os *scores* brutos produzidos pela modelagem de cada par modelo/substância do grupo de validação (160 inativos e 11 ativos). Os valores dos *scores* calculados foram ordenados e cada valor de *score* foi considerado como um ponto de corte. A partir daí podem ser utilizadas 2 abordagens diferentes.

a) Uma primeira análise envolve o cálculo de várias métricas para definir o ponto de corte (*cutoff*) que produza as melhores predições.

Estudo do *cutoff* utilizando várias métricas conhecidas:

SVM → MCC máximo = 0,42 @ Pa-Pi=0,69 (EF=7,1; F-score=0,45; Spe=96, Sel=45, PM=0,92@chi=0,49)

SVM → EF máximo = 7,8 @ Pa-Pi=0,72 (MCC=0,39; F-score=0,42; Spe=98, Sel=36, PM=0,94@chi=0,39)

Naive Bayes → MCC máximo = 0,42 @ Pa-Pi=0,79 (EF=7,1; F-score=0,45; Spe=96, Sel=45, PM=0,92@chi=0,49)

Naive Bayes → EF máximo = 7,8 @ Pa-Pi=0,89 (MCC=0,34; F-score=0,35; Spe=98, Sel=27, PM=0,94@chi=0,29)

Com base nesta abordagem os melhores pontos de corte seriam 0,7 para o *SVM* e entre 0,8 e 0,9 para o Naive Bayes.

b) Outra abordagem envolve o cálculo dos valores de Pa-Pi projetados para cada ponto de corte. Neste caso, são calculadas as taxas de falsos positivo (FPR) e falsos negativos (FNR) para cada ponto de corte.

Pa = FNR e Pi=FPR, então Pa-Pi = FNR-FPR = 1-TPR-FPR

Nesta abordagem considera-se que os valores de Pa-Pi (*score* bruto) calculados pelo programa podem estar superestimados, deste modo comparando-se os valores de Pa-Pi estimados com os dados de atividade experimental pode-se obter uma visão mais realista.

Estudo do *cutoff* para os cortes de Pa-Pi igual ou maior que zero e igual ou maior que 0,5 e 0,7:

SVM → Score=0,25 @ Pa-Pi>=0 e Score=0,65 @ Pa-Pi>=0,5 e Score=0,75 @ Pa-Pi>=0,7

Naive Bayes → Score=-0,25 @ Pa-Pi>=0 e Score=0,75 @ Pa-Pi>=0,5 e Score=0,85 @ Pa-Pi>=0,7

Com base nesta abordagem os melhores pontos de corte (para um Pa-Pi>0,5) seriam 0,65 para o SVM e 0,75 para o Naive Bayes (Figuras 9 e 10).

Usando os dois métodos foram escolhidos, os *cutoffs* de 0,7 para o SVM e 0,8 para o Naive Bayes. Esses valores devem garantir um valor de Pa-Pi corrigido maior que 0,5, valor de MCC em torno de 0,4 e EF acima de 7.

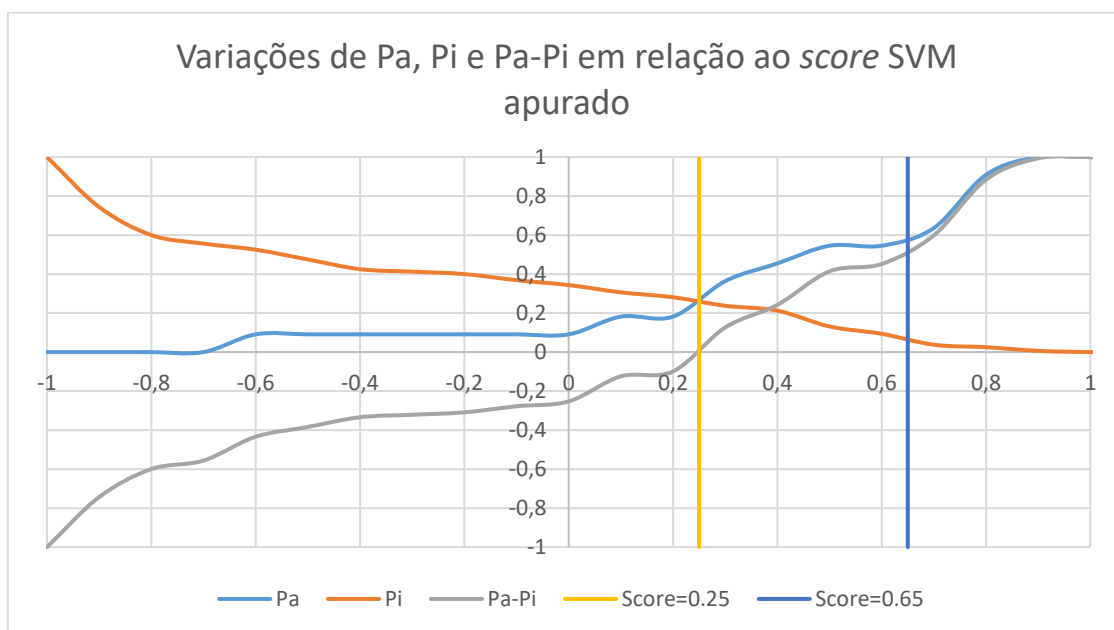


Figura 9: Variações de Pa, Pi e Pa-Pi em relação ao *score* SVM apurado utilizado na predição da atividade dos flavonoides 1-8 identificados em folhas de *Humulus lupulus*.

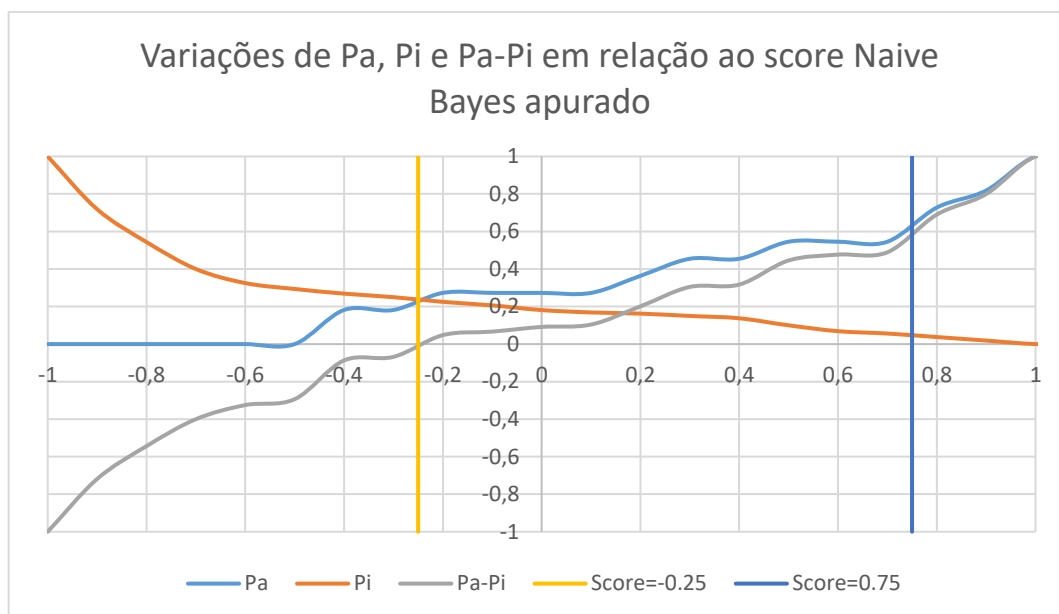


Figura 10: Variações de Pa, Pi e Pa-Pi em relação ao score Naive Bayes apurado utilizado na predição da atividade dos flavonoides 1-8 identificados em folhas de *Humulus lupulus* L.

4.7. Avaliação da Capacidade Sequestrante de Radical DPPH:

Foi avaliada utilizando o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A capacidade das amostras reduzirem o radical DPPH foi avaliada através do decréscimo de sua absorvância a 490 nm, de acordo com metodologia descrita por SOUSA *et al.* (2007). Para tal, foi preparada uma solução estoque das amostras a serem testadas na concentração de 200 µg/mL em etanol, que foi testada nas concentrações 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; e 200 µg/mL. O padrão utilizado foi a rutina. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,004 g/mL. Para preparo do branco, substituiu-se a solução de DPPH por 100 µL de etanol. Após incubação a 30 min. ao abrigo da luz, realizou-se a leitura em leitor de ELISA a 490 nm. O experimento foi realizado em triplicata e com as médias dos valores, construiu-se uma curva de inibição para cada amostra e para o padrão. A capacidade de sequestrar os radicais livres foi determinada pela equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(AbsDPPH - AbsAmostra) / AbsDPPH] \times 100$$

Onde:

AbsDPPH: absorvância do DPPH.

AbsAmostra: absorvâncias das amostras e do padrão.

Os resultados foram expressos a partir da CE_{50} , ou seja, a atividade antioxidante necessária para consumir 50% do radical DPPH, após equilíbrio da reação.

4.8. Avaliação da Citotoxicidade

4.8.1. Linhagens celulares

Foram realizados testes de citotoxicidade e seletividade utilizando a célula não tumoral MRC5 (célula de pulmão, linhagem fibroblasto humano), gentilmente doadas pelo prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas/UFMG e células de carcinoma urotelial humano da linhagem T24 (tumor alto grau, com mutação no gene *TP53*), adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B e mantidas a 37° C em atmosfera de 5 % de CO₂.

Em outra metodologia, realizada em parceria com o Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, foram utilizadas células de melanoma humano com a mutação NRASQ61R, linhagem SKmel147 cedidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas (ICESP-USP) adquirida em 2017. A linhagem foi testada, livre de micoplasma, por coloração indireta com Hoechst 33258 e foi utilizada dentro de um mês após o descongelamento do estoque. A linhagem foi cultivada meio DMEM *high glucose*, o meio foi suplementado com 10 % SBF (v/v) inativado por calor (56°C por uma hora), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, 0,012 mol/L de HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico) e 0,026 mol/L de bicarbonato de sódio, pH 7,2. As células foram mantidas em estufa Panasonic MCO-19AIC-UV (Panasonic Healthcare Co. Ltd., Japão) com 5 % de CO₂ a 37°C. Os subcultivos foram realizados a cada 72 horas e a viabilidade celular para a realização desses repiques foi determinada utilizando o corante de exclusão azul de tripan 0,16 % (m/v) em câmara de Neubauer.

4.8.2. Preparo das amostras

Foram preparadas soluções estoque do EEB, FH e HM da folha de *H. lupulus*, na concentração de 2,5 mg/mL, 2 % de DMSO.

4.8.3. Citotoxicidade e Proliferação Celular – Método XTT [2,3-Bis-(2-Metóxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida]

As células das linhagens T24 e MRC5 foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço). Depois do tempo necessário para aderências das células, 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do EEB e frações por 24 horas. As concentrações utilizadas foram 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1000 e 1200 $\mu\text{g/mL}$. Preparou-se controle não tratado (CNT), a fim de testar a viabilidade das células e controle não tratado com 2 % DMSO, para avaliar se o teor do solvente diminuiu a viabilidade celular. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks (0,4 g de KCl; 0,06 g de KH_2PO_4 ; 0,04 g de Na_2HPO_4 ; 0,35 g de NaHCO_3 ; 1 g de glicose e 8 g de NaCl em 1 L de água) e em seguida preparadas para a leitura. Adicionou-se meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol) nos poços e, em seguida, 12 μL da solução de XTT (2,3-Bis-(2-Metóxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida) em cada poço, inclusive em um poço contendo apenas o EEB e frações para verificar se o XTT reagia com a amostra. Após 90 minutos, a absorbância foi medida em 450 nm. Realizou-se o teste em triplicata (ALMEIDA *et al.*, 2019). Os resultados da absorbância são proporcionais ao percentual de células viáveis (SÁVIO *et al.*, 2014). Para cálculo dos resultados, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{média das absorbâncias das amostras}}{\text{média das absorbâncias do controle}} \times 100$$

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância ANOVA, com pós-teste de Dunnett's, através do *software* Prisma (GraphPad Prisma 5).

Células da linhagem SK-mel-147:

- Teste de exclusão do azul de tripan

As células SKmel147 ($6,25 \times 10^4$ células/cm²) foram incubadas em placas 24 poços com 1,0 mL de meio DMEM *high glucose* + 10 % SFB por 24 horas em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C. Após este período, foram adicionados os extratos em diferentes concentrações, 100 µg/mL e 500 µg/mL do EEB, FH e HM, e incubadas por 24 horas em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com 100 µL de CMF-BSS (solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio) (NaCl 136,89 mM, KCl 5,36 mM, Na₂SO₄ 0,7 mM, Na₂HPO₄ 1,12 mM, KH₂PO₄ 1,09 mM, glicose 6,1 mM, vermelho de fenol 7,05 µM) e transferidos para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, adicionou-se 200 µL de tripsina e 400 µL de DMEM *high glucose* + 10 % SFB. As amostras foram centrifugadas a 500 g por 6 minutos e ressuspensas em 200 µL de DMEM *high glucose* + 10 % SFB. Para a determinação da viabilidade, 20 µL da suspensão de células foi adicionada à solução de azul de tripan 0,016 % (20 µL). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, sendo consideradas inviáveis as células que incorporaram o corante, e viáveis as que excluíram o azul de tripan.

- Viabilidade celular pelo método do vermelho neutro:

As células SKmel147 ($6,25 \times 10^4$ células/cm²) foram incubadas em placas 96 poços com 200 µL de DMEM *high glucose* + 10 % SFB (soro fetal bovino) por 24 horas em estufa com 5 % de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação foram adicionados os extratos em diferentes concentrações, 100 µg/mL e 500 µg/mL do EEB, FH e HM, e incubadas por 24 horas em estufa com 5 % de CO₂ a 37°C. A solução de vermelho neutro 40 µg/mL em meio DMEM *high glucose* sem SFB foi preparada e mantida em estufa com 5 % de CO₂ a 37°C, após 24h a solução foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos para remoção dos cristais precipitados. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL da solução de vermelho neutro, previamente preparada, e as amostras foram incubadas por 3 horas em estufa com 5 % de CO₂ a 37°C. As células foram então lavadas com 150 µL de PBS por poço e foram adicionados 150 µL da solução 1% ácido acético em 50% de etanol. A placa foi agitada rapidamente por 10 minutos ou até a total extração do vermelho neutro das células. Após a leitura em 540 nm no leitor de microplaca (Biochrom, Asys Expert Plus Microplate Reader,

EUA), a porcentagem de células viáveis foi avaliada em relação ao controle sem adição da droga (100 %).

4.8.4. Análise de ciclo celular

As células MRC5 e T24 foram plaqueadas em placas de 12 poços (2×10^5 células/poço). Depois do tempo necessário para aderências das células, 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de do EEB e fração HM por 24 horas. As concentrações utilizadas foram 200, 400 e 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Preparou-se controle não tratado (CNT), a fim de testar a viabilidade das células e controle de marcação. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi recolhido, passado para tubo tipo Falcon e centrifugadas por 10 minutos. As células foram lavadas com solução de Hanks e adicionou-se 500 μL tripsina, a fim de permitir que as células se soltem do fundo do poço. Em seguida, inibiu-se a tripsina com 500 μL de inibidor de tripsina e colocou-se as células no tubo Falcon correspondente e foram submetidas à nova centrifugação por mais 10 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μL de etanol 70 % para fixar as células e manteve-se em *freezer* até o momento da marcação. Após 24 horas, centrifugou-se a 1200 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, lavou-se com 1mL de solução de Hanks e transferiu-se as amostras para o tubo do citômetro FACSCalibur. Centrifugou-se e descartou-se a solução de Hanks. As células foram ressuspensas em 200 μL da solução de marcação, composta por 0,0914 g de Cloreto de Magnésio, 0,0774 g de Citrato de Sódio, 0,04766 g de Hepes, 10 μL de Triton, 250 μL de uma solução de Iodeto de Propídeo 1 mg/mL e 9740 μL de água destilada. Após incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, fez-se a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur, 20000 eventos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo Botânico:

As folhas de *Humulus lupulus* estudadas são opostas, com tricomas tectores e glandulares em ambas as faces, com presença de cristólitos na epiderme superior e estômatos anomocíticos na epiderme inferior, sendo, portanto, hipostomática (Fig. 13 - 15). Suas folhas adultas têm textura membranosa, variam de inteiras a trilobadas (Fig. 11), possuem cerca de 9,5 cm de comprimento e 8 cm de largura, com pecíolo de 0,5 cm e limbo com margem serradas. De acordo com HICKEY (1973), possui classificação quanto ao eixo de orientação como apical, de curvatura convexa, simples lobada, simétrica em toda lâmina e de base lobada, com formato elíptico.



Figura 11: Foto de indivíduo feminino de *Humulus lupulus* L. Destaque: folhas. Foto: SANTOS, V. A.

O padrão de nervação da folha é actinódromo, pois três ou mais venações primárias divergem radialmente de um único ponto, conforme demonstrado na figura 12:

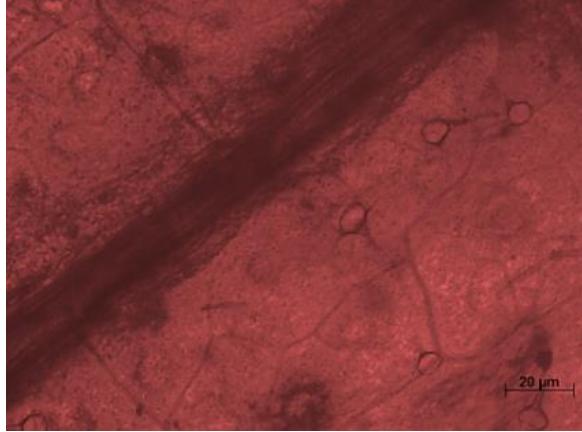


Figura 12: Fotomicrografia da folha diafanizada de *H. lupulus* L. Corante: Safranina 1%. (10x).

Ao corte transversal (Fig. 13), a folha é dorsiventral e hipoestomática. A epiderme da face adaxial é unisseriada e possui cutícula delgada e tricomas tectores unicelulares e glandulares. O parênquima paliçádico é bem diferenciado com um estrato de células bem mais compridas que largas. O parênquima lacunoso é relativamente frouxo com 3-4 camadas de células arredondadas, dispostas horizontalmente.

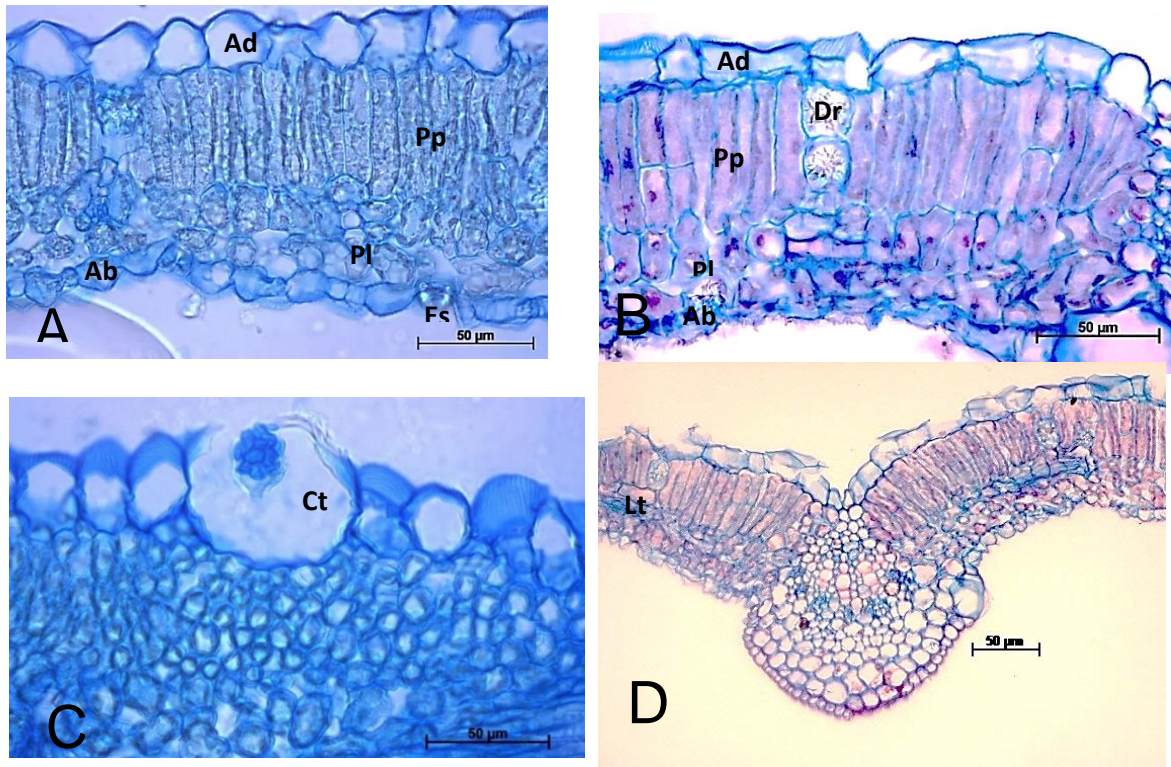


Figura 13: Fotomicrografias de cortes transversais de folhas de *H. lupulus* L. 13a: região do entremeio e margem (50x); 13b: região do entremeio e margem (50x). Destaque: drusas; 13c: região do entremeio e margem. Destaque: cystólito (50x). 13d: Destaque laticífero (20x). Ab: epiderme abaxial; Ad: epiderme adaxial; Ct: cystólito; Dr: drusa; Es: estômato; Lt: laticífero; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico. Coloração: azul de Astra e fucsina básica.

Na nervura central, a epiderme adaxial é uniestratificada. Abaixo da epiderme da face adaxial, surgem 3-4 camadas de colênquima, seguido de parênquima cortical. O feixe vascular possui o xilema de aspecto inteiro, com elementos de condução em fileiras, contando com separação dessas fileiras por células parenquimáticas. Não foi observada bainha esclerenquimática circundando o feixe vascular, que tem disposição colateral em arco aberto e o floema se localiza imediatamente abaixo do xilema (Fig. 14).

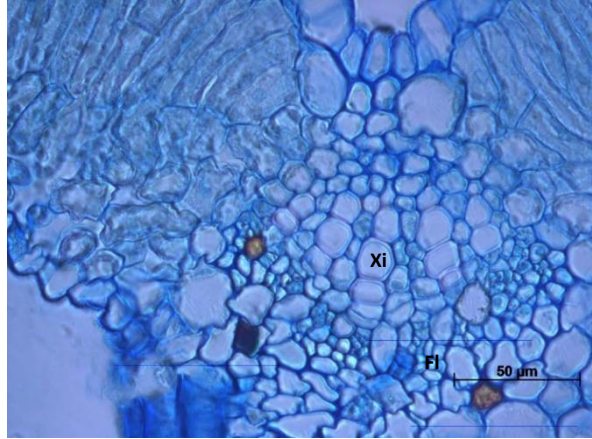


Figura 14: Fotomicrografia de corte transversal da nervura central da folha de *H. lupulus* L. Fl: floema; Xi: xilema. Corante: azul de Astra e fucsina básica (20x).

A epiderme, em ambas as faces, em vista frontal (Fig. 15), possui tricomas tectores unicelulares e tricomas glandulares, sendo que a cutícula possui ornamentação estriada. As células epidérmicas possuem paredes retas a levemente onduladas na epiderme adaxial, com a presença de cystólitos. Na face abaxial, a são encontradas paredes sinuosas das células epidérmicas e estômatos anomocíticos.

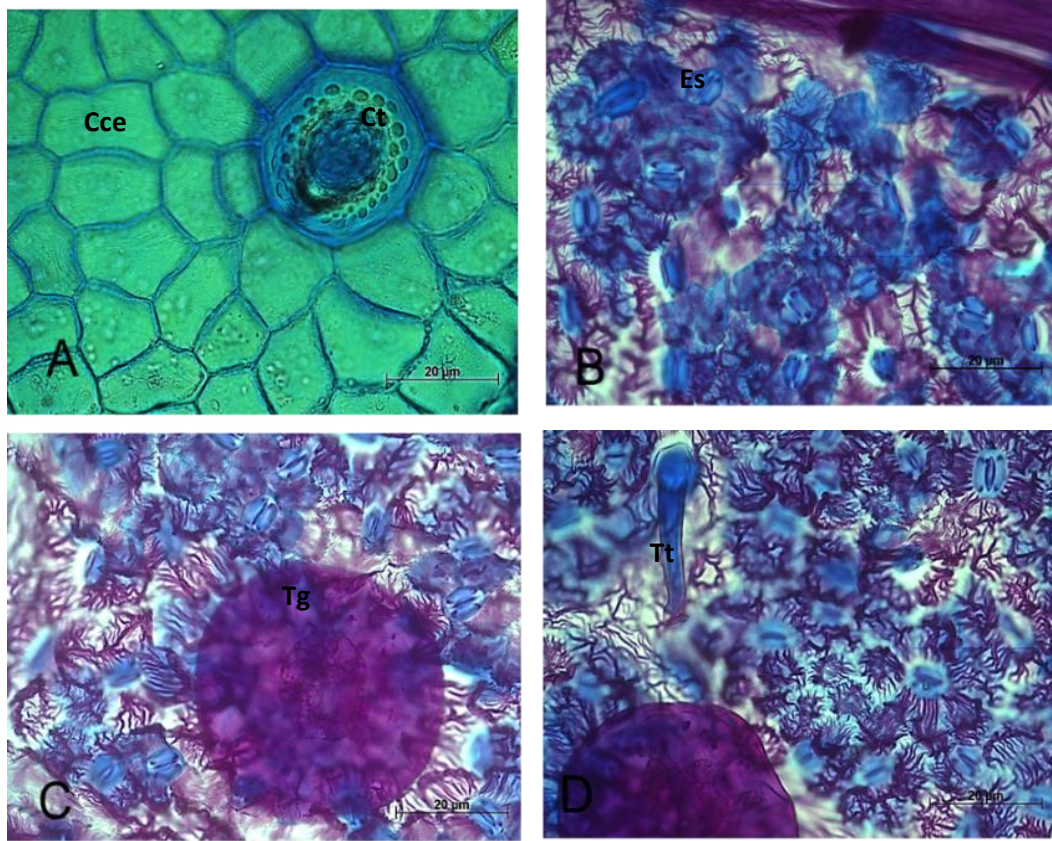


Figura 15: Fotomicrografia da epiderme dissociada de folhas de *H. lupulus* L. 15a: epiderme da face adaxial. Destaque: cristólito; 15b: epiderme da face abaxial; 15c: epiderme da face abaxial. Destaque: tricoma glandular; 15d: epiderme da face abaxial. Destaque: tricoma tector. Cce: célula comum da epiderme; Es: estômato anomocítico; Tg: tricoma glandular; Tt: tricoma tector. Coloração: azul de Astra e fucsina básica (50x).

WATSON & DALLWITZ (1992) descreveram as espécies da família Cannabaceae como plantas mesófitas, ervas ou lianas, laticíferos, quando presentes, com ou sem conteúdo colorido, resinoso ou não resinoso. Anual ou perene.

Quanto ao gênero *Humulus*, foi classificado como trepadeira, com caule volúvel e dextrorso. Folhas alternas, ou opostas; peciolada; sem bainha; sem glândulas; aromáticas; simples ou compostas; quando compostas, palmadas. Lâmina, quando simples, dissecta ou inteira; quando lobada, palmada; venação palmada; venação

cruzada. Presença de estípulas intrapeciolares; livres; persistentes. Desenvolvimento da folha não “gramináceo”.

Quanto à sua anatomia, plantas com ou sem laticíferos (estes sempre cenocíticos, não segmentados e não ramificados, com conteúdo sem coloração. Existem laticíferos nas folhas, caules e nos frutos. A anatomia foliar demonstra lâmina foliar dorsiventral com estômatos anomocíticos. Presença de tricomas (e conspícuos); sem glândulas ou glandulares (os pelos sem glândulas são frequentemente silicificados, geralmente unicelulares, algumas vezes biramificados, menos frequentemente unisseriados; os glandulares variam entre capitados e unicelulares, unisseriados ou parcialmente bisseriados na haste, discoide com haste unicelular, ou crateriforme). Lâmina com cavidades ou sem cavidades secretoras. Cistólitos de vários tamanhos são comumente presentes (geralmente associados à base dos tricomas). Nervuras secundárias sem células de transferência no floema.

Também foram observados laticíferos, assim como relatados por WATSON & DALLWITZ (1992), como sem coloração e presentes nas folhas, caules e nos frutos. Esses autores ainda relataram estômatos anomocíticos, os quais também foram observados neste estudo. A lâmina foliar dorsiventral, com presença de cistólitos na base dos tricomas na epiderme da face abaxial, assim como terminações vasculares e células de transferência do floema também foram observadas. Entretanto, não foi relatada no estudo de WATSON & DALLWITZ (1992) a presença de idioblasto cristalífero contendo drusas, o que também destaca a importância de uma descrição anatômica atualizada com as folhas de *Humulus lupulus* cultivadas no Brasil.

Entretanto, em um estudo realizado com folhas coletadas na Turquia, foi relatada a presença de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas (KONYAR *et al.*, 2014) no mesofilo e cristais de areia nas células do parênquima medular de folhas de *H. lupulus*. Nesse mesmo estudo, sugere-se que a presença de cristais em espécies do gênero *Humulus* pode ser usada para classificação de espécies. WU & KUO-HUANG (1997) relataram a presença de cristais de carbonato de cálcio em folhas de *Humulus scandens*.

Como é possível observar, os indivíduos de *H. lupulus* estudados por WATSON & DALLWITZ (1992), não foram realizados em folhas cultivadas no Brasil, uma vez que esse cultivo começou depois da publicação do estudo; KONYAR *et al.* (2014) estudaram população originária da Turquia. Dessa forma, é importante a realização de um estudo com folhas cultivadas no Brasil, pois se trata de uma inovação no cultivo dessa espécie, fomentando o controle de qualidade botânico do material com potenciais utilizações farmacológicas.

5.2. Estudo Fitoquímico:

5.2.1. Obtenção do extrato etanólico bruto e frações e refração:

Partindo de 600 g de droga vegetal, foram obtidos 60 g de EEB, representando um rendimento de 10%. A partir de 30 g do EEB, foram obtidos 19,5 g de fração hexânica (FH) e 10,5 g de fração hidrometanólica (HM), representando um rendimento de 65% e 35%, respectivamente.

5.2.2. Identificação de flavonoides majoritários:

Após análises dos cromatogramas (Figs. 16a e 16b), avaliando os tempos de retenção (TR), espectros de UV e de massas; e comparação com dados da literatura, foram identificadas as substâncias 1 a 8 (Fig. 17. Tab. 1).

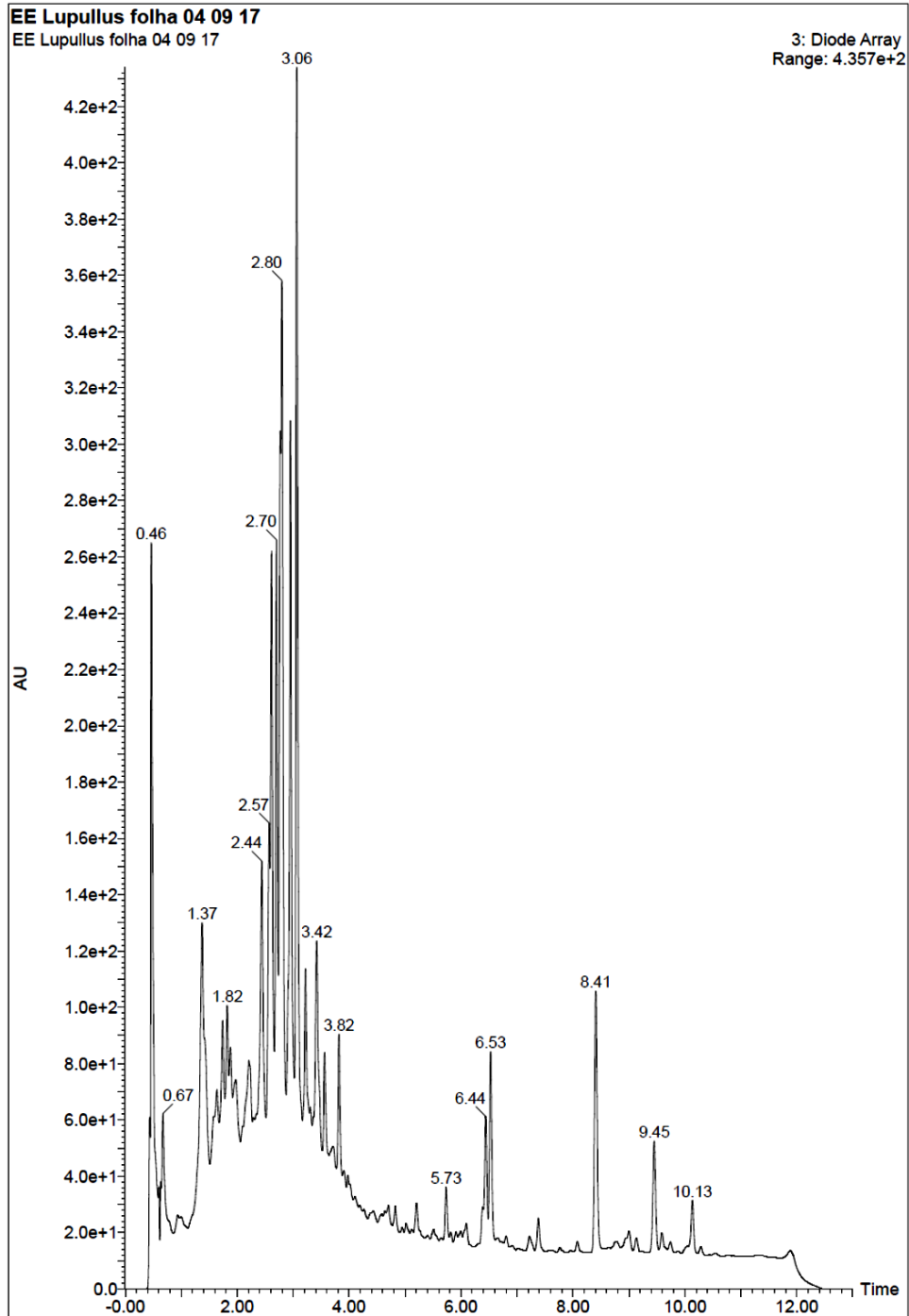


Figura 16a: Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *H. lupulus* L. obtido por CLUE-DAD-EM/EM {UPLC® BEH [1,7µm, 50x2mm, FM: água:ác. fórmico 0,1% (A) e acetonitrila:ác. fórmico 0,1% (B), 0-11 min. gradiente linear 5-95%B, com fluxo de 0,3mL/min, 4,0µL], UV 190–450 nm}.

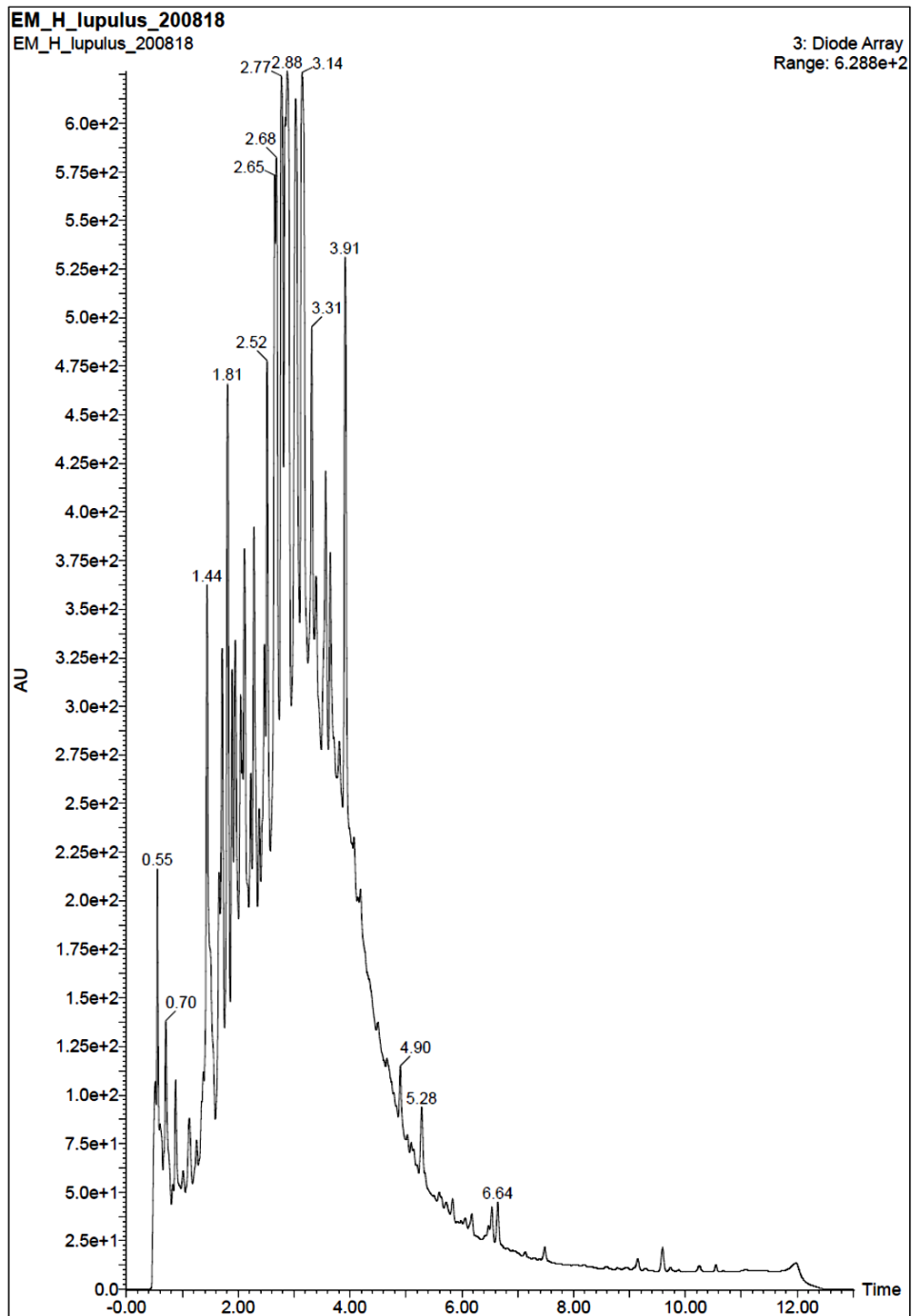
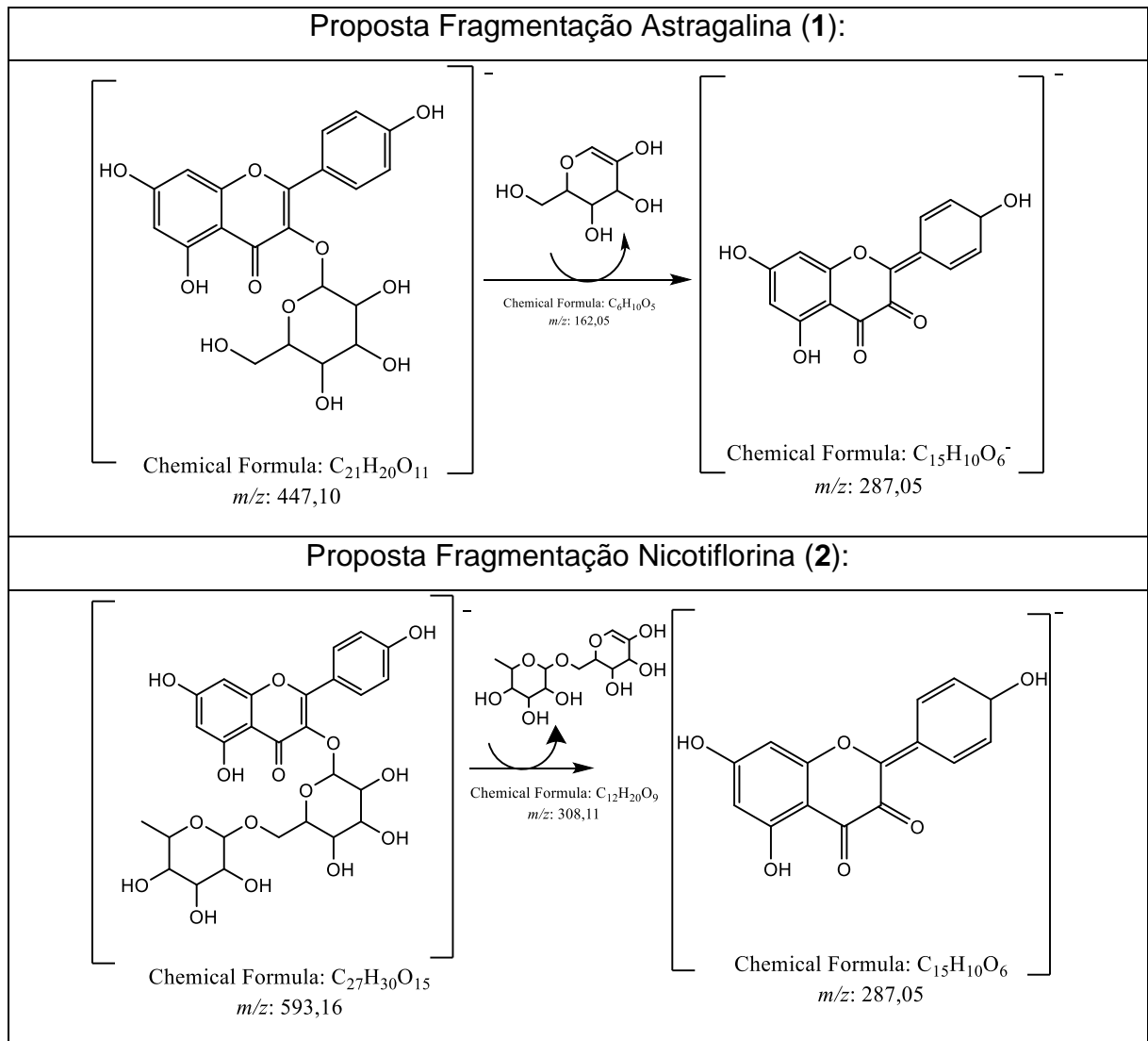


Figura 16b: Cromatograma da fração hidrometanólica (HM) do extrato etanólico bruto de folhas de *H. lupulus* L. obtido por CLUE-DAD-EM/EM {UPLC® BEH [1,7µm, 50x2mm, FM: água:ác. fórmico 0,1% (A) e acetonitrila:ác. fórmico 0,1% (B), 0-11 min. gradiente linear 5-95%B, com fluxo de 0,3mL/min, 4,0µL], UV 190–450 nm}.

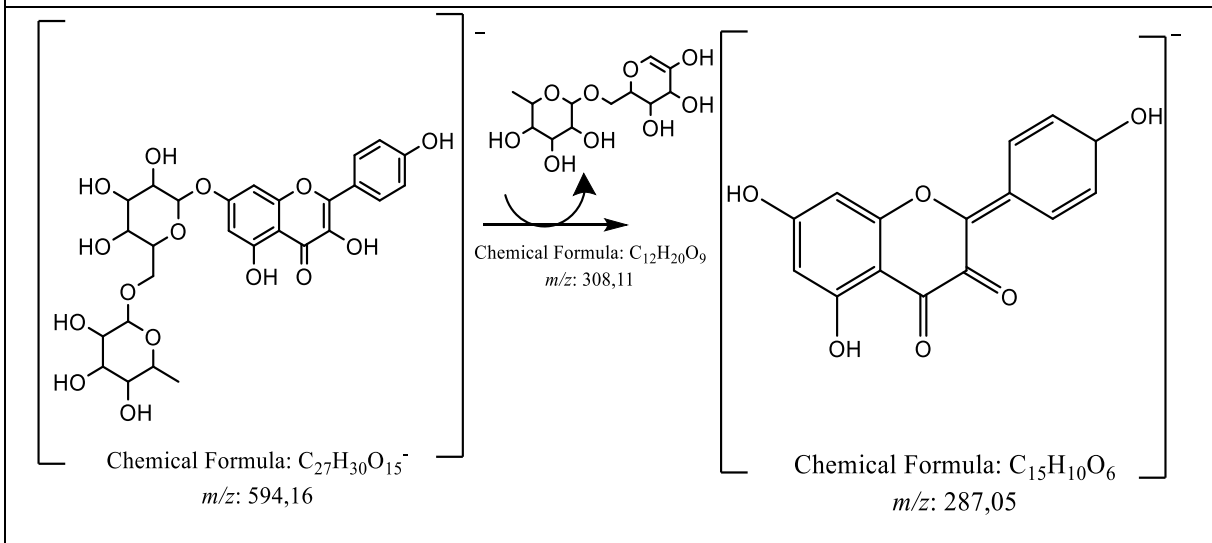
Segundo MABRY *et al.* (1970), os espectros de flavonas e flavonóis exibem dois picos de absorção máximos entre 240-400 nm. Essas duas bandas de absorção são comumente referidas como Banda I (300-380 nm) e Banda II (240-280 nm).

A partir da análise dos espectros de UV, foram selecionados tempos de retenção (TR) que apresentaram esses espectros característicos da classe de flavonoides para posterior análise. Os TR selecionados foram: 3,14 min., 2,99 min., 2,83 min., 2,68 min., 2,73 min., 2,63 min., 2,48 min. e 2,89 min.

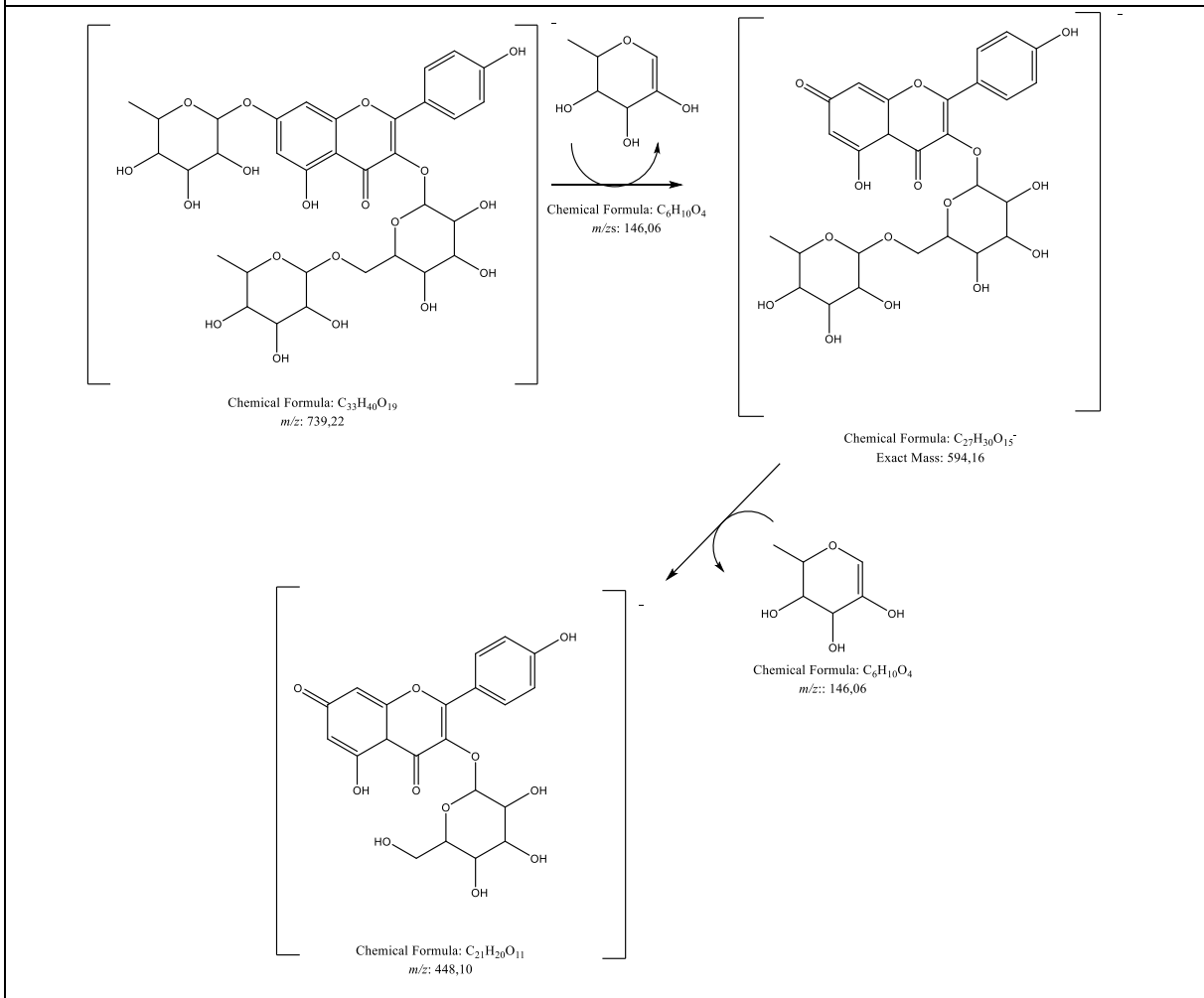
Dessa forma, foram feitas propostas de fragmentação desses flavonoides, conforme esquema abaixo (Figura 17):



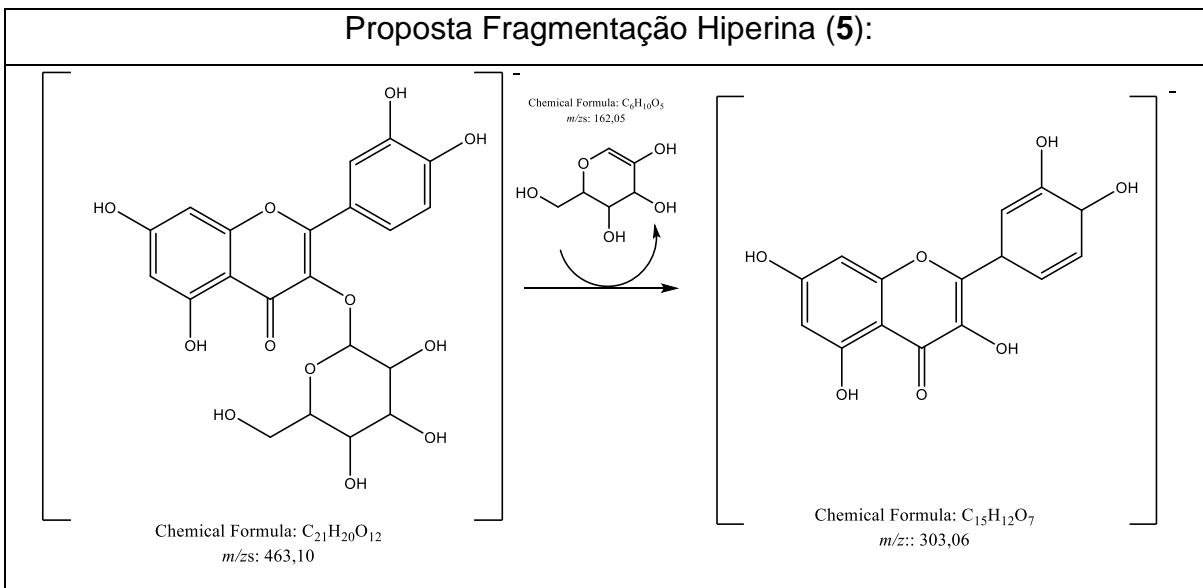
Proposta Fragmentação Caempferol-7-O-rutinosídeo (3):



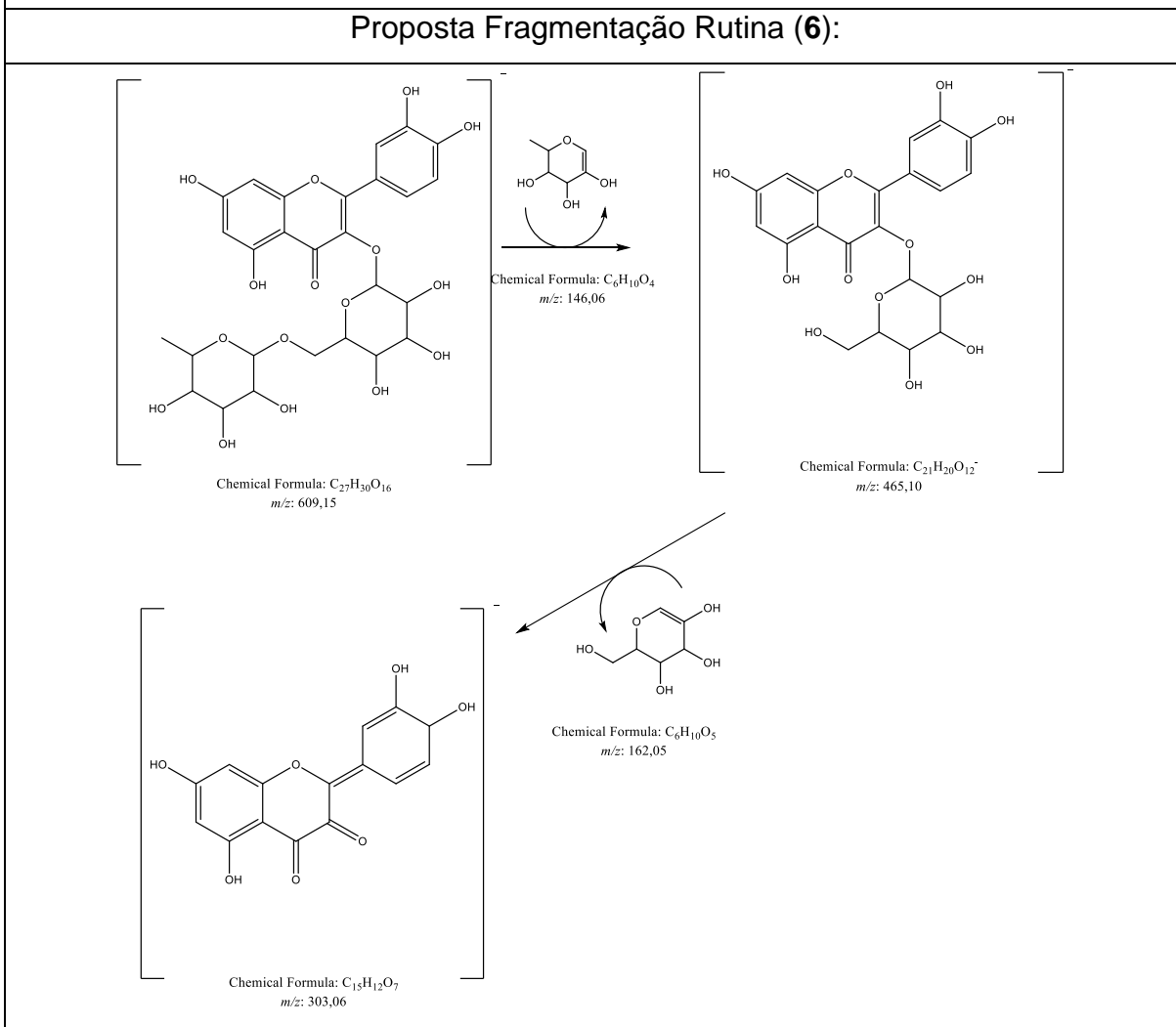
Proposta Fragmentação Robinina (4):



Proposta Fragmentação Hiperina (5):



Proposta Fragmentação Rutina (6):



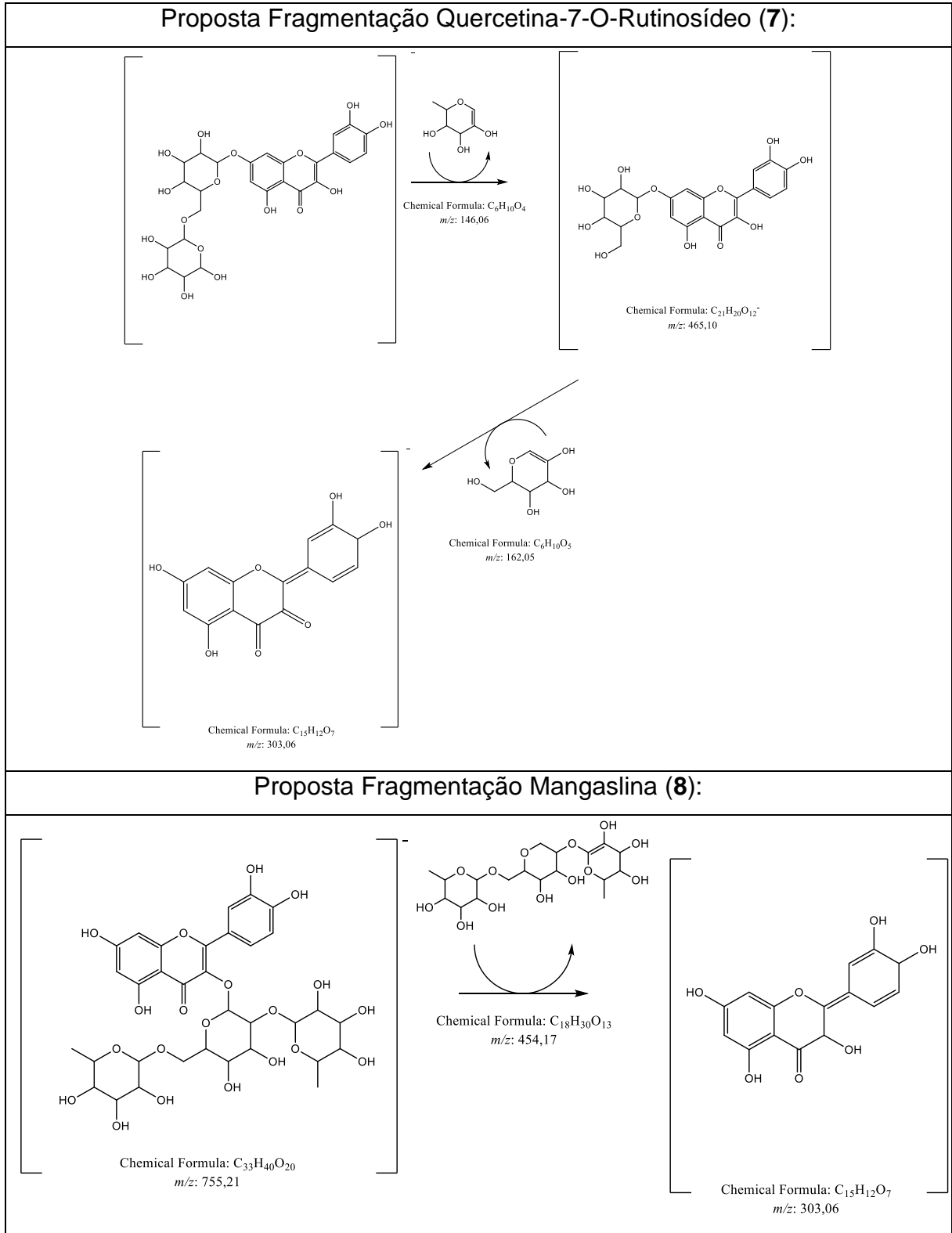


Figura 17: Proposta de fragmentação dos possíveis flavonoides encontrados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de *H. lupulus* L.

As propostas de flavonoides identificados em ambas as análises estão demonstradas abaixo (Tab. 1), bem como as propostas de estruturas (Figura 18).

Tabela 1: Proposta de flavonoides identificados por CLUE-DAD-EM/EM no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de *H. lupulus* L.

Proposta de flavonoide	TR (min)	UVmax (nm)	CLUE-EM (m/z)		Referência
			[M - H] ⁻	[M + H] ⁺ Fragmento	
(1) Astragalina	3,14	265, 345	447	(449) 287	FARAG <i>et al.</i> (2012 ¹)
(2) Nicotiflorina / Caempferol-7-O-rutinosídeo	2,99	256, 352	593	(595) 287	CHADWICK (2004 ¹)
(3) Caempferol-7-O-rutinosídeo / Nicotiflorina	2,83	265, 345	593	(595) 287	NEGRI <i>et al.</i> (2010 ^{1,2})
(4) Robinina	2,68	255, 351	739	741 (595; 449)	SÄGESSER e DEINZER (1996 ^{1*})
(5) Hiperina	2,89	265, 345	463	465 (303)	FANG <i>et al.</i> (2009 ^{2,3})
(6) Rutina / Quercetina 7-O-rutinosídeo	2,73	255, 351	609	611 (303;465)	FARAG <i>et al.</i> (2012 ¹)
(7) Quercetina 7-O-rutinosídeo / Rutina	2,63	264, 345	609	611 (303;465)	SÄGESSER e DEINZER (1996 ^{1*})
(8) Mangaslina	2,48	255, 347	755	757 (303)	NAKAMURA <i>et al.</i> (2018 ⁴)

¹: inflorescências femininas de *H. lupulus*; ²: folhas de *H. lupulus*; ³: caules de *H. lupulus*; ⁴: não especificado; * relatados, mas não identificados.

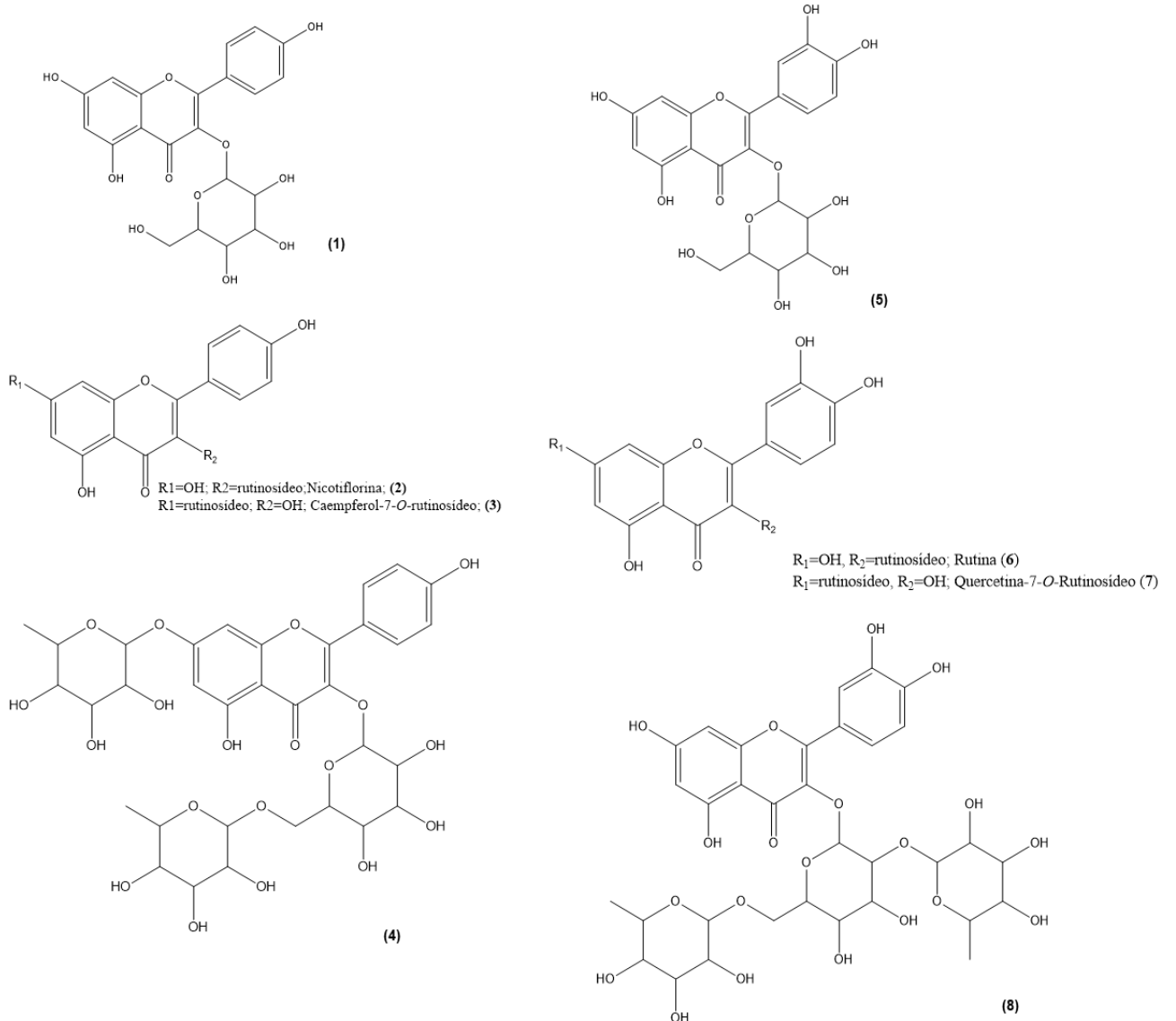


Figura 18: Propostas de estruturas dos possíveis flavonoides identificados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de *H. lupulus* L, por CLUE-DAD-EM/EM.

Os prováveis flavonoides identificados nesse estudo, caempferol-3-O-glicosídeo (astragalina), caempferol-3-O-rutinosídeo (nicotiflorina), caempferol-7-O-rutinosídeo, caempferol 3-robinosídeo-7-ramnosídeo (robinina), quercetina 3-O-galactosídeo (hiperina), quercetina 3-O-rutinosídeo (rutina), quercetina 7-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-(2-ramnosil)-rutinosídeo (mangaslina) corroboram com os

dados de SÄGESSER & DEINZER (1996), que apontam para os principais flavonoides identificados em *H. lupulus*, principalmente em suas inflorescências femininas, as chalconas e flavonoides, como caempferol e quercetina e suas glicosilações, além da quercitrina.

Nesse estudo, os flavonoides foram identificados nas folhas; mas, segundo FERREIRA *et al.* (2008), flavonas e flavonóis não estão presentes apenas nas flores, podendo ser encontrados nas folhas de todas as plantas verdes, protegendo as células contra os raios UV-B (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas das epidermes das folhas e caules, mas permitem a passagem da luz visível, que apresentam as cores fotossinteticamente ativas, azul e vermelho.

É importante destacar que os flavonoides robinina e quercetina 7-O-rutinosídeo, embora tenham suas massas detectadas no estudo realizado por SÄGESSER & DEINZER (1996), por se tratarem de isômeros, esses não foram identificados por esses autores. A identificação foi realizada no presente estudo, e partiu de análises de espectrometria de massas, gerando picos com fragmentos encontrados compatíveis com o banco de dados pesquisado (COLUMBUS, 2007).

5.2.3. Determinação do teor de fenólicos totais:

O reagente de Folin Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (SOUZA *et al.*, 2007). Primeiramente, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, gerando ânions fenolatos. A partir daí ocorre uma reação de oxirredução entre o ânions fenolato e o reagente de Folin, na qual, segundo SINGLETON *et al.* (1999), o molibdênio, componente do

reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para o azul (Figura 19).

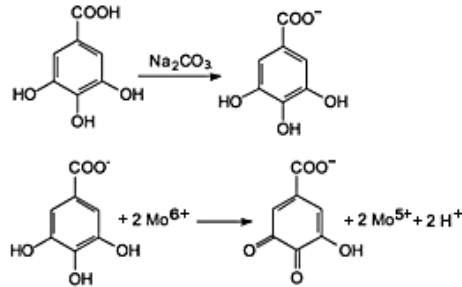


Figura 19: Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteul (Adaptado de SOUZA *et al.*, 2007).

Foi obtida uma curva de calibração, utilizando o padrão de ácido gálico, de onde extraiu-se a equação da reta $y=0,0063x + 0,1277$, $r^2 = 0,9978$. O teor de compostos fenólicos encontrado no EEB foi $75,5053 \pm 8,0443$ mgEAG/g amostra e na HM, o teor foi de $91,8497 \pm 7,2925$ mgEAG/g amostra (Fig. 20).

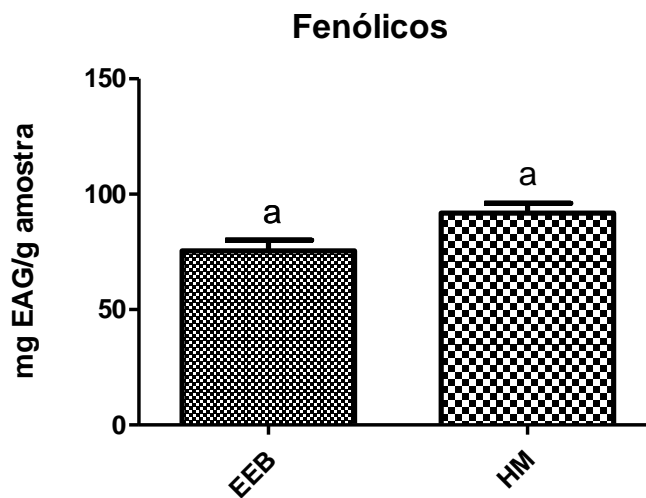


Figura 20: Quantificação de fenólicos totais no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de *Humulus lupulus* L. Resultados apresentados com média \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre as amostras pelo Teste t, $p < 0,05\%$.

Segundo MARSTON & HOSTETTMANN (2006), os compostos fenólicos são encontrados em frações de polaridade média a alta. Dessa forma, não se justifica a dosagem de compostos fenólicos na fração hexânica. Além disso, a metodologia utilizada, adaptada de BONOLI *et al.* (2004), utiliza água para a dosagem, o que gera um precipitado em frações de polaridade baixa, interferindo diretamente na leitura da absorvância, gerando resultados não-confiáveis.

Em um estudo realizado por PROESTOS *et al.* (2006), o teor de compostos fenólicos em folhas liofilizadas de *H. lupulus* adquiridas em comércio na Grécia foi $2,9 \pm 0,1$ mg EAG/g de amostra, inferior ao encontrado nesse estudo. No estudo realizado por PROESTOS *et al.* (2006), o teor de compostos fenólicos foi determinado em amostras compradas em diferentes lugares da Grécia e o método de extração utilizado partiu de amostras extraídas em uma mistura hidrometanólica, que foi acidificada e, em seguida, tratada com nitrogênio e depois filtrada e particionada com acetato de etila.

Diferentes métodos extrativos podem interferir no teor de compostos extraídos. Além disso, diferentes cultivares, formas de cultivo e ambientes podem alterar o teor de compostos fenólicos em lúpulo (CEH *et al.* 2007); por se tratar de produtos do metabolismo secundário, sabe-se da variação de seu teor, uma vez que são produzidos de acordo com a necessidade do organismo produtor (RHODES, 1994).

5.2.4. Determinação do teor de flavonoides totais:

Na reação, o íon alumínio (Al^{3+}) complexa-se com as moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável *FLAVONOIDE- Al^{3+}* de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra (MABRY *et al.*, 1970). Esta complexação promove, em espectroscopia, deslocamento batocrômico e intensificação das absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2013) (Fig. 21).

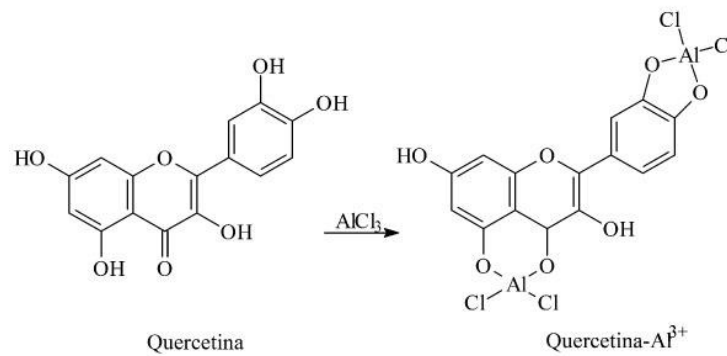


Figura 21: Reação de complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (Adaptada de PEIXOTO SOBRINHO et al., 2013).

A partir da curva de calibração obtida, utilizando o padrão rutina (Fig. 20), extraiu-se a equação da reta $y=0,0094x + 0,0383$, $r^2 = 0,9984$. O teor de flavonoides para o EEB foi de $0,9659 \pm 0,1276$ mgEQR/g amostra e para a fração hidrometanólica foi $4,6712 \pm 0,6747$ mgEQR/g amostra.

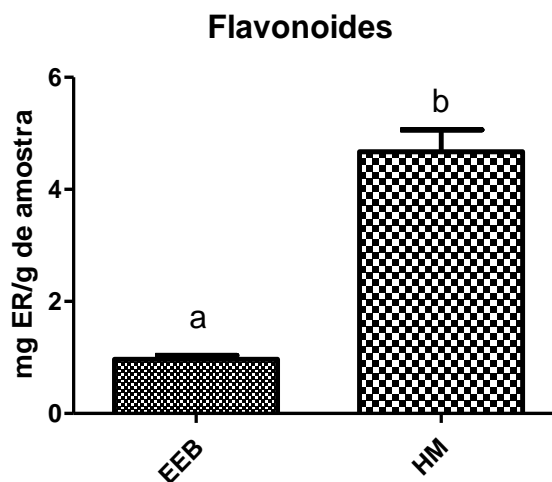


Figura 22: Quantificação de flavonoides totais no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) das folhas de *H. lupulus* L. Resultados apresentados com média \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre as amostras pelo Teste t, $p < 0,05\%$.

Da mesma maneira que explicitado para quantificação de compostos fenólicos totais, os flavonoides são encontrados em frações de polaridade média a alta

(MARSTON & HOSTETTMANN, 2006). Dessa forma, não se justifica a sua dosagem na fração hexânica. ARSENE *et al.* (2015) encontraram valores de $26,46 \pm 2,03$ mg ER/g de amostra, superiores a esse estudo, entretanto, foi utilizado extrato hidroalcoólico de inflorescências do lúpulo coletadas na Romênia. Segundo SIMÕES *et al.* (2010), os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes em outros órgãos da planta ou ainda pode ocorrer o mesmo composto em diferentes concentrações.

5.3. Estudo *in silico* para Predição de Potenciais Atividades Biológicas:

5.3.1. Software *Pass on line*:

Na tabela 2 estão descritos os compostos detectados e suas possíveis atividades biológicas de acordo com o *site Pass on line*. Foram selecionadas atividades com $Pa - Pi > 0,6$ (FILHO *et al.*, 2014).

Tabela 2: Predição *in silico* de potenciais atividades biológicas de constituintes químicos identificados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de *Humulus lupulus* L. utilizando a ferramenta *PASS on line*.

Potenciais Atividades Biológicas	Pa-Pi determinada para os constituintes químicos identificados							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Antibacteriano	0,613	0,678	0,668	0,665	0,611	0,677	0,588	0,702
Antifúngico	0,717	0,786	0,780	0,780	0,714	0,784	0,685	0,805
Antioxidante	0,912	0,924	0,900	0,918	0,917	0,927	0,893	0,934
Antitumoral	0,953	0,978	0,978	0,978	0,967	0,984	0,911	0,990
Antiviral	0,332	0,259	0,259	0,249	0,334	0,263	0,231	0,257
Antiinflamatório	0,747	0,743	0,720	0,734	0,750	0,746	0,623	0,749

5.3.2. Software Active-IT

Para a validação individual, foram utilizados os flavonoides rutina, astragalina e nicotiflorina, pois a hiperina continha apenas um único ensaio, sendo inativo, motivo pelo qual foi excluída da validação individual. Entretanto, essa foi incluída na validação global.

Apesar da nicotiflorina apresentar 5 resultados (4 inativos e um ativo), essa não foi excluída da validação como a hiperina, pois, para ser usada na validação, é necessário possuir ambos os resultados (ativo e inativo), o que não é o caso da hiperina, que apresenta apenas 1 resultado, sendo esse inativo. Entretanto, o número de resultados não é suficiente para produzir uma validação confiável, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3: Sumário dos resultados obtidos na validação usando 3 compostos e também a validação global.

Método	Composto	#Ativos	#Inativos	AUC	MCC max	@Pa-Pi	EF max	@Pa-Pi
SVM	5280805 Rutina	6	151	0.727	0.198	0.029 EF=2.3	3.738	0.686 MCC=0.12
SVM	5282102 Astragalina	4	4	1.000	1.000	0.479	2.000	0.479
SVM	5318767 Nicotiflorina	1	4	1.000	1.000	0.797	5.000	0.797
SVM	Todos	11	160	0.831	0.417	0.686 EF=7.07	7.773	0.722 MCC=0.39
Naive Bayes	5280805 Rutina	6	151	0.821	0.330	-0.478	3.463	-0.478
Naive Bayes	5282102 Astragalina	4	4	0.750	0.775	0.778	1.600	0.778
Naive Bayes	5318767 Nicotiflorina	1	4	0.250	0.25	0.778	1.250	0.778
Naive	Todos	11	160	0.873	0.417	0.778	7.773	0.897

Bayes						EF=7.07		MCC=0.34
-------	--	--	--	--	--	---------	--	----------

Legenda: AUC: área sob a curva; MCC: *Maximum Matthews Correlation*, EF: *Maximum Enrichment Factor*.

O baixo número de resultados da validação da nicotiflorina no Active-IT, quando a ferramenta Naive Bayes foi utilizada (0,25), embora seja importante destacar que não foi um resultado fraco quando utilizada a ferramenta SVM, estão relacionados, ou seja, o valor encontrado (0,25) pode ser atribuído ao baixo número de resultados para a nicotiflorina (1 ativo e 4 inativos). Destaca-se que cada ponto do processo de validação é derivado de um diferente modelo/bioensaio, então, pode ser instável quando se trabalha com um pequeno número de dados. Além disso, existem 4 tipos de validação (3 da validação da substância individualmente e 1 da validação global), para cada método de aprendizado da máquina, totalizando 8 possibilidades, sendo que apenas uma delas não foi bem sucedida. Logo, é importante justificar todos os resultados encontrados, não omitindo o menos promissor. Para as demais substâncias, o AUC variou entre 0,727 e 1,000.

A validação global (Figura 23) produziu valores de AUC entre 0,831 (SVM) e 0,873 (Naive Bayes).

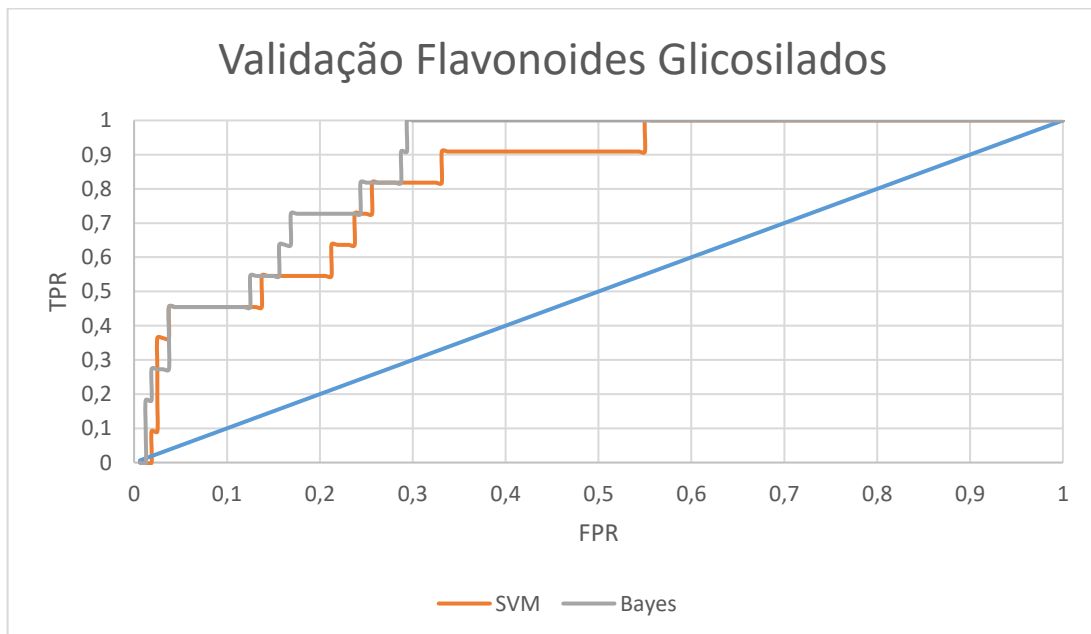


Figura 23: Curva ROC (TPR versus FPR) utilizada na validação dos flavonoides astragalina (1), nicotiflorina (2), hiperina (5) e rutina (6) encontrados no extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (HM) de folhas de *Humulus lupulus* L.

Para estas predições, foram utilizados os valores de corte de 0,7 para o SVM e 0,8 para o Naive Bayes, portanto para cada alvo ou atividade biológica serão considerados apenas os compostos com valor de Pa-Pi predito maior que o valor de corte. Para esses pontos de corte pode-se esperar um valor de Pa-Pi “real” acima de 0,5.

Neste cálculo foram utilizados 1987 modelos de atividade para o SVM e 1925 para o Naive Bayes, todos com AUC de validação maior que 0,5.

Em relação aos compostos avaliados, foram listadas as seguintes atividades, segundo o *PubChem* (Tabela 4), destacando que, para realizar as predições é necessário que as estruturas 3D e suas conformações estejam disponíveis no *PubChem*. Este não foi o caso dos compostos robinina (CID=5281693) e mangaslina (CID=11498684). Para estes compostos o excessivo número de ligações simples não permite, de acordo com o protocolo do *PubChem*, que as suas conformações sejam calculadas. Deste modo, apenas 7 compostos foram submetidos ao sistema Active-IT para a realização das predições:

Tabela 4: Atividades dos compostos avaliados, segundo o *PubChem*.

Substância	CID*/ Bioensaios	Doenças descritas no <i>PubChem</i> ¹	Alvos descritos no <i>PubChem</i> ²
------------	---------------------	--	---

<p>Astragalina (1)</p>	<p>5282102/ Todos (549) Ativo (50) Inativo (393) Active-IT: 8 modelos</p>	<p>Inflamação, câncer, diabetes mellitus, dermatite, hepatite, doenças cardiovasculares, edema, hiperglicemia, úlcera, asma, neoplasias de mama, carcinoma hepatocelular, hipoglicemia, infecção, isquemia, intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2, hipersensibilidade, doenças do fígado, obesidade, lesões de tecidos moles.</p>	<p>Fator de necrose tumoral, interleucina 6, akt serina/treonina quinase 1, regulação da apoptose, insulina, inositol-3-fosfato sintase 1, catalase, interleucina 4, lipase g, tipo endotelial, interleucina 13.</p>
<p>Nicotiflorina (2)</p>	<p>5318767/ Todos (570) Ativo (17) Inativo (493) Active-IT: 5 modelos</p>	<p>Neoplasias, diabetes mellitus, isquemia, dor, edema, infarto, inflamação, obesidade, hipóxia, isquemia cerebral, hipertensão, hipoglicemia, infecção, manifestações neurológicas, derrame, desordens das plaquetas sanguíneas, neoplasias da mama, calosidades, desordens cerebrovasculares, dermatite, diabetes mellitus tipo 2, febre.</p>	<p>Inositol-3-fosfato sintase 1, receptor ativado pelo proliferados de peroxissoma α, caspase 3, insulina, lipase pancreática, α-glicosidase, ácido, tirosinase, fator de necrose tumoral, akt serina/treonina quinase 1, interleucina 6.</p>

<p>Caempferol 7-O- rutinosídeo (3)</p>	<p>102225228/ Nenhum bioensaio</p>	<p>Nenhuma doença descrita</p>	<p>Farnesil difosfato sintase, golgin b1, limoneno-3- hidroxilase, mentofuransintase, pulegonaredutase.</p>
<p>Robinina (4)</p>	<p>5281693/ Nenhum Bioensaio</p>	<p>Neoplasias de mama, neoplasias, albinismo, delírio de abstinência alcoólica, alcoolismo, anemia, artrite, neoplasias colorretais, diabetes mellitus, doenças do coração, inflamação, linfoma, sífilis, intolerância a glicose, carcinogênese, cardiotoxicidade.</p>	<p>Fator de necrose tumoral, interleucina 6, insulina, receptor 1 do interferon λ, inibidor 2a de quinase dependente de ciclina, proto- oncogene, subunidade nf-kb, granzima b, inositol-3-fosfato sintase 1, proteína tumoral p53.</p>

<p>Hiperosideo (5)</p>	<p>5281643/ Todos (457) Ativo (63) Inativo (267) Active-IT: 1 modelo</p>	<p>Inflamação neoplasias, diabetes mellitus, deosordens de depressão, edema, hiperglicemia, doenças cardiovasculares, hepatite, dor, hipertensão, infecção, doenças dos rins, isquemia, doenças do fígado, complicações do diabetes, diabetes mellitus tipo 2, nefropatias diabéticas, aterosclerose, danos de reperfusão, doenças hepáticas induzidas por químicos e fármacos, neoplasias do cólon, doenças do coração, hemólise, hipotensão, obesidade, diarreia, desordens mentais, perda de peso, infecções, doenças autoimunes, doenças transmissíveis, doenças renais, neoplasmas, infecções do trato urinário, ganho de peso, sepse, fraqueza muscular, síndrome metabólica, deficiência da lipase ácida lisossomal.</p>	<p>Fator de necrose tumoral 1, caspase 3, bcl2, regulador de apoptose, interleucina 6, catalase, insulina, heme-oxigenase 1, akt serina/treonina quinase 1, caspase 9, proteína quinase mitogênese-ativada.</p>
----------------------------	--	---	---

Rutina (6)	5280805/ Todos (1.792) Ativo (135) Inativo (1.194) Active-IT: 160 modelos	Neoplasias, inflamações, diabetes mellitus, edema, carcinogênese, doenças cardiovasculares dor, câncer de mama, doenças renais, hipertensão, infecção, doenças neurodegenerativas, aterosclerose, albinismo, necrose, obesidade, isquemia, doença de Alzheimer, câncer de cólon, hepatite, hiperglicemia, danos hepáticos induzidos por químicos e medicamentos, carcinoma hepatocelular, trombose	Fator de necrose tumoral, catalase, interleucina 6, caspase 3, albumina, insulina, akt seina treonina quinase 1, inositol 3-fosfato sintase, bcl2, regulador de apoptose, mieloperoxidase
Mangaslina (8)	11498684/ Nenhum bioensaio	Cardiomegalia, hipertensão, malária	Fator de necrose tumoral, acetilcolineterase.

*CID: *compound identifier database* (identificador do banco de dados do *PubChem* referente às substâncias estudadas e às suas atividades em ensaios biológicos). ¹Chemical Disease Co-occurrences. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282102#section=Chemical-Disease-Co-Occurrences-in-Literature&fullscreen=true>. ²Chemical Gene Co-occurrences. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282102#section=Chemical-Gene-Co-Occurrences-in-Literature&fullscreen=true>.

Nas Tabelas A1 e A2 (ver anexo II) estão listados os 50 melhores modelos para o SVM e o Naive Bayes, ordenados de acordo com o melhor *ranking* obtido tanto para os modelos isolados (número de compostos com *score* acima do corte nos modelos

(posição 4 em 800), leucemia mieloide aguda (posição 10 em 800); neuroblastoma (posição 44 em 800); linhagem celular de câncer hepático humano, HEPG-2 (posição 47 em 800); fibroblasto murino (posição 7 em 800); fibroblasto humano (posição 13 em 800) e tecido conjuntivo subcutâneo (posição 17 em 800). A tabela abaixo (Tab. 5) relaciona uso etnofarmacológico de *H. lupulus*, atividade biológica dos extratos e compostos isolados e atividades preditas utilizando o *software* Active-IT.

Tabela 5: Uso etnofarmacológico de *H. lupulus*, atividade biológica dos extratos e compostos isolados e atividades previstas utilizando o software Active-IT.

Estudos	Uso etnofarmacológico, atividade biológica e atividades previstas	Referência
Uso etnofarmacológico	Lepra, mau odor dos pés, constipação e purificação sanguínea, ansiedade, insônia, estimulante de apetite, dispepsia, doenças pulmonares e tuberculose.	Karabín <i>et al.</i> (2015) and Karabin <i>et al.</i> (2016).
Atividades biológicas descritas na literature	Sedativo, atividade estrogênica e relacionada à osteoporose, antimicrobiano, anti-inflamatório, antiproliferativo e antitumoral, neuroproteção, incluindo sangramento cerebral, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, inibição da obesidade, estimulante gástrico, alergias.	Bocquet <i>et al.</i> (2018)
Atividades biológicas previstas utilizando os dois métodos de aprendizado	Atividade	
	Antitumoral	Linhagem celular A549, adenocarcinoma hepático humano (4/800), leucemia mieloide aguda (10/800), RECQ-1 (16/800), SWI/SNF (27/800), leucemia aguda – relacionada ao BCL2 (31/800), histona H2A.x (33/800), <i>GLI family zinc finger 1</i> (35/800), retinoblastoma-relacionado à proteína 9 -RBBP9 (41/800), leucemia (42/800), antígeno tumoral celular (44/800), neuroblastoma (44/800), HEPG-2 (47/800)
	Citotoxicidade/genotoxicidade	Fibroblasto murino (7/800), fibroblasto humano (13/800), tecido conjuntivo subcutâneo (17/800), carcinogênico (34/800), genotoxicidade ATAD-5 (36/800)
	Anti-parasitário	<i>Tripanossoma</i> (2/800), <i>Plasmodium falciparum</i> (3/800), <i>Caenorhabditis elegans</i> (20/800)
	Anti-inflamatório	NF-Kappa β (5/800), TLR-2 (21/800), receptor fMet-Leu-Phe (25/800); receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (28/800)
	Antimicrobiano	<i>Salmonella typhimurum</i> (12/800), <i>Staphylococcus aureus</i> (23/800), <i>Candida albicans</i> (37/800)
	Vírus	<i>Herpes simplex</i> (18/800), HIV-1 (19/800), hepatite C (32/800)
	Cardiovascular/coagulação	Cadeia β do fibrogênio (15/800), PDI (26/800), proteína 3 (39/800)

	Endócrina	Esteróide Coativador Receptor 3- SRC-3 (50/800)
--	-----------	---

Os números em parênteses indicam a posição na classificação em 800 classes de atividades.

É importante destacar que, sob a mesma prerrogativa do PASS *on line*, o sistema Active-IT é baseado na combinação de ferramentas derivadas de bioensaios publicados. Entretanto, enquanto o PASS *on line* reúne os dados de publicações diferentes ao longo de vários anos, a maioria dos dados do Active-IT são provenientes de banco de dados de bioensaios do PubChem. Uma outra diferença relevante é a escolha dos descritores: fragmentos 2D no PASS *on line* e potenciais farmacóforos 3D no Active-IT. Dessa forma, justifica-se a escolha dos dois programas para uma melhor avaliação do potencial *in silico* das substâncias identificadas no EEB e HM de folhas de *H. lupulus*.

5.4. Avaliação da Capacidade Sequestrante de Radical DPPH:

O método DPPH• é baseado na captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 518 nm. O DPPH é um radical livre estável que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (QUINTÃO et al., 2013) (Fig. 25).

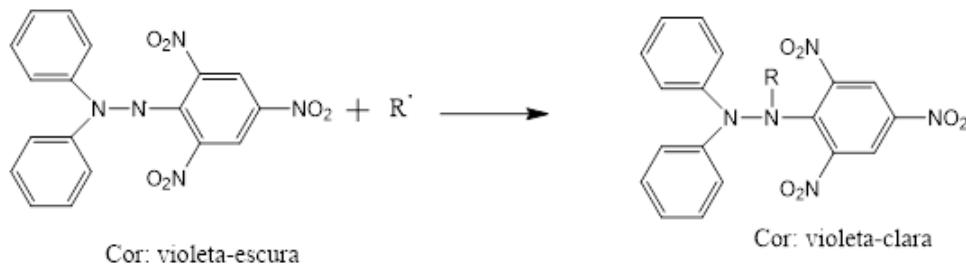


Figura 25: Reação do DPPH com a espécie reativa (Adaptada de OLIVEIRA, 2015).

Na avaliação da capacidade antioxidante dos constituintes do extrato etanólico bruto e frações da folha de *H. lupulus*, os resultados foram expressos em porcentagem de inibição X concentração em $\mu\text{g/mL}$. Para o cálculo do CE_{50} foi utilizada a equação da reta $y=0,2781x + 13,098$, $r^2=0,9041$ para o EEB, $y=0,0844x + 1,3428$, $r^2=0,8887$ para a FH e $y=0,3425x + 12,399$, $r^2=0,8985$ para a HM, resultando em 132,69 $\mu\text{g/mL}$, 576,5 $\mu\text{g/mL}$ e 125,87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Fig. 26).

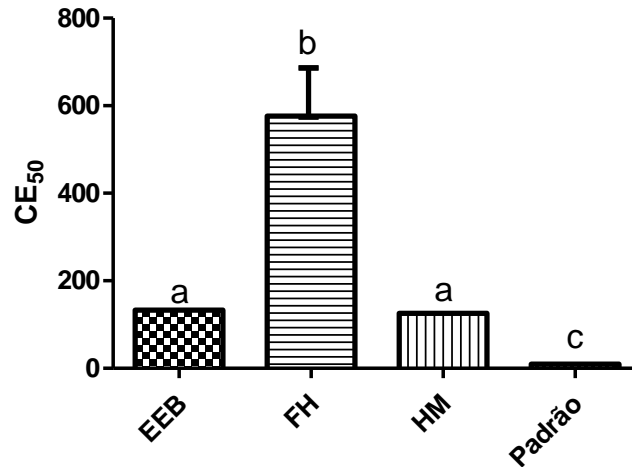


Figura 26: Capacidade sequestrante de radical DPPH do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) das folhas de *Humulus lupulus* L. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre as amostras pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

ABRAM *et al.* (2015) determinaram a atividade antioxidante do sobrenadante do extrato etanólico de folhas de lúpulo, obtido por aquecimento a 60°C, em agitação por 24h. O lúpulo foi cultivado na Eslovênia, Áustria, Alemanha e República Tcheca. Utilizou-se o método de redução do radical DPPH, apresentando uma maior atividade antioxidante (CE₅₀ 70 µg/ml) do que as médias dos valores encontrados no presente estudo (132,69 µg/mL, 576,5 µg/mL e 125,87 µg/mL, para o EEB, FH e HM, respectivamente).

Coletas de diferentes ambientes e variadas épocas do ano refletem diretamente no teor de compostos fenólicos e flavonoides como no teor de outros compostos do metabolismo secundário, que são sintetizados conforme necessidade do organismo produtor (SIMÕES *et al.* 2000). Como os compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais geralmente são provenientes do metabolismo secundário, e esses são produzidos em condições de estresse (SIMÕES *et al.* 2000), esse resultado poderia ser justificado pela diferença da época em que as folhas foram coletadas, tempo de vida da planta, variações climáticas, de solo e diferentes técnicas agrícolas aplicadas.

Lembrando que o lúpulo tem uma adaptação difícil ao clima brasileiro, por necessitar de baixas temperaturas e de um tempo de exposição à luz variado (EBY,

2011), oscilando entre nove e quatorze horas diárias, o que também não ocorre no território brasileiro. Logo, como esse estudo foi realizado com folhas cultivadas no sul de Minas Gerais, a espécie pode ter sofrido adaptações ao clima e solo brasileiros.

5.5. Teste de Citotoxicidade:

A citotoxicidade do EEB, FH e HM em células tumorais T24 e não tumorais MRC5 foram avaliadas 24 horas após o início do tratamento. O ensaio do XTT para avaliar a viabilidade celular tem como princípio a atividade mitocondrial, onde é utilizado para determinar a viabilidade celular em função do seu potencial redox. O princípio da técnica é baseado na clivagem do sal de tetrazólio amarelo por células viáveis em formazan, de cor alaranjada (KOBAN *et al.*, 2012).

Através do resultado encontrado (Fig. 27), observou-se que após 24h de tratamento, os extratos foram citotóxicos frente a células tumorais da linhagem T24 e estimularam o crescimento de células não tumorais MRC5. EEB e HM estimularam o crescimento celular em MRC5 a partir de 25,0 µg/mL, apresentando alta viabilidade celular mesmo nas mais altas concentrações testadas (565%, para EEB e 296%, para HM). A FH estimula o crescimento celular a partir de 25,0 µg/mL até 200,0 µg/mL ($CE_{50}=1028,80$ µg/mL). EEB reduz a viabilidade celular da linhagem T24 próximo a 800 µg/mL ($CE_{50} = 600,82$ µg/mL); FH e HM reduzem o crescimento celular de T24 a 1200 µg/mL, apresentando valores de CE_{50} acima de 1200 µg/mL (74%) e 1139,01 µg/mL, respectivamente. O EEB foi capaz de reduzir a viabilidade de células da linhagem T24 a partir de 800 µg/mL e a fração HM, a partir de 1200 µg/mL. A FH reduziu a viabilidade celular da linhagem T24 a partir de 400 µg/mL. Logo, em relação às células da linhagem MRC5, o EEB e a fração HM induziram o crescimento celular a partir de 25 µg/mL, corroborando com a hipótese de citotoxicidade seletiva, importante na pesquisa de produtos alternativos ao tratamento de diversas doenças. Entretanto, a FH reduziu a viabilidade celular de células não tumorais a partir de 400 µg/mL.

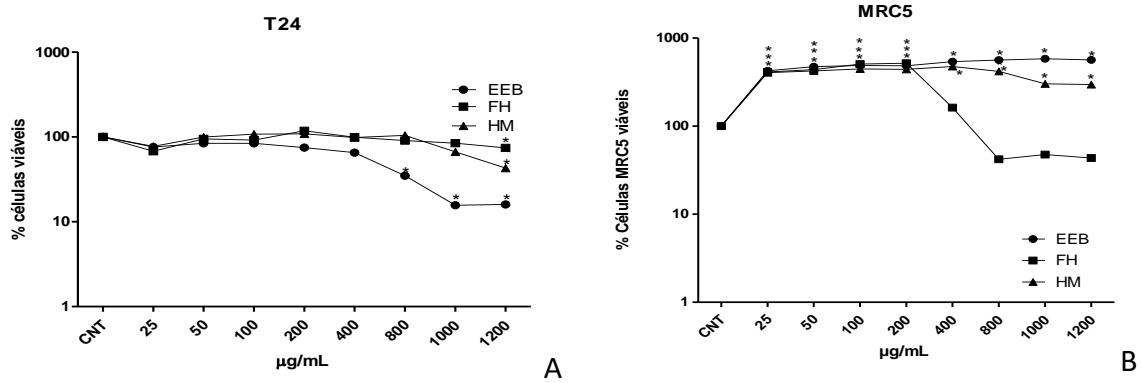


Figura 27: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de *Humulus lupulus* L. Cada ponto representa a média do experimento em triplicata. ($p < 0,05$). 27a: Linhagem T24; 27b: Linhagem MRC5.

A viabilidade celular de células de melanoma humano foi avaliada por meio do marcador de morte celular o azul de Trypan, que não possui a capacidade de atravessar membranas íntegras. Dessa forma, células vivas não adquirem nenhuma coloração e se procede a contagem de células mortas. Com esse experimento, foi possível obter como resultado o gráfico abaixo (Fig. 28). Como é possível observar, apenas a FH foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% na concentração de 500 µg/mL, embora EEB e HM também apresentem diferenças estatísticas em relação ao controle, na concentração de 500 µg/mL. Entretanto, em 100 µg/mL, não foi possível alcançar o CE_{50} , mostrando que tanto o EEB quanto as frações são citotóxicas para células tumorais da linhagem SK-mel-147 apenas em concentrações mais altas.

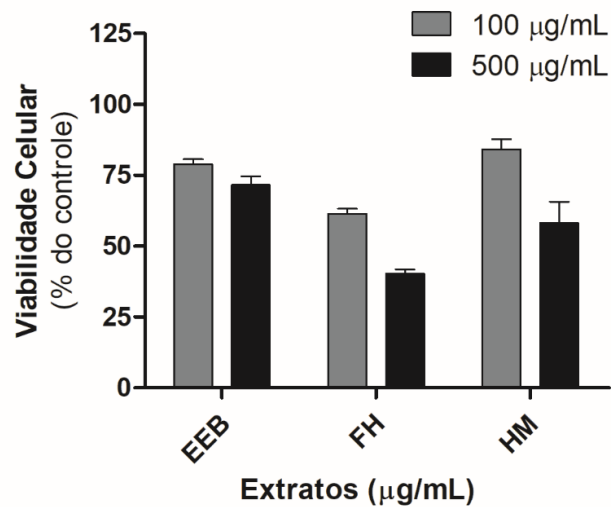


Figura 28: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem SK-mel-147, 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de *Humulus lupulus* L.

Após tratamento com EEB, FH e HM, foi avaliada a citotoxicidade da linhagem celular SK-mel-147, comparando sua citotoxicidade em células não tumorais de epitélio humano (HaCat). Como marcador de morte celular, utilizou-se o vermelho neutro (hidroclorato de 3-amino-7-di-metilamino-2-metilfenazina), solúvel em água, fracamente catiônico, que atravessa a membrana plasmática intacta e se concentra em lisossomas de células viáveis. Sua entrada ocorre por micropinocitose com subsequente fusão com vesículas de lisossomas secundários (HAMMOND *et al.*, 1980) ou por difusão não-iônica e subsequente ligação aos grupos aniônicos carboxílicos ou fosfóricos na matriz lisossomal (HAMMOND *et al.*, 1980; JACQUES, 1973).

Os resultados obtidos estão expressos na figura a seguir (Fig. 29). O EEB reduziu a viabilidade de células tumorais e não-tumorais próximo aos 500 µg/mL, não apresentando seletividade. A FH apresentou maior citotoxicidade frente às células tumorais. A fração HM foi mais citotóxica frente à linhagem de células não tumorais.

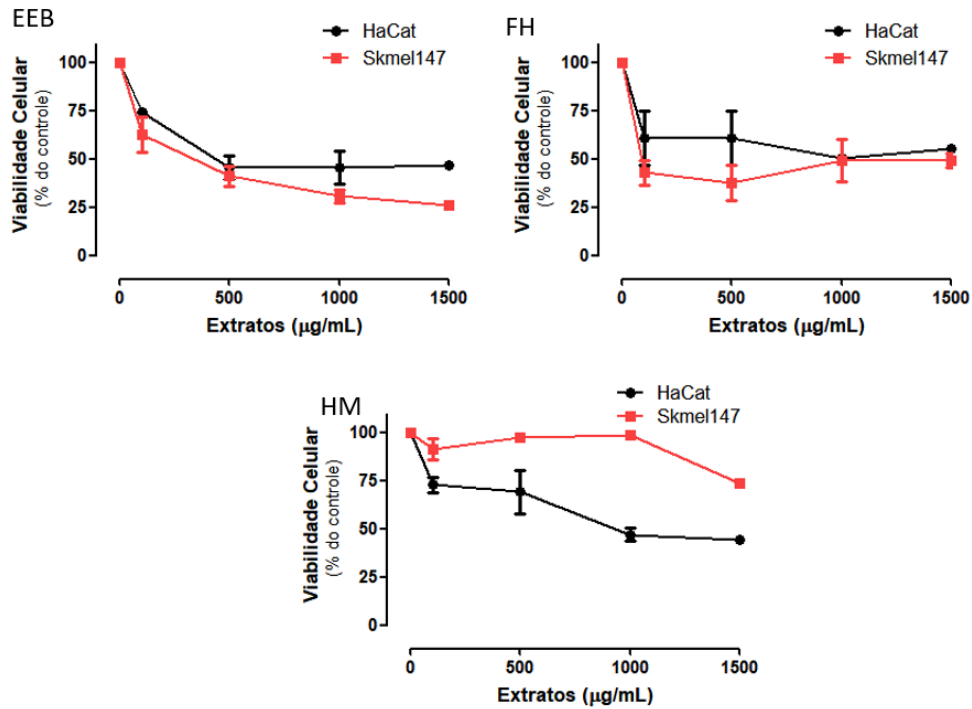


Figura 29: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens SK-mel-147 e HaCat 24 horas após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (FH) e hidrometanólica (HM) de folhas de *Humulus lupulus* L.

ZANOLI & ZAVATTI (2008) relataram a atividade antitumoral de chalconas preniladas e α e β -ácidos do lúpulo. A chalcona prenilada xantohumol se destaca nessa atividade por inibir *in vitro* a iniciação, promoção e progressão de estados de carcinogênese, além de aparentar ser um agente quimiopreventivo de amplo espectro (STEVENS & PAGE, 2004; GERHAÜSER, 2005a; COLGATE *et al.*, 2007). ALBINI *et al.* (2006) demonstraram em modelo murino que o xantohumol é forte inibidor da angiogênese em tumores em modelo murino, quando administrado juntamente com a água, na concentração de 2 μ M. Em concentração maior, 200 μ M, o xantohumol inibiu a angiogênese nesse mesmo modelo animal, sem efeitos adversos nos parâmetros testados. A administração oral de xantohumol a 20 μ M inibiu significativamente o crescimento de células tumorais KS-IMM (linhagem de sarcoma de Kaposi) em machos do mesmo modelo animal, a partir do vigésimo dia de tratamento. A inibição da angiogênese e crescimento do tumor (33% e 83%, respectivamente, em comparação aos controles), foi observada em um estudo realizado por GERHAÜSER

(2005a) em fêmeas imunodeficientes com tumor de mama e tratadas com 1 g/kg peso corporal por dia por 14 dias.

Apesar da atividade antitumoral dos flavonoides ter sido descrita anteriormente embasada nos estudos *in silico*, as atividades encontradas nos extratos EEB e HM foram baixas. Entretanto, é necessário ter em mente que as predições foram realizadas com substâncias isoladas, enquanto que nos experimentos realizados nesse estudo foram utilizados extrato bruto e frações, o que explica as diferenças nos resultados encontrados.

Na sequência, foi avaliado o ciclo celular em células das linhagens T24 e MRC5 tratadas com EEB e HM, a fim de compreender se as variações na replicação celular observada ocorrem devido a interferências no ciclo celular e em qual fase acontece.

5.6. Análise de Ciclo Celular:

O efeito do EEB e da HM sobre o ciclo celular foi avaliado através da marcação com iodeto de propídeo e quantificação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo. O EEB não causa morte celular da linhagem T24, mesmo após 24 horas de tratamento com doses de 800,0 µg/mL. De acordo com esses dados, a redução da viabilidade celular, envolve mecanismos que não induzem morte celular por interferência no ciclo celular. No tratamento com HM, o número de células da linhagem T24 observado na fase G2/M, 24 horas após tratamento, com concentrações a partir de 200,0 µg/mL diminui, parando na fase S, possivelmente interferindo na replicação do DNA (Fig. 30). O tratamento com EEB e HM estimula a proliferação celular da linhagem MRC5, sem interferência no ciclo celular, não aumentando o conteúdo sub-G1 (Fig. 31).

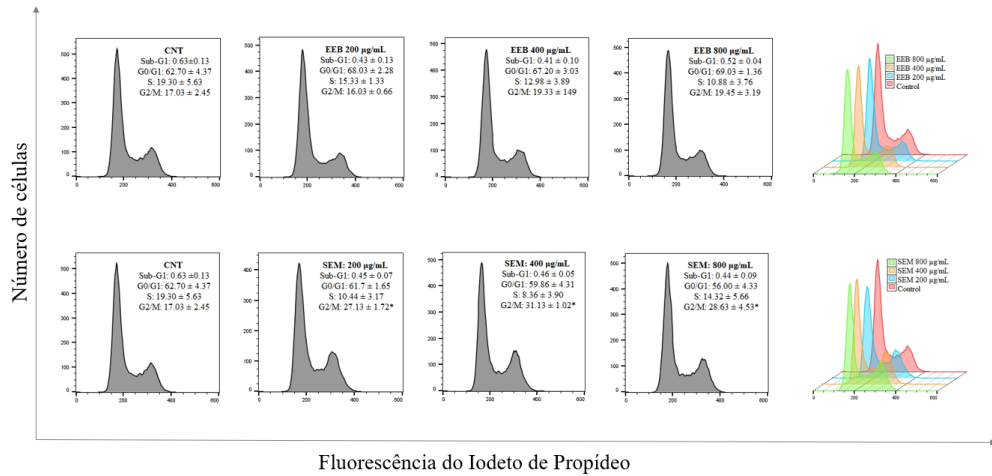


Figura 30: Porcentagem de células T24 nas fases mitóticas G1, S e G2M, após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (SEM) de folhas de *H. lupulus* L. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão da triplicata.

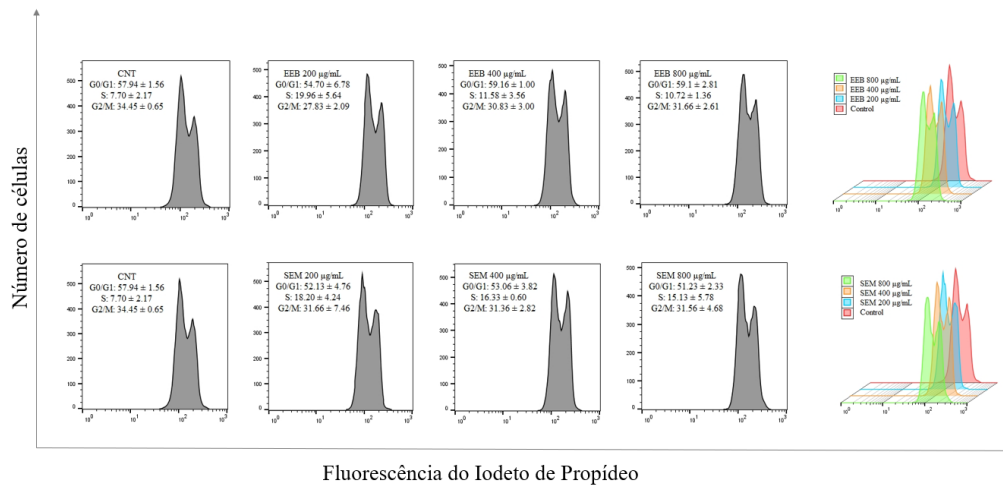


Figura 31: Porcentagem de células MRC5 nas fases mitóticas G1, S e G2M, após tratamento com extrato etanólico bruto (EEB) e fração hidrometanólica (SEM) de folhas de *H. lupulus* L. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão da triplicata.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos através dos experimentos realizados, é importante considerar o potencial biológico observado nas folhas de *Humulus lupulus*, demonstrado através de ferramentas de estudo *in silico* e *in vitro*. Por se tratar de um estudo exploratório, esses resultados agregam valor ao cultivo do lúpulo, sobretudo o cultivado no Brasil, que, além de atender às expectativas de produtores de cerveja artesanal que objetivam a produção de uma cerveja genuinamente brasileira, trazem dados relevantes acerca desse subproduto agrícola.

Logo, pode-se concluir que as folhas de lúpulo produzidas no Brasil possuem teores relevantes de compostos fenólicos e flavonoides, podendo ser fonte de moléculas bioativas, potencial atividade antioxidante, seletividade quando se diz respeito à sua atividade antitumoral e desperta interesse em formas diferentes de veiculação de seus extratos e/ou substâncias isoladas de forma a potencializar suas ações biológicas.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAM, V. ĀEH, B. VIDMAR, M. HERCEZI, M., LAZIĆ, N., BUCIK, V., MOĀZINA, S. S., KOĀSIR I. J., KAĀC, M., DEMĀSAR, L., ULRIH, N. P. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hopleaves and hop cones. *Industrial Crops and Products* 64. 124–134. 2015.
- ALBINI, A., DELL'EVA, R., VEN'E, R., FERRARI, N., BUHLER, D.R., NOONAN, D.M., FASSINA, G. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *The FASEB Journal* 20, 527–529. 2006.
- ALMAGUER, C., SCHÖNBERGER, C., GASTL, M., ARENDT, E. K., & BECKER, T. *Humulus lupulus*- a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. 2014.
- ALMEIDA, T.C., GUERRA, C.C.C, ASSIS, B.L.G, SOARES, R.D.O.A., GARCIA, C.C.M., LIMA, A.A., SILVA, G.N. Antiproliferative and Toxicogenomic Effects of Resveratrol in Bladder Cancer Cells With Different *TP53* Status. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60:740-751. 2019.
- ANDERSON, H. E., SANTOS, I. C., HILDENBRAND, Z. L., SCHUG, K. A. A Review of the Analytical Methods used for Beer Ingredient and Finished Product Analysis and Quality Control. *Analytica Chimica Acta*, 2009.
- APROLÚPULO – MANUAL DE BOAS PRÁTICAS PARA CULTIVO DO LÚPULO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE LÚPULO. LAHNEL, N. M., FAGHERAZZI, M. M. 2019.
- ARSENE, L., RODINO, S., BUTU, A., PETRACHE, P., IORDACHE, O., BUTU, M. Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. *Farmacia*. 63(6): 851-857. 2015.
- BEHRE, K.-E. The history of beer additives in Europe — A review. *Vegetation History and Archaeobotany*, 8(1-2), 35–48. 1999.
- BERTL, E., KLIMO, K., HEISS, E., KLENKE, F., PESCHKE, P., BECKER, H., EICHER, T., HERHAUS, C., KAPADIA, G., BARTSCH, H., GERHÄUSER, C. Identification of novel inhibitors of angiogenesis using a human *in vitro* anti-angiogenic assay. *International Journal of Cancer Prevention* 1, 47–61. 2004.

- BLUMENTHAL, M. The Complete German Commission E Monograph: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council, Austin, TX. 147p. 1998.
- BLUMENTHAL, M., GOLDBERG, A., BRINCKMANN J. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Integrative Medicine Communications, Newton, MA, pp. 297–303. 2000.
- BOCQUET, L., SAHPAZ, S., HILBERT, J.L., RAMBAUD, C., RIVIERE, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochem. Rev.* 17: 1047–1090. 2018.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington. v. 52, n. 16, 5195-5200 p. 2004.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 546 p. vol.1., 2010.
- BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 126 p. 2011.
- CEH, B., KAČ, M., KOŠIR, I.J., ABRAM, V. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *Int. J. Mol. Sci.* v. 8, 989-1000p. 2007.
- CHADWICK, L.R. Estrogens and congeners from spent hops. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Illinois. Chicago, IL: Ph.D. dissertation. 2004.
- CHADWICK, L.R., PAULI, G.F., FARNSWORTH, N.R., The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 13, 119–131. 2006.
- CHANG, C.C, YANG, M.H, WEN, H.M., CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* v. 10, 178-182p. 2002.

- CHANG, C.C., LIN, C.J. LIBSVM: A Library for Support Vector Machines. ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology, 2:27:1-27:27. [accessed 2019 Oct 1st]. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>. 2011.
- COLGATE, E.C., MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F., BRAY, T.M., HO, E., Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. Cancer Letters. 246, 201–209. 2007.
- COLGATE, E.C., MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F., BRAY, T.M., HO, E., Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. Cancer Letters. 246, 201–209. 2007.
- COLUMBUS, O.H. SciFinder Scholar, version 2007; Chemical Abstracts Service: 2007.
- DE KEUKELEIRE, J., JANSSENS, I., HEYERICK, A., GHEKIERE, G., CAMBIE, J., ROLDAN-RUIZ, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE KEUKELEIRE, D. Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 61–66. 2007.
- DE KEUKELEIRE, J., JANSSENS, I., HEYERICK, A., GHEKIERE, G., CAMBIE, J., ROLDAN-RUIZ, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE KEUKELEIRE, D. Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 61–66. 2007.
- DE KEUKELEIRE, J., OOMS, G., HEYERICK, A., ROLDAN-RUIZ, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE KEUKELEIRE, D. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 4436–4441. 2003.
- DE KEUKELEIRE, J., OOMS, G., HEYERICK, A., ROLDAN-RUIZ, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE KEUKELEIRE, D. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 4436–4441. 2003.

- DEL VALLE, J. M., RIVERA, O., TEUBER, O., & PALMA, M. T. Supercritical CO₂ extraction of Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003.
- DEL VALLE, J. M., RIVERA, O., TEUBER, O., & PALMA, M. T. Supercritical CO₂ extraction of Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003.
- DELMULLE, L., BELLAHC`ENE, A., DHOOGHE, W., COMHAIRE, F., ROELENS, F., HUVAERE, K., HEYERICK, A., CASTRONOVO, V., DEKEUKELEIRE, D. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine* 13, 732–734. 2006.
- DELMULLE, L., VANDEN BERGHE, T., DE KEUKELEIRE, D., VANDENABEELE, P., Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) induces a caspase independent form of cell death. *Phytotherapy Research* 22, 197–203. 2008.
- DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, 2009.
- DE WINTER, H., LOPES, J.C.D. Reply to the comment made by Šicho, Vor'silák and Svozil on 'The Power metric: A new statistically robust enrichment-type metric for virtual screening applications with early recovery capability'. *J. Cheminform.* 2018.
- DUKE, J.A., *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton. EMEA 2007. 1985. 8.
- EBY, S. Hops, *Humulus lupulus* an investigation of agricultural practices and how producers are linked with business networks and consumers. Ontário: Nuffield Canada. 58 p. 2011.
- EHRMAN, T.M., BARLOW, D.J., HYLANDS, P.J. Phytochemical databases of Chinese herbal constituents and bioactive plant compounds with known target specificities. *J Chem Inf Model.* 47: 254-63. 2007.
- FANG, W., XIONG, J., XING, Y., XI, T. *In Vitro* Anticancer Activities of Different Extraction Parts from the Stems and Leaves of *Humulus lupulus* L. and

- Identification of the Chemical Constituents Therein. Progress in Pharmaceutical Sciences. China. 2009.
- FARAG, M.A., PORZEL, A., SCHMIDT, J., WESSJOHAN, L.A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*. Volume 8, Issue 3, pp 492–507. 2012.
- FARIAS, M.R. Avaliação de qualidade de matérias-primas vegetais. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2000.
- FERREIRA, M.M.M., OLIVEIRA, A.H.C., SANTOS, N.S. Flavones and flavonols: new insights into their chemical structure and biological function. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 2, n. 2, p. 57-60 jul-dez, 2008.
- FILHO, S.A.V., OLIVEIRA, M.L.G., ASSENCO, R.A.G., SILVA, G.D.F., LOPES, J.C.D., LANNA, M.C.S., MAGALHÃES, J.C., DUARTE, L.P. Cytotoxicity, Antipoliiovirus activity and *in silico* biological evaluation of constituents of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 6. 2014.
- GERHAÜSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer* 41, 1941–1954. 2005a.
- GONG, J., CAI, C., LIU, X., KU, X., JIANG, H., GAO, D., LI, H. Chem mapper: a versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method. *Bioinformatics*. 29(14):1827-9. 2103.
- GONTIJO, D.C., BRANDÃO, G.C., GONTIJO, P.C., OLIVEIRA, A.B., DIAZ, M., FIETTO, L.G., LEITE, J.P.V. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. *Food Chemistry*. 230: 618–662. 2017.
- GRIEVE, M. *A Modern Herbal*. Dover Publications, Inc., New York. 1971.

- HAMMOND, M. E.; GOODWIN, J.; DVORAK, H. F. Quantitative measurements of neutral red uptake and excretion by mammalian cells. *J. Reticuloendothel. Soc.* 27:337-346; 1980.
- HANLEY, J.A., MCNEIL, B.J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 143: 29–36. 1982.
- HÄNSEL, R., SCHULZ, J. Desmethylxanthohumol: isolierung aus Hopfen und Cyclisierung zu Flavanonen. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* 321, 37-40. 1988.
- HARBORNE, J.B. *The Flavonoids-Advances in Research since 1980.* London: Chapman and Hall, 1988.
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. Advances in Flavonoids Research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HAUNOLD, A. Cytology and cytogenetics of hops. *In: TSUCHIYA, T., GUPTA, P.K.* (Eds.), *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution*, Part B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 1991.
- HAWKINS, P.C.D., SKILLMAN, A.G., WARREN, G.L., ELLINGSON, B.A., STAHL, M.T. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and Cambridge structural database. *J. Chem. Inf. Model.* 50: 572–584. 2010.
- HAWKINS, P.C.D., NICHOLLS, A. Conformer Generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.* 52: 2919–2936. 2012.
- HEALE, J.B., LEGG, T., CONNELL, S. *Humulus lupulus* L.: *In vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance. *In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II*, Springer Verlag, 264-285. 1989.
- HICKEY, L.J. A revised classification of the architecture of Dicotyledonous leaves. Pp. 23-39. *In: METCALFE, C.R. & CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons - Systematics anatomy of leaf, and stem, with a brief history of the subject.* 2nd ed. Oxford, Clarendon Press. 1973.

HILLER, S., GINGRICH, G.A., HAUNOLD, A. Growing Hops - In the Home Garden. 19:5. 1996.

<http://www.biorede.pt/page.asp?id=2273>. Acessado em novembro/2018.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cannabis_sativa_Koehler_drawing.jpg.

Acessado em novembro/2018

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Celtis_australis0.jpg. Acessado em setembro/2020.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Humulus_lupulus_Sturm04038.jpg.

Acessado em setembro/2020.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em janeiro/2019.

<https://www.wordclouds.com/>. Acessado em janeiro/2020.

HUGHES, P.S., SIMPSON, W.J. Production and composition of hop products. MBAA Technical Quarterly, v. 30, n. 4, p. 146-154, 1993.

JACQUES, P.J. Endocytosis. *In*: DINGLE, J.T. FELL, H.B. Lysosomes in Biology and Pathology. Amsterdam: North Holland; 395-420. 1973.

JEZEK, J., KRIVÁNEK, J., POKORNÝ, J. Trials with growing hops on low trellis in the czech republic in 2009-2011. Acta Hort. 1010, 199-203. 2013.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. 3ª ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2009.

KARABIN, M., HUDCOVÁ, T., JELÍNEK, L., DOSTÁLEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Biotechnology Advances, 33, 1063–1090. 2015.

KARABÍN, M., HUDCOVÁ, T., JELÍNEK, L., DOSTÁLEK, P. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016; 15(3):542-67. 2016.

- KARNICK, C.R. Pharmacopoeial Standards of Herbal Plants, vol.12. Sri Satguru Publications, Delhi, vol. 1, pp. 183–184, vol. 2, p. 67. 1994.
- KONYAR, S.T., ÖZTÜRK, N., DANE, F. Occurrence, types and distribution of calcium oxalate crystals in leaves and stems of some species of poisonous plants. *Botanical Studies*. 2014.
- KRAUS, J.E., ARDUIN, M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal, Editora Universidade Rural, São Paulo, 1997.
- KOBAN, I., MATTHES, R., HUBNER, N., WELK, A., SIETMANN, R., LADEMANN, J., KRAMER, A., KOCHER, T., XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS KrankenhaushygieneInterdisziplinär*. 7(1):1-10. 2012.
- LAGUNIN, A., STEPANCHIKOVA, A., FILIMONOV, D., POROIKOV, V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatic*.16(8):747-8. 2000.
- LAGUNIN, A., FILIMONOV, D., POROIKOV, V. Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS. *Curr Pharm Des*. 16(15):1703–1717. 2010.
- LAMY, V., ROUSSI, S., CHAABI, M., GOSS´E, F., SCHALL, L., LOBSTEIN, A., RAUL, F. Chemopreventive effects of lupulone, a hop β acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 28, 1575–1581. 2007.
- LAWLESS, J. The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism. Element Books, Ltd., Dorset, UK. 1995.
- LOPES, J.C.D., DOS SANTOS, F.M., MARTINS-JOSÉ, A., AUGUSTYNS, K., De WINTER, H. The power metric: A new statistically robust enrichment-type metric for virtual screening applications with early recovery capability. *J. Cheminform*. 2017.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York. 1970.

- MALCHER-LOPES, R. Canabinoides ajudam a desvendar aspectos etiológicos em comum e trazem esperança para o tratamento de autismo e epilepsia. *Revista da Biologia* 2014.
- MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Separation and quantification of flavonoids. *in*: ANDERSEN, O'.M., MARKHAM, K.R. Eds. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press-Taylor and Francis Group. Boca Raton. 1-36. 2006.
- MEGA, J.F., NEVES, E., ANDRADE, C.J. A produção de cerveja no Brasil. *Revista Citino*, v. 1, n. 1, p. 34-42. 2011.
- MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F., HELMRICH, A., HENDERSON, M.C., RODRIGUEZ, R.J., YANG, Y.-H., DEINZER, M.L., BARNES, D.W., BUHLER, D.R. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 37, 271–285. 1999.
- MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F., IVANOV, V., MCCALL, M., FREI, B., DEINZER, M.L., BUHLER, D.R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3876–3884. 2000b.
- MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NUNES, M.J., PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72,145–171. 2001.
- NAGEL, J., CULLEY, L.K., LU, Y., LIU, E., MATTHEWS, P.D., STEVENS, J.F., PAGE, J. E. EST Analysis of Hop Glandular trichomes identifies an O-Methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell*. 20:186-200. 2008.
- NAKAMURA, Y., ASAH, H., ALTAF-UL-AMIN, MD., KUROKAWA, K., KANAYA, S. KNApSACK: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. Disponível em: <http://foodb.ca/compounds/FDB017133>. Acesso em 18 nov. 2018.

- NEGRI, G., Di SANTI, D., TABACH, R. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(6): 850-859. 2010.
- NEVE, R.A. Hops. Chapman and Hall, New York. 1991.
- NICHOLLS, A. What do we know?: Simple statistical techniques that help. *Methods Mol. Biol.* 672:531–581. 2011.
- NORINDER, U., CARLSSON, L., BOYER, S., EKLUND, M. Introducing Conformal Prediction in Predictive Modeling. A Transparent and Flexible Alternative to Applicability Domain Determination. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 54 (6): 1596-1603. 2014.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 412 p. 1991.
- OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17 (1). Botucatu. 2015.
- PAN, L., BECKER, H., GERHÄUSER, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway. *Molecular Nutrition and Food Research* 49, 837–843. 2005.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S., GOMES, T.L.B., CARDOSO, K.C.M., ALBUQUERQUE, U.P., AMORIM, E.L.C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4), 586-591, 2012.
- PESCHEL, W., SÁNCHEZ-RABANEDA, F., DIEKMANN, W., PLESCHER, A., GARTZÍA, I., JIMÉNEZ, D., LAMUELA-RAVENTÓS, R., BUXADERAS, S., CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97, 137–150. 2006.
- PROESTOS, C., BOZIARIS I.S., NYCHAS G.J.E., KOMAITSET M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their

- antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, Barking, v.95, p.664-671, 2006.
- QUINTÃO, F. J. O., TAVARES, R. S. N., VIEIRA-FILHO, S. A., SOUZA, G. H. B., SANTOS, O. D. H. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.23, 1:101–107. 2013.
- REINOLD, M. Manual prático de cervejaria. 1.ed. São Paulo: Aden. p. 213. 1997.
- RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*. 24:1-20. 1994.
- ROCHA, M.P., CAMPANA, P.R.V., SCOARIS, D.O., ALMEIDA, V.L., LOPES, J.C.D., SHAW, J.M.H., SILVA, C.G. Combined *in Vitro* Studies and *in Silico* Target Fishing for the Evaluation of the Biological Activities of *Diphylleia cymosa* and *Podophyllum hexandrum*. *Molecules* 23: 3303. 2018b.
- ROLLINGER, J.M., STUPPNER, H., LANGER, T. Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *in*: PETERSEN, F., AMSTUTZ, R., Eds. Progress in Drug Research. Series: Natural compounds as drugs. Vol. 1. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.65:212-249. 2008.
- SÄGESSER M., DEINZER M. HPLC-Ion Spray-Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 54:3, 129-134p. 1996.
- SALAHEEN, S., NGUYEN, C., HEWES, D., BISWAS, D. Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Contr.* 46, 174–181. 2014.
- SANDRA, P. La contribution du houblon au gout et a l'arome de la biere. *Cerevisiae*, v. 1, p. 37-44, 1976.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2010.

- SANTOS, F.M., De WINTER, H., AUGUSTYNS, K., LOPES, J.C.D. Use of Extensive Cross-Validation and Bootstrap Application (ExCVBA) for Molecular Modeling of Some Pharmacokinetics Properties. [accessed 2018 December 1st] https://www.researchgate.net/profile/Julio_Lopes2/publication/282644866_2015_-_Poster_OpenTox-Use_of_Extensive_Cross-validation_and_Bootstrap_Application_ExCVBA_for_Molecular_Modeling_/links/5451110c0cf2742211800000.pdf. 2015.
- SCHIEBER, A., STINTZING, F. C., CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—Recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401–413. 2001.
- SCHMIDT, B.J., PAPIN, J.A., MUSANTE, C.J. Mechanistic systems modeling to guide drug discovery and development. *Drug Discovery Today*. 18:13-4. 2013.
- SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Compositae. *J. Ethnopharmacol.*, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2000.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2007.
- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.P.C., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6^a ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Métodos em Enzimologia*. 152-178,1999.
- SIQUEIRA, P.B., BOLINI, H.M.A., MACEDO, G.A. O Processo de Fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 19:4. p. 491- 498. 2008.

- SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR, G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química. Nova* 30:351. 2007.
- STEVENS, J.F., MIRANDA, C.L., BUHLER, D.R., DEINZER, M.L. Chemistry and biology of hop flavonoids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56, 136–145. 1998.
- STEVENS, J.F., PAGE, J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65, 1317–1330. 2004.
- STEVENS, J.F., TAYLOR, A.W., CLAWSON, J.E., AND DEINZER, M.L. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(6): 2421-2428. 1999.
- STEVENS, J.F., TAYLOR, A.W., NICKERSON, G.B., IVANCIC, M., HENNING, J., HAUNOLD, A., DEINZER, M.L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* 53, 759–775. 2000.
- TANIGUCHI, Y., TANIGUCHI, H., YAMADA, M., MATSUKURA, Y., KOIZUMI, H., FURIHATA, K., & SHINDO, K. Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(47), 11602–11612. 2014.
- THE PLANT LIST VERSION 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January). Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Cannabaceae/>. Acesso em 05/11/2018, às 20:40h. 2010.
- TOBE, H., KUBOTA, M., YAMAGUCHI, M., KOCHA, T., AOYAGI, T., Apoptosis to HL-60 by humulone. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 1027–1029. 1997b.
- VANHOECKE, B., DERYCKE, L., VAN MARCK, V., DEPYPERE, H., DE KEUKELEIRE, D., BRACKE, M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a

- prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. International Journal of Cancer 117, 889–895. 2005a.
- VENTURINI, W.G. Cerveja. In: Tecnologia de Bebidas. 1.ed. São Paulo: Edgard Blücher. 550p. 2005.
- VERZELE, M., DE KEUKELEIRE, D. Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids. Elsevier, Amsterdam. 1991.
- WANG, X., CHEN, H., YANG, F., GONG, J., LI, S., PEI, J., LIU, X., JIANG, H., LAI, L., LI, H. iDrug: a webaccessible and interactive drug discovery and design platform. Journal of Cheminformatics. 6:28. 2014.
- WANG, X., YU, J., LI, W., WANG, C., LI, H., JU, W., CHEN, J., SUN, J. Characteristics and antioxidant activity of lignans in *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* from different locations. Chem. Biodivers. 15(6). 2018.
- WATSON, L., DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 14th October 2018. delta-intkey.com. 1992 onwards.
- WEISS, R. F. Herbal Medicine. Ab Arcanum, Gothenburg, Sweden, pp. 285–286. 1988.
- WU, C.C., KUO-HUANG, L.L. Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae. Botanical Bulletin- Academia Sinica. 38: 97–104. 1997.
- ZANOLI, P., ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. Journal of Ethnopharmacology, Elsevier BV. 383-396p. 2008.
- ZAUPA, C., CARRASCHI, L., SILVA, E.A., CHANKE, A.L.S., USHIROBIRA, T.M.A., MARQUES, L.C. Controle de qualidade farmacobotânico e legal de fitoterápicos comercializados nas farmácias de Maringá (PR). Revista Racine, v.58, p.32-36, 2000.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.P.C., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.

ZUCCOLOTTO, T., APEL, M., RATES, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre – R.S., Ver. Inst. Adolfo Lutz., 58 (2): 25-31.1999.

ANEXO I: Cálculos utilizados no *software* Active-IT.

Cada dado foi utilizado para produzir modelos preditivos, utilizando os dois métodos, através de partição randômica estratificada recorrente dos dados originais para produzir um banco com 70% dos dados originais, e a validação é composta de 30%. Esse procedimento é repetido pelo menos 30 vezes e a média dos *scores* de cada composto é usado para avaliar a performance do modelo com a área sob a curva de *receiver operating characteristic* (AUC-ROC), assim como predizer a atividade das novas substâncias. O cálculo da AUC-ROC foi realizado de acordo com a equação (1), com a soma da classificação das substâncias ativas, também conhecido como teste U de Mann-Whitney.

$$AUC = 1 - \frac{1}{N_a} \sum_{j=1}^{N_a} \frac{(r_j - j)}{N_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde, r_j é o ranking de atividade j^{th} , N_a e N_i são números de substâncias ativas e inativas, respectivamente. Quando ocorre entre ativos e inativos, a classificação do *ranking* é dimensionada por interpolação para evitar qualquer viés.

O desvio padrão da área sob a curva (AUC) nessa predição segue o proposto por Nicholls (HAWKINS *et al.*, 2010) (Equação 2), baseada em Hanley (SANTOS *et al.*, 2015) para uma curva ROC típica:

$$AUC = w \pm t_{95\%} \sqrt{\frac{w^2(1-w)/(1+w)}{N_a} + \frac{w(1-w)^2/(2-w)^2}{N_i}} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde w é a AUC observada. No teste t com intervalo de confiança de 95% ($t_{95\%}$) o número de graus de liberdade ν , segue o proposto por Nicholls (NICHOLLS, 2011) (Equação 3), para as variâncias das substâncias ativas e inativas, utilizando a fórmula de Welch-Satterthwaite:

$$v_{eff}^{AUC} = \frac{\left(\frac{AUC}{1+AUC}N_i + \frac{1-AUC}{2-AUC}N_a\right)^2}{\frac{\left(\frac{AUC}{1+AUC}N_i\right)^2}{N_a-1} + \frac{\left(\frac{1-AUC}{2-AUC}N_a\right)^2}{N_i-1}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Os modelos SVM foram construídos com o *software* LibSVM (HANLEY & McNEIL, 1982) com opção de kernel linear. O custo C, que é um parâmetro de penalidade aplicado a compostos mal classificados nos dados de treinamento, foi selecionado com sequências exponencialmente crescentes de 2^{-12} para 2^{+6} , por meio de uma validação cruzada de 5 vezes (CV) usando a métrica de potência (PM) (LOPES *et al.*, 2017; De WINTER & LOPES, 2018) em $\chi = TPR + FPR = 0,5$ como um objetivo de otimização para garantir a recuperação precoce de compostos ativos. O modelo Naive Bayes foi obtido usando o Módulo Perl do repositório CPAN (CHANG & LIN, 2011), que foi incorporado ao *software* ExCVBA. Para a predição das atividades biológicas, as *fingerprints* (farmacologia multiconformacional modal) das substâncias, foram submetidas à SVM ou ao Naive Bayes e os *scores* brutos médios obtidos foram convertidos em probabilidades por comparação com o *score* distribuição de ativas e inativas usadas para construir os modelos (somente conjuntos de validação), produzindo uma medida que se encaixe nesses dois subconjuntos (De WINTER & LOPES, 2018).

Considerando o *score* de SVM ou Naive Bayes do novo composto como limiar, a probabilidade de ser ativa (P_a) é igual à fração de compostos ativos com pior *score* (FNR) do que o composto predição (equação 4) e a probabilidade de ser inativo (P_i) é igual à fração de compostos inativos com melhor *score* (FPR) do que a substância predita (equação 5):

$$P_a = \frac{FN}{N_a} = FNR \quad (4)$$

$$P_i = \frac{FP}{N_i} = FPR \quad (5)$$

onde, N_a e N_i são o número de substâncias ativas e o número de inativas; FN é o número de ativas com *scores* piores do que o limiar; e FP é o número de substâncias inativas com melhores pontuações do que o limiar. Para cada conjunto de modelos,

utilizou-se a diferença entre Pa e Pi (Pa-Pi) para avaliar a atividade potencial das substâncias modeladas. Embora a variância do Pa-Pi, bem como seus limites, possa ser analisada a partir das variâncias de Pa e Pi, conforme descrito anteriormente (ROCHA *et al.*, 2018b), neste trabalho foi utilizada uma nova abordagem, conforme descrito abaixo. A variância dos scores de SVM ou Naive Bayes para cada substância quando aparece nos conjuntos de validação e o desvio padrão médio (SEM) (equação 6) foram utilizados para construir uma melhor estimativa dos limites da predição:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (6)$$

onde SD é o desvio padrão, definido como a raiz quadrada da variância. Assim, os limites dos scores, calculados em 95% do intervalo de confiança, foram estimados pela equação 7:

$$score_{limits} = score_{mean} \pm t_{95\%} * SEM \quad (7)$$

Os valores de *score* médio foram utilizados para calcular o valor médio de Pa e Pi, enquanto os valores máximos e mínimos foram utilizados para estimar seus limites superior e inferior. Na fase de predição, os *scores* de cada composto invisível sobre todos os 30 modelos do conjunto são médios e os limites são calculados com 95% do intervalo de confiança. A pontuação média é utilizada para calcular a média Pa-Pi a partir do valor médio de Pa menos o valor médio de Pi. O limite superior da pontuação é usado para calcular o limite superior de Pa-Pi, usando o maior valor de Pa menos o menor valor de Pi, enquanto que o limite inferior é usado para calcular o menor valor de Pa-Pi, usando o menor valor de Pa menos o maior valor de Pi. Os limites do Pa-Pi calculados desta forma proporcionam um melhor intervalo de confiança da predição, embora a estimativa analítica seja mais utilizada, pois pode ser usada como uma aproximação de domínio de aplicabilidade, da mesma forma a proposição de NORINDER *et al.* (2014). Se a substância for similar a um *outlier* a variação do *score* dos 30 modelos pode ser muito grande e isso refletirá na média de

valores de $Pa-Pi$. Se o menor valor de $Pa-Pi$ for menor que zero, não pode ser prevista como ativa.

ANEXO II

Tabela A1 - Dados das melhores atividades biológicas preditas pelos métodos SVM e Naive Bayes. Os *rankings* foram calculados separadamente para os melhores modelos (*targets*) e após o agrupamento dos modelos por classes de atividades biológicas.

Ordem	Atividade Biológica	Score classe x Pa-Pi		Ranking dos modelos	Ranking das classes	Ranking dos modelos	Ranking das classes	MIN	Média	PubChem (melhor modelo)
		SVM	Naive Bayes	SVM	SVM	Naive Bayes	Naive Bayes			
1	Reguladora da proteína 1 tipo muscleblind	1,38	1,37	8	1	18	17	1	11	493199
2	Anti- <i>Trypanosoma</i>	0,91	1,27	3	17	1	35	1	14	743060
3	Anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	0,65	2,43	15	57	2	1	1	18,75	624177
4	Anticâncer, câncer de pulmão	0,5	-	1	96	-	-	1	424,25	278
5	Anti-Inflamatório, NF-kappa- β	0,87	2,37	23	24	26	2	2	18,75	895
6	Regulador de sinalização da proteína G 16	1,25	1,37	46	2	54	20	2	30,5	1838
7	Citotoxicidade, NIH3T3	0,64	0,73	2	65	33	198	2	74,5	541
8	Regulador de sinalização da proteína G 19	1,22	1,31	49	3	125	29	3	51,5	1884
9	Regulador da Proteína Hsf1	0,58	2,06	165	80	102	3	3	87,5	602296

10	Anticâncer, Leucemia Mieloide Aguda	1,2	1,91	20	4	29	4	4	14,25	1502
11	Regulador da helicase- Síndrome de Bloom (BLM)	0,65	0,41	4	58	471	320	4	213,25	2364
12	Bactericida, <i>Salmonella typhimurium</i>	0,98	1,76	68	12	303	5	5	97	2834
13	Citotoxicidade, Células Linfoblastoides Humanas	1,17	1,49	56	5	382	11	5	113,5	946
14	Regulador da cisteína-protease ATG4B	0,99	-	5	11	-	-	5	404	504756
15	Regulador da Cadeia beta do fibrinogênio	0,86	1,38	6	26	14	16	6	15,5	720628
16	Anticâncer, RecQ-Like Dna Helicase 1 (RECQ1)	1,16	1,27	41	6	178	36	6	65,25	504841
17	Citotoxicidade, L929	0,57	1	151	84	6	63	6	76	463181
18	Antiviral, vírus da Herpes simples, <i>Virion Protein 16 (counterscreen)</i>	0,68	1,74	96	53	214	6	6	92,25	2763
19	Antiviral, vírus, HIV-1	1,11	1,67	10	10	9	7	7	9	346
20	Antiparasítico, <i>Caenorhabditis elegans</i>	1,16	1,13	22	7	206	49	7	71	449745
21	Anti-inflamatório, TLR2	0,26	1	261	159	7	64	7	122,75	1065534

22	Citotoxicidade, 697B	0,56	0,51	7	85	302	268	7	165,5	489034
23	Bactericida, <i>Staphylococcus aureus</i>	0,46	1,63	80	101	8	9	8	49,5	1014
24	<i>Dye Displacement (counterscreen)</i>	1,15	0,79	54	8	430	191	8	170,75	2564
25	Regulador do Receptor fMet-Leu-Phe	-	1,64	-	-	57	8	8	416,25	519
26	Regulador da prolil 4-hidroxilase, beta polipeptídeo	1,13	1,3	76	9	227	34	9	86,5	624274
27	Membro 2 da subfamília a do regulador de cromatina dependente de actina associado a matriz, relacionado a SWI/SNF	0,98	-	9	13	-	-	9	405,5	652260
28	Regulador do Receptor-1 de Esfingosina-1-fosfato	0,19	1,54	257	197	69	10	10	133,25	1563
29	Regulador do canal 2 para potássio retificador de entrada	-	0,74	-	-	10	196	10	451,5	492993
30	Regulador do disruptor de potencial de membrana mitocondrial	0,45	1,1	156	106	11	51	11	81	651755
31	Anticâncer, leucemia de células mieloides, sequência 1 (relacionada ao BCL2)	0,97	0,87	11	14	338	158	11	130,25	2168
32	Antiviral, vírus Hepatite C	0,85	1,4	62	29	58	12	12	40,25	2152

33	Agonista, Histona H2A.x	0,69	0,95	12	52	157	97	12	79,5	1224896
34	Carcinogênico, DSSTox	-	0,4	-	-	12	322	12	483,5	1201
35	Regulador do oncogene associado a glioma (<i>GLI family zinc finger 1</i>)	0,83	1,39	36	34	152	13	13	58,75	651995
36	Genotoxicidade, ATAD5	0,19	0,66	172	198	13	223	13	151,5	Tox21-SR-ATAD5
37	Antifúngico, fungo <i>Candida albicans</i>	0,42	1,38	43	110	15	14	14	45,5	588522
38	Regulador da Proteína contendo valosina	0,39	0,83	14	118	103	174	14	102,25	1517
39	Regulador da Proteína fosfatase 3 de dupla especificidade	0,35	1,38	39	133	141	15	15	82	2684
40	Regulador da Ape1 Endonuclease	0,94	0,88	30	15	373	150	15	142	1705
41	Regulador da hidrolase putativa RBBP9	0,92	0,89	34	16	295	142	16	121,75	1537
42	Anticâncer, Leucemia	0,25	0,71	16	163	174	201	16	138,5	1053195
43	Agonista, p53	0,06	1,33	398	264	16	28	16	176,5	Tox21-SR-p53
44	Citotoxicidade, SH-SY5Y	0,67	0,67	17	54	117	218	17	101,5	544
45	Regulador do receptor peptídeo 1 tipo glucagon	-	0,98	-	-	17	66	17	420,75	743262

46	Regulador de sinalização de proteína G-7	0,84	1,36	18	32	66	22	18	34,5	1837
47	Citotoxicidade, HepG2	0,25	1,37	97	165	20	18	18	75	1053125
48	Domínio Jumonji contendo 2A (counterscreen)	0,9	0,8	42	18	424	186	18	167,5	488840
49	Deslocamento no Teste Polarização fluorescente ADP (counterscreen)	0,34	1,37	272	134	47	19	19	118	2712
50	Coativador do receptor de esteroide 3	0,75	0,64	19	44	262	227	19	138	602166

Tabela A2 - Dados as descrições das melhores atividades biológicas preditas pelos métodos SVM e Naive Bayes. Os *rankings* foram calculados separadamente para os melhores modelos (*targets*) e após o agrupamento dos modelos por classes de atividades biológicas.

Ordem	Atividade Biológica	Melhor modelo AID	Descrição
1	Reguladora da proteína 1 tipo muscleblind	493199	Distrofia miotônica 1 (DM1). Doença muscular caracterizada por miotonia, atrofia muscular nas extremidades distais, catarata, hipogonadismo, funções endócrinas deficientes, calvície masculina e arritmias cardíacas. Função: existem 21 artigos referendo especificamente à esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado para associação com a doença (Distrofia miotônica).

2	Anti- <i>Trypanosoma</i>	743060	Doença de Chagas; infecções por <i>Trypanosoma</i> .
3	Anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	624177	Malária.
4	Anticâncer, câncer de pulmão	278	Adenocarcinoma pulmonar humano (linhagem A549)
5	Anti-Inflamatório, NF-kappa-β	895	<p>Translocação do NF-kappa-β. Algumas rotas celulares que levam à ativação de fatores de transcrição da família do NF-κβ foram identificadas na defesa do hospedeiro, imunidade, inflamação e câncer. NF-kappa-β é um fator de transcrição pleiotrópico expresso na maioria das células após ativação por uma gama variada de estímulos relacionados à vários processos biológicos como inflamação, imunidade, diferenciação, crescimento celular, tumorigênese e apoptose. NF-kappa-β é um complexo homo ou heterodimérico formado pelo domínio contendo proteínas do tipo Rel, RELA/p65, RELB, NFKB1/p105, NFKB1/p50, REL e NFKB2/p52 e o complexo heterodimérico p65-p50 parece ser o mais abundante. Os dímeros se ligam aos sítios do kappa-β no DNA e dímeros individuais possuem afinidades distintas por diferentes sítios do kappa-β e podem se ligar com afinidade distinguível e especificidade. Diferentes combinações de dímeros agem como ativadores ou repressores transcricionais. NF-kappa-β é controlado por vários mecanismos de modificações pós-transcricionais e compartimentalização subcelular, bem como interações com outros cofatores ou correpressores. Complexos NF-kappa-β estão presentes no citoplasma em estado inativo complexados com inibidores de NF-kappa-β (I-kappa-β). Em uma rota de ativação convencional, I-kappa-β é fosforilado por I-kappa-β kinases (IKKs) em resposta a diferentes ativadores, subsequentemente degradados para haver a liberação do complexo NF-kappa-β ativo, que migra para o núcleo. Função: existem 1292 artigos referindo especialmente à esse gene no <i>PubMed</i>. Funcionalmente, o gene foi testado em associação em diversas doenças (cistos ósseos, aneurisma, incontinência pigmentar, membrana epirretiniana,</p>

		<p>trauma múltiplo, linfoma de células T periféricas, choque, polimialgia reumática, microcefalia, neoplasias, neoplasia de células escamosas (incluindo carcinoma de células escamosas), arterite de células gigantes, isquemia, esôfago de Barrett, diabetes gestacional, doenças vasculares (incluindo aterosclerose, retinopatia diabética, arterite de células gigantes, infarto do miocárdio, vasculite, macroglobulinemia de Waldenström), neoplasia intraepitelial cervical, linfoma de Burkitt, retinopatia diabética, erros inatos do metabolismo (incluindo incontinência pigmentar), falência cardíaca, transformação celular viral, endometriose, infecções por <i>Helicobacter</i>, neoplasia de laringe, neoplasia óssea, inflamações intestinais (incluindo colite ulcerativa, doença de Crohn), leucemia mielógena crônica BCR-ABL positiva, neovascularização patológica, desordens linfoproliferativas (incluindo linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica de células B, macroglobulinemia de Waldenström), aterosclerose, doença de Hodgkin, susceptibilidade à doenças (incluindo predisposição à doenças genéticas), aberrações cromossômicas (incluindo translocação genética), infecção por HIV, retardo mental, colesterol sérico HDL*, neoplasias da cabeça e do pescoço (incluindo: neoplasias esofágicas, neoplasias laríngeas, neoplasias da tireoide), neoplasia invasiva, neoplasia cervical uterino, doenças hematológicas (incluindo leucemia mielógena crônica BCR-ABL positiva, macroglobulinemia de Waldenström), recorrências, doença de Parkinson, doenças ocupacionais, neoplasia dos rins (incluindo: carcinoma de células renais), neoplasias da pele, infarto do miocárdio, neuroblastoma, leucemia linfocítica crônica de células B (incluindo leucemia crônica de células B), inflamação, esclerose múltipla, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico, progressão de doenças, diabetes Mellitus tipo 1, artrite reumatoide, carcinoma (incluindo: adenocarcinoma, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas, neoplasia intraepitelial cervical), neoplasia de estômago, neoplasias ovarianas, neoplasias colorretais (incluindo: neoplasia de colon, neoplasia</p>
--	--	---

			retal), neoplasias prostáticas, neoplasias (incluindo: cisto ósseo aneurismático, neoplasia ósseas, neoplasias de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma, transformação celular viral, neoplasias do esôfago, neoplasias da cabeça e do pescoço, doença de Hodgkin, neoplasias invasivas, neoplasias de células escamosas, neoplasias ovarianas, condições pré-cancerosas, neoplasias de pele, neoplasias da tireoide, macroglobulinemia de Waldenström), neoplasias de mama. Doenças TTD: câncer e diabetes tipo 2.
6	Regulador de sinalização da proteína G 16	1838	Regula os receptores da proteína G acoplados à cascata de sinalização. Inibe a transdução de sinal pelo aumento da atividade da GTPase da subunidade alfa da proteína G, levando-a à sua forma inativa ligada ao GDP. Importante na cascata de fototransdução, pois regula o tempo de vida e a concentração efetiva da transducina em sua subunidade alfa ativada. Regula sinais mitógenos intra e extracelulares. Inibe a transdução de sinal pelo aumento da atividade da GTPase da subunidade alfa da proteína G, levando-a à sua forma inativa. Liga-se ao G(i)-alfa e G(o)-alfa, mas não se liga ao G(s)-alfa. Regula a cinética de sinalização na cascata de fototransdução. Função: existem 28 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado para associação a doenças (asma, transformação celular neoplásica, neoplasias colorretais e neoplasias gastrointestinais).
7	Citotoxicidade, linhagem NIH3T3	541	Organismo: camundongo <i>Mus musculus</i> / Linhagem celular: fibroblasto / Tecido: embrião.
8	Regulador de sinalização da proteína G 19	1884	Regula os receptores da proteína G acoplados à cascata de sinalização. Inibe a transdução de sinal pelo aumento da atividade da GTPase na subunidade alfa da proteína G, tornando-a inativa na sua forma ligada ao GDP (PMID:11602604, PMID:18434541). É importante na cascata de fototransdução por regulação no tempo de vida e concentração efetiva da transducina alfa ativada. Regula sinais mitogênicos intra e extracelulares. Função: existem 25 artigos referindo

			especialmente a esse gene no <i>Pubmed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado em associação à doença (neoplasias).
9	Regulador da Proteína Hsf1	602296	Age como fator de transcrição induzível em condições de estresse e fator de transcrição ligado ao DNA, importante na ativação transcricional da resposta ao choque térmico (HSR), levando à expressão de várias classes de proteínas do choque térmico, do tipo chaperonas (HSPs), que protegem as células de danos. Função: existem 100 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado em associação às doenças (carcinoma de células escamosas, neoplasias colorretais, neoplasias gastrintestinais, neoplasias hipofaríngeas, neoplasias laríngeas, linfoma de células B, neoplasias prostáticas, ataxias espinocerebelares). Doenças TTD: esclerose lateral amiotrófica, fibrilação atrial, câncer, diabetes, neuropatia diabética, câncer gastrintestinal, infecção por vírus do herpes simples, leucemia, metástase.
10	Anticâncer, Leucemia Mieloide Aguda	1502	Fator de ligação ao núcleo, isoforma 1 da subunidade beta, fator de transcrição da isoforma 1 da AML1c, relacionado à <i>runt</i> . CBF é um fator de transcrição complexo importante na hematopoiese. O complexo CBF inclui duas subunidades: RUNX1 (AML1, CBFA2) e CBFβ. Interferências no CBF pode levar à várias neoplasias hematopoiéticas como síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL) e AML. A proteína codificada por esse gene é a subunidade beta de um fator de ligação ao núcleo heterodimérico pertencendo à família PEBP2/CBF que regula os genes específicos da hematopoiese (ex. RUNX1) e osteogênese (ex. RUNX2). Função: existem 39 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado em associação às doenças (doenças agudas, aberrações cromossômicas, displasia cleidocranial, leucemia, leucemia mieloide aguda, do subtipo M4Eo).
11	Regulador da helicase - Síndrome de Bloom (BLM)	2364	<i>Bloom syndrome protein isoform 1</i> . BLM humana é importante na resolução de estruturas de DNA anormais formadas durante replicação ou recombinação homóloga. Diminuir a expressão do BLM

			leva à instabilidade cromossomal e alta sensibilidade à radiação em cultura de células. As células cancerosas desenvolvem resistência à terapia através de aumento da atividade das funções de reparo do DNA, o que leva ao aumento do interesse no desenvolvimento de fármacos que intrefere no reparo do DNA, que poderiam sensibilizar células cancerosas à terapia convencional. Função: existem 144 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente: síndrome de Werner, ataxia-telangiectasia, desordens linfoproliferativas (incluindo: doença de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica de células B, macroglobulinemia de Waldeström), doença de Hodgkin, danos ao DNA, doenças hematológicas (incluindo: macroglobulinemia de Waldeström), doenças ocupacionais, leucemia linfocítica crônica de células B, carcinoma, neoplasias do estômago, neoplasia colorretais, neoplasias (incluindo carcinoma, doença de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldeström).
12	Bactericida, <i>typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> 2834	Bactéria, <i>Salmonella typhimurium</i> .
13	Citotoxicidade, Linfoblastoides Humanas	Células 946	Linhagem celular linfoblastoide.
14	Regulador da cisteína protease ATG4B	504756	Protease cisteína ATG4B, isoforma A. Protease autofágica ATG4B é um regulador da conjugação do sistema LC3/GABARAP para formação, maturação e fechamento do autofagossomo. Membros das famílias ATG4 e LC3/GABARAP tem sido implicados em várias doenças incluindo câncer, e marcação da protease ATG4B tem sido sugerida como potencial estratégia na terapia anticâncer. Moduladores químicos de autofagia são essencialmente não-existentes. Protease ATG4B e autofagia são importantes na proteção de células epiteliais contra estresse induzido por bleomicina e apoptose, na regulação de respostas inflamatórias e fibróticas. Moduladores de autofagia dependente ATG4B tem sido um novo alvo potencial no tratamento da doença de

			Huntington. Alguns estudos tem demonstrado que a desregulação do ATG4B está comprometida em câncer, doenças inflamatórias intestinais, fibrose pulmonar ou infecção por vírus da hepatite C, mas o mecanismo nessas e outras doenças ainda não forma esclarecidos. Tratamentos baseados no bloqueio dessas proteases tem sido sugeridos em diabetes mellitus tipo 1. Função: existem 15 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> .
15	Regulador da cadeia beta do fibrinogênio	720628	Cadeia E, fargmento de duplo-D a partir de fibrina humana. Derrame isquêmico, infarto do miocárdio, embolismo pulmonar e trombose venosa profunda. Função: existem 72 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação com as doenças (disfibrinogenemia tipo beta, afibrinogenemia congênita, trombofilia por disfibrinogenemia, embolismo pulmonar, distúrbios da coagulação sanguínea (incluindo: afibrinogenemia; deficiências da proteína de coagulação), morte fetal, trombofilia, doenças em gêmeos, doenças da artéria carótida, erros inatos do metabolismo, doenças do fígado (incluindo: carcinoma hepatocelular, neoplasias hepáticas), enxaqueca, trombose (incluindo trombose venosa), glomerulonefrite por IgA, arterioesclerose (incluindo: aterosclerose coronária, doença da artéria coronária), doenças do feto, pré-eclâmpsia, isquemia cerebral, falha renal, recorrência, derrame (incluindo: acidente vascular cerebral), neoplasias dos rins, doenças coronárias (incluindo: aterosclerose coronária, doença da artéria coronária, estenose coronária), infarto do miocárdio, inflamação, obesidade, osteoporose, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares (incluindo: arterioesclerose, isquemia cerebral, doença da artéria carótida, acidente vascular cerebral, doenças coronárias, hipertensão, infarto do miocárdio, derrame, trombose, doenças vasculares), adenocarcinoma (incluindo: carcinoma hepatocelular), neoplasias do pulmão, neoplasias da mama.

16	Anticâncer, RecQ-Like Dna Helicase 1 (RECQ1)	504841	Cadeia A, estrutura da helicase humana Recq-like complexada a uma molécula de DNA. RECQ1 humana é uma proteína responsável por proteger o DNA de danos causados pelo estresse genotóxico por resistência e supressão por troca de cromátides irmãs. O desenvolvimento de fármacos que interferem no reparo do DNA pode sensibilizar células cancerosas à terapia convencional. Mutações no RECQL podem ser úteis como biomarcadores de câncer de mama. RECQL marcados em tumores associados a novos inibidores de reparo do DNA podem ser uma nova estratégia na terapia anticâncer. Função: existem 30 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado em associação à doença (neoplasias do fígado).
17	Citotoxicidade, L929	463181	Organismo: camundongo <i>Mus musculus</i> / Tecido: tecido conjuntivo subcutâneo, areolar e adiposo.
18	Antiviral, Vírus da Herpes simples, Virion Protein 16 (<i>counterscreen</i>)	2763	Interferência com HTS.
19	Antiviral, Vírus, HIV-1	346	Vírus, HIV-1.
20	Antiparasitário, <i>Caenorhabditis elegans</i>	449745	Antiparasitário, <i>Caenorhabditis elegans</i> .
21	Anti-Inflamatório, TLR2	1065534	A proteína codificada por esse gene é membro da família de receptores tipo <i>Toll</i> (TLR) que desempenha um papel importante no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata. TLRs são altamente conservados em <i>Drosophila</i> para humanos e compartilham semelhanças estruturais e funcionais. Essa proteína é uma proteína de superfície e pode formar heterodímeros com outros membros da família TLR no reconhecimento de moléculas derivadas de microorganismos conhecidos como padrão de associação molecular com patógenos (PAMPs). A ativação de TLRs por PAMPs leva a uma <i>up-regulation</i> de sinalização de rotas que modulam a

			<p>resposta inflamatória do hospedeiro. Esse gene também está associado à promoção de apoptose em resposta a lipoproteínas bacterianas. Esse gene implica na patogênese de várias doenças autoimunes. Resultados associados alternativamente em variantes de transcrição múltiplas. Função: existem 594 artigos referindo especificamente a esse gene no <i>PubMed</i>. Funcionalmente, esse gene foi testado em associação às doenças (susceptibilidade à lepra, ao câncer colorretal, e à micoses, incluindo dermatomicoses, leptospirose, pneumonia pneumocócica, <i>Schistosomiasis haematobia</i>, placa dentária, hanseníase lepromatosa, infecções por <i>Staphylococcus</i>, doenças genitais femininas (incluindo infecções por <i>Chlamydia</i>), bronquiectasia, herpes simples, hemorragia gengival, doenças periodontais (incluindo: hemorragia gengival e periodontite), ruptura prematura das membranas fetais, infecções por <i>Chlamydia</i>, tuberculose (incluindo tuberculose pulmonar), síndrome de Behçet, doenças do coração (incluindo doença cardíaca e doença cardíaca reumática), doenças da artéria carótida, osteoartrite, glomerulonefrite por IgA, dermatite atópica, infecção (incluindo: infecções por <i>Chlamydia</i>, dermatomicoses, herpes simples, <i>Schistosomiasis haematobia</i>, sepse, sinusite, tuberculose pulmonar, doenças linfoproliferativas (incluindo: doença de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica de células B, macroglobulinemia de Waldenström), aterosclerose, doença de Hodgkin, bronquiolite viral, doenças crônicas, infecções virais respiratórias sinciciais, doença de Crohn, doenças hematológicas (incluindo: neoplasias hematológicas, macroglobulinemia de Waldenström), doenças ocupacionais, doenças do recém-nascido prematuro, leucemia linfocítica crônica de células B, inflamação (incluindo sepse), complicações do diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide, obesidade, asma e neoplasias colorretais).</p>
22	Citotoxicidade, 697B	489034	Leucemia de células B precursoras.

23	Bactericida, <i>Staphylococcus aureus</i>	1014	<i>Quorum sensing</i> é um sistema de comunicação célula a célula que permite que membros de uma população bacteriana coordenem seu comportamento dependendo da densidade celular (WATERS & BASSLER, 2005). Os mediadores desse sistema de comunicação são ferormônios e autoindutores pequenos e difusíveis que são secretados pela bactéria e se acumulam no meio extracelular. Assim que alcançam a concentração apropriada, os autoindutores direcionam e coordenam a ação da população bacteriana. A lista de patógenos bacterianos que utilizam desse método de comunicação para regular a virulência está expandindo e agora incluem algumas das mais comuns bactérias patogênicas para humanos incluindo <i>Staphylococcus aureus</i> (WATERS & BASSLER, 2005).
24	<i>Dye Displacement (counterscreen)</i>	2564	<i>Dye Displacement (counterscreen)</i>
25	Regulador do receptor fMet-Leu-Phe	519	Receptor fMet-Leu-Phe. A família de receptores de formil peptídeos (FPR) acoplados a proteína G (GPCR) contribuem para a localização e ativação de leucócitos em danos celulares nas regiões de inflamação crônica. Ligantes FPR desencadeiam uma ampla variedade de atividades biológicas em células mieloides, incluindo quimiotaxia, produção de citocina e geração de superóxido. FPR também tem sido recentemente identificados em hepatócitos, células dendríticas imaturas, astrócitos, células microgliais e na túnica média de artérias coronárias. Tem sido avaliados como potencial na terapia de intervenção contra gliomas malignos. Função: existem 68 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene foi testado em associação a doenças (periodontite agressiva, neoplasias cerebrais, glioblastoma, leucemia promielocítica aguda). Doenças TTD: Doenças inflamatórias, úlcera péptica.
26	Regulador da proliferação 4-hidroxilase, beta polipeptídeo	624274	PDI é importante no transporte de elétron extracelular envolvido na ativação da cascata de coagulação. Inibição de PDI extracelular presente na superfície de plaquetas e/ou em células

			endoteliais previne acúmulo de plaquetas e formação de fibrinogênio, gerando formação de trombo. Trombose arterial media o infarto tecidual na doença arterial coronária, cerebrovascular e vascular periférica. Função: existem 62 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene tem sido testado em associação a doenças (abetalipoproteinemia; esclerose lateral amiotrófica, fibrosarcoma, cirrose hepática e neoplasias hepáticas).
27	Membro 2 da subfamília a do regulador de cromatina dependente de actina associado a matriz, relacionado a SWI/SNF	652260	Membro 2 da subfamília a regulador de cromatina dependente de actina associado a SWI/SNF relacionado à matriz, isoforma CRA. O complexo SWI/SNF regula os genes que estão envolvidos em vários processos, incluindo reparo de DNA, replicação de DNA e controle de crescimento, divisão e diferenciação celular. A proteína SMARCA2 e outras subunidades SWI/SNF possivelmente agem como supressores de tumores, que mantem células em crescimento e divisão de forma rápida e descontrolada. Função: existem 66 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, o gene tem sido testado em associação a doenças (adenocarcinoma, colesterol HDL sérico, leucemia, neoplasias prostáticas, esquizofrenia).
28	Regulador do receptor-1 de Esfingosina-1-fosfato	1563	Receptor-1 de Esfingosina-1-fosfato. Agonistas de S1P1 podem ser de interesse no aumento de barreiras endoteliais e então apresentam potencial no tratamento de esclerose múltipla, rejeição de transplante e síndrome do desconforto respiratório adulto. Proteína G acoplada ao receptor do lisoefingolípido esfingosina 1-fosfato (S1P) que parece estar acoplado à subclasse G(i) da proteína G heteromérica. A sinalização leva à ativação das quinases RAC1, SRC, PTK2/FAK1 e MAP. Importante na migração celular, provavelmente via reorganização da actina no citoesqueleto e na formação do lamelolípido em resposta ao estímulo de aumento da atividade da esfingosina quinase SPHK1. Importante na regulação do início da angiogênese e maturação vascular. Inibe o início da angiogênese para prevenir a angiogênese excessiva durante o

			desenvolvimento dos vasos sanguíneos. Necessária para a saída normal de células T do timo na corrente sanguínea e para dentro de órgãos linfoides periféricos. Importante também na migração de osteoclastos precursores de células, para mineralização e homeostase óssea. Atua na resposta ao 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfolina oxidada pelas células do endotélio pulmonar e na proteção contra injúrias pulmonares induzidas por ventilação. Função: existem 66 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Doenças TTD: <i>Acne vulgaris</i> ; câncer de pulmão avançado de não pequenas células, diabetes autoimune, câncer, distúrbios cardiovasculares, lúpus eritematoso cutâneo, carcinoma hepatocelular, esclerose múltipla, distúrbios imunológicos, doenças inflamatórias, degeneração macular, esclerose múltipla primária progressiva, psoríase, artrite reumatoide.
29	Regulador do canal 2 para potássio retificador de entrada	492993	Canais de potássio estão presentes na maioria das células de mamíferos e participam de várias respostas biológicas. A proteína codificada pelo gene KCNJ2 é uma proteína de membrana do tipo canal de potássio retificador de influxo. A proteína codificada, com grande tendência a permitir o influxo de potássio para a célula, provavelmente participa na estabilização da onda do potencial de ação e excitabilidade de tecidos musculares e nervosos. Mutações no gene KCNJ2 tem sido associadas com a síndrome de Andersen, caracterizada por paralisia periódica, arritmias cardíacas e características dismórficas. Pode ser um alvo potencial terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e reestenose seguida de intervenção coronária percutânea. Função: existem 69 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene tem sido testado em associação à doenças (OMIM: paralisia cardiodisrítmica periódica de Andersen, síndrome do qt curto, outras fontes: anormalidades múltiplas, fibrilação atrial, fácies, defeitos cardíacos congênitos, síndrome do qt longo tipo 7,

			paralisia periódica familiar, síndrome do qt curto tipo 3, taquicardia ventricular, disfunção ventricular.
30	Regulador do disruptor de potencial de membrana mitocondrial	651755	A manutenção da integridade estrutural mitocondrial é essencial para produção de energia pela célula, para proteção contra o estresse do ambiente, como privação de nutrientes, hipóxia e resposta a genes genotóxicos, incluindo quimioterapia. Consequentemente, a disfunção do metabolismo da mitocôndria leva células à apoptose e demonstra novas rotas terapêuticas no tratamento do câncer. Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo estão presentes no processo patogênico envolvido na doença de Parkinson. A mitocôndria provê energia celular em forma de ATP via fosforilação oxidativa, mas como parte do processo, superóxidos e outras espécies reativas de oxigênio também são produzidos. A produção excessiva de radicais livres contribui para o estresse oxidativo. O potencial de membrana mitocondrial é um dos parâmetros da função mitocondrial, gerado pela cadeia transportadora de elétrons que cria um gradiente eletroquímico por uma série de reações redox.
31	Anticâncer, leucemia de células mieloides, sequência 1 (relacionada ao BCL2)	2168	A proteína codificada por esse gene pertence à família Bcl-2. <i>Splicing</i> alternativo ocorre nesse <i>locus</i> e duas variantes transcricionais que codificam isoformas distintas foram identificadas. A isoforma 1 melhora a sobrevivência celular por inibição da apoptose e a isoforma 2 promove apoptose e induz morte celular. Função: existem 196 artigos referindo especialmente à esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação às doenças (germinoma; colangiocarcinoma; neoplasia testicular, linfoma difuso de grandes células B, mieloma múltiplo, leucemia mieloide (incluindo: leucemia mieloide aguda), carcinoma pulmonar de não pequenas células, translocação genética, melanoma, artrite reumatoide, neoplasias pancreáticas, estomacais, ovarianas e hepáticas (incluindo carcinoma hepatocelular), neoplasias de pulmão

			(incluindo carcinoma pulmonar de não pequenas células)). Doenças TTD: câncer, artrite reumatoide, tumores sólidos, infecção por trematódos.
32	Antiviral, Vírus, Hepatite C	2152	Vírus, hepatite C.
33	Agonista, Histona H2A.x	1224896	[H2AFX] Histonas são basicamente proteínas nucleares responsáveis pela estrutura do nucleossomo da fibra cromossomal em eucariotos. Duas moléculas de cada uma das quatro histonas do núcleo (H2A, H2B, H3 e H4) formam um octâmero, onde, à sua volta, existem, aproximadamente, 146 pares de base de DNA dispostos em unidades repetidas, chamadas nucleossomos. A histona H1 interage com o DNA através de nucleossomos e atuam na compactação da cromatina em estruturas maiores. Esse gene codifica um membro da família H2A e gera dois transcritos através de <i>stem-loop</i> e adição de poliA. Função: existem 156 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação a doenças (ataxia-telangiectasia, danos no DNA, linfoma de célula do manto, neoplasias, neoplasia cervical uterina).
34	Carcinogênico, DSSTox	1201	Carcinogênico, DSSTox.
35	Regulador do oncogene associado a glioma (<i>GLI family zinc finger 1</i>)	651995	Glioma, linfoma de células B, sarcoma. Meduloblastoma, tumor cerebral mais comum em pediatria. A desregulação da rota Hh está ligada à tumores cerebrais, de pele, pâncreas, mamas, ovário e sangue, e pequenas moléculas envolvidas nessa rota tem sido utilizadas como alvo em terapias anticâncer. Gli1 humana codifica a ativação da transcrição envolvida no desenvolvimento de oncogenes. Gli1 não é o único alvo no tratamento de pacientes com AML, mas representa um grande avanço no desenvolvimento de novas terapias para pacientes com expressão e atividade de Gli1 altas, como no caso daqueles com mutações RAS. Estudos sugerem que inibição da expressão de Gli1 pode ajudar no tratamento de neoplasias mieloproliferativas. A inibição de Gli1

			pode auxiliar no tratamento de aterosclerose associada com doenças crônicas dos rins. Função: existem 86 artigos referindo especificamente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado associado a doenças (tumores do sistema nervoso (incluindo: glioma), tumores estromais gastrointestinais, neoplasias intestinais (incluindo neoplasias colônicas), neoplasias de tecidos moles, neoplasias endometriais, glioblastoma, glioma (incluindo glioblastoma), neoplasias cutâneas, neoplasias do esôfago, translocação genética, carcinoma (incluindo: adenocarcinoma, carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas), neoplasias colônicas, prostáticas e de mama).
36	Genotoxicidade, ATAD5	Tox21-SR-ATAD5	Família ATPase AAA, domínio contendo proteína 5. Envolvida na resposta ao dano do DNA. Envolvida no <i>checkpoint</i> dos danos relacionados a RAD9A, uma rota importante na determinação se o dano do DNA é compatível com a sobrevivência da célula ou se é necessária a eliminação da célula por apoptose. Modula a interação do RAD9A com BCL2 e assim, induz a apoptose por danos no DNA. Função: existem 7 artigos referindo especificamente a esse gene no <i>PubMed</i> .
37	Antifúngico, fungo, <i>Candida albicans</i>	588522	Fungo, <i>Candida albicans</i> , resistência a fármacos <i>protein 1</i> .
38	Regulador da proteína contendo valosina	1517	A descoberta de mutações <i>missense</i> p97 em uma forma genética de demência humana (5-7), a localização de p97 em inclusões ubíquas em neurônios afetados da esclerose lateral amiotrófica e da Doença de Parkinson (8), e a superprodução de p97 em cânceres múltiplos (10-14), sugerem que p97 possui papéis celulares diversos e essenciais. Função: existem 119 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação a doenças (OMIM: miopatia com corpos de inclusão com doença de Paget de início precoce e demência frontotemporal, outras fontes: carcinoma pulmonar de células não-pequenas, demência, demência frontotemporal, predisposição genética a doenças, neoplasias do fígado, do

			pulmão e muscular, doenças musculares, distrofias musculares, miosite por corpos de inclusão, <i>osteitis deformans</i>). Doenças TTD: mieloma múltiplo.
39	Regulador da proteína fosfatase 3 de dupla especificidade	2684	A proteína codificada por esse gene é membro de uma subfamília de proteínas fosfatases de dupla especificidade. Essas fosfatases inativam suas quinases por desfosforilação dos resíduos fosfoserina/treonina e fosfotirosina. Elas regulam negativamente os membros da superfamília proteína quinase mitógeno-ativada (MAP) (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), que estão associadas com proliferação celular e diferenciação. Proteína fosfatase 3 de dupla especificidade (DUSP3) nas plaquetas sinalizam a formação de coágulos sanguíneos. Como reportado recentemente na revista <i>Circulation</i> , os pesquisadores desenvolveram um novo inibidor de DUSP3 que diminui a agregação de plaquetas humanas. Os achados fundamentam o caminho para desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento de coágulos sanguíneos e em ataque cardíaco e derrame isquêmico em humanos. Deficiência de DUSP3 ou sua inibição inibem ativação de plaquetas e a trombose arterial. Entre as atividades biológicas atribuídas ao VHR (discutido anteriormente) estão a habilidade de controlar o ciclo celular, o que afeta a proliferação celular. Isso mostra a importância do estudo do VHR no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para diferentes tipos de câncer. Função: existem 20 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação a doenças (predisposição genética a doenças e distúrbios relacionados ao estresse térmico).
40	Regulador da endonuclease Ape1	1705	Cadeia A, Ape1 endonuclease humana ligada ao <i>abasic</i> DNA e íon Mn^{2+} . Superexpressão do APE1 em vários tipos de câncer e resistência dessas células tumorais à radio e quimioterapia. Logo, o APE1 pode melhorar a eficácia de tratamentos promovendo a sensibilização ou proteção de células doentes e normais, respectivamente. Proteínas multifuncionais possuem uma função importante na resposta celular ao estresse oxidativo. As duas atividades mais importantes da

			<p>APEX1 são no reparo do DNA e na regulação do redox de fatores transcricionais. APE1 atua como um fator de redução de vários fatores de transcrição (TFs) e também tem sido chamados de fator efetor do redox 1, Ref-1. Por exemplo, APE ativa o ativador proteína-1, fator nuclear kappa β, fator indutível de hipóxia 1α, box pareado gene 8, ativador da transdução de sinal de transcrição 3 e p53, que estão envolvidos na apoptose, inflamação e angiogênese e rotas de sobrevivência celular. APE1/Ref-1 mantem a homeostase celular (redox) via ativação de TFs que regulam vários processos fisiológicos e <i>crosstalk</i> com agentes de balanço redox (por exemplo, tireodotoxina, catalase e superóxido desmutase) por controlar os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A versatilidade de APE1/Ref-1 é natural em várias etiologias humanas, incluindo neurodegeneração, câncer, doenças cardiovasculares e outras que estão associadas com alterações da expressão, localização subcelular e atividades da APE/Ref-1. Função: existem 275 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i>. Funcionalmente, o gene foi testado em associação a doenças (rabdmiossarcoma embrionário, rabdmiossoarcoma alveolar, doenças neuromotoras, neoplasias de tecidos moles, infecções por <i>Helicobacter</i>, neoplasias recorrentes locais, neoplasias ósseas, osteosarcoma, doenças crônicas, danos ao DNA, carcinoma pulmonar de células não pequenas, doença pulmonar obstrutiva crônica, neoplasias estomacais, ovarianas, colorretais (incluindo: neoplasias colônicas), adenocarcinoma, neoplasias (incluindo: neoplasias ósseas, câncer de mama, neoplasia de mama, neoplasias recorrentes locais, neoplasias ovarianas e neoplasias de tecidos moles), neoplasias pulmonares (incluindo: carcinoma de pulmão de células não pequenas), neoplasias da mama (incluindo câncer de mama)). Doenças TTD: câncer ocular.</p>
41	Regulador da hidrolase putativa RBBP9	1537	<p>A proteína codificada por esse gene é uma proteína ligada ao retinoblastoma que atua na regulação da proliferação celular e diferenciação. Foi identificada a proteína-9 ligada ao</p>

			retinoblastoma (RBBP9) como associada ao tumor com serina hidrolase que é altamente ativa em carcinomas pancreáticos. Enquanto RBBP9 é expressado em tecidos normais ou malignos em níveis similares, sua elevada atividade em células tumorais promove crescimento independente de ancoragem <i>in vitro</i> assim como carcinogênese pancreática <i>in vivo</i> . Retinoblastoma ligado à proteína 9 (RBBP9) pode ser um possível alvo anticâncer. Função: existem 7 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> .
42	Anticâncer, Leucemia	1053195	Anticâncer, Leucemia.
43	Agonista, p53	Tox21-SR-p53	<i>TP53</i> . Antígeno tumoral celular p53, uma proteína supressora de tumor, ativada por injúria celular, incluindo danos ao DNA e outros estresses celulares. A ativação de p53 regula o destino celular induzindo reparo ao DNA, parada no ciclo celular, apoptose ou senescência celular. A ativação do p53, no entanto, é um bom indicador de danos celulares ou outros estresses celulares. O gene <i>TP53</i> provê instruções para produção da proteína tumoral p53. Essa proteína age como supressora de tumor, regulando a divisão celular mantendo o crescimento e proliferação celular rapidamente e de forma descontrolada. Age como supressora de vários tipos de tumor, induzindo parada no crescimento ou apoptose dependendo das circunstâncias fisiológicas e do tipo celular. Envolvida na regulação do ciclo celular como um trans-ativador que age regulando negativamente a divisão celular controlando vários genes requeridos no processo. Um dos genes ativados é o inibidor de ciclina dependente de quinase. A indução da apoptose parece ser mediada tanto pelo estímulo da expressão do antígeno BAX e FAS, ou pela repressão da expressão de Bcl-2. Em cooperação com PPIF mitocondrial, está envolvida na ativação do estresse oxidativo induzindo necrose; a função é completamente independente de transcrição. Induz a transcrição de RNA p21 não-codificadores longos intergênicos (lincRNA-p21) e lincRNA- Mkl1. LincRNA-p21 participa da repressão da transcrição dependente de <i>TP53</i> levando à apoptose e parece agir na regulação do

		<p>ciclo celular. Implica na sinalização Notch. Previne a atividade da quinase CDK7 quando associada ao complexo CAK em resposta a danos no DNA, interrompendo a progressão do ciclo celular. Isoforma 2 aumenta a atividade transativacional da isoforma 1 de alguns, mas não de todos promotores <i>TP53</i>-induzíveis. Isoforma 4 suprime a atividade transativacional e impede a supressão do crescimento mediada pela isoforma 1. Isoforma 7 inibe a apoptose mediada pela isoforma 1. Regula o ciclo circadiano através da repressão do CLOCK-ARNTL/BMAL1 mediada pela ativação transcricional de PER2. Função: existem 4043 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i>. Funcionalmente, o gene foi testado em associação a doenças (histiocitoma (incluindo: histiocitoma fibroso benigno), síndrome do tipo Li-Fraumeni, síndrome maligna múltipla, papiloma intraductal, infecções por Roseolovírus, colecistite, neoplasias conjuntivais, neoplasias do plexo coróide (incluindo: papiloma do plexo coróide), dermatofibrosarcoma, neoplasias da pálpebra, líquen escleroso e atrófico, carcinoma nasofaríngeo, neoplasias urogenitais (incluindo: carcinoma endometrial, de células renais, neoplasias endometriais, neoplasias genitais femininas, neoplasias renais, neoplasias ovarianas, prostáticas, neoplasias da bexiga, neoplasias uterino cervicais, neoplasias uterinas, neoplasias da vulva, tumor de Wilms), hiperplasia nodular focal, nefropatia de Balkan, trauma craniocerebral, neoplasias do nariz (incluindo: neoplasias dos seios paranasais), neoplasias do sistema nervosa periférico (incluindo: neoplasias da bainha neural, neuroma acústico), pterígio, epidermólise bolhosa distrófica, queimaduras solares, xantomatose, progeria, síndrome de Bloom, síndrome de Cockayne, neuroma acústico, neoplasias do sistema digestivo (incluindo: neoplasias do ducto biliar, carcinoma hepatocelular, carcinoma do ducto pancreático, câncer colorretal, neoplasias do esôfago, neoplasias da vesícula biliar, neoplasias gastrintestinais, neoplasias do fígado, câncer pancreático, neoplasias pancreáticas, neoplasias do estômago), degeneração hepatocelular,</p>
--	--	---

			<p>neoplasias hipofaríngeais, má-formação arteriovenosa intracranial, tumores neuroectodermis primitivos (incluindo: meduloblastoma, neuroblastoma), doenças intestinais (incluindo: neoplasias anais, colite ulcerativa, neoplasias colônicas, câncer colorretal, neoplasias colorretais hereditárias não poliposas, doenças de inflamação intestinais, neoplasias intestinais, síndrome de Peutz-Jeghers, neoplasia do reto), carcinoma embrionário, herpes simples, síndrome de Werner, neoplasias retinais (incluindo retinoblastoma), líquen plano oral, ataxia-telangiectasia; neoplasias do sistema nervoso central (incluindo: neoplasias cerebrais, neoplasias do plexo coroide, meningioma), neoplasias pleurais, neoplasias da vesícula biliar, neoplasias do córtex adrenal (incluindo: carcinoma cortical adrenal, carcinoma adrenocortical), doenças da tireoide (incluindo: carcinoma da tireoide, neoplasias da tireoide), pênfigo, cistoadenocarcinoma seroso, vitiligo, rabdomiossarcoma, esôfago de Barrett, teratoma, hemocromatose, neoplasias do ducto biliar, sarcoma (incluindo: carcinossarcoma, dermatofibrossarcoma, osteossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma sinovial), instabilidade genômica (incluindo: instabilidade cromossomal, fragilidade cromossomal), leucemia de células T, linfoma de células T, anoxia, leiomioma, meningioma, aborto habitual, glaucoma de ângulo aberto, hepatite B, pancreatite, doença de Huntington disease, psicologia, hepatite C (incluindo: hepatite C crônica), fumante, neoplasias nasofaríngeais, endometriose, perda de cabelo, infecções por <i>Helicobacter</i>, neoplasias laríngeas, neoplasias recorrentes locais, síndromes mielodisplásticas, arterioesclerose, neoplasias ósseas (incluindo: neoplasias do nariz, neoplasias dos seios paranasais), linfoma de células B (incluindo linfoma de Burkitt), cirrose hepática, psoríase, neovascularização patológica, desordens linfoproliferativas (incluindo: linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crônica de células B, leucemia de células T, linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, mieloma múltiplo, macroglobuliemia</p>
--	--	--	--

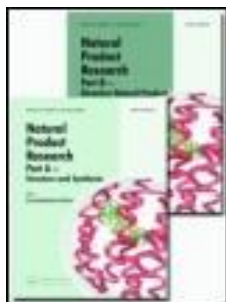
		<p>de Waldenstöm), susceptibilidade a doenças (incluindo: predisposição a doenças genéticas), neoplasias glandulares e epiteliais (incluindo adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma sebáceo, adenoma, adenoma pleiomórfico, carcinoma adrenocortical, astrocitoma, carcinoma, carcinoma <i>in situ</i>, carcinoma de células acinares, carcinoma cístico adenoide, carcinoma de células basais, carcinoma ductal, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, carcinoma lobular, carcinoma do ducto pancreático, carcinoma papilar, carcinoma de células renais, carcinoma de células pequenas, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionais, neoplasia cervical intraepitelial, colangiosarcoma, coriocarcinoma, cistoadenocarcinoma seroso, endioma, ganglioma, glioma, carcinoma hepatocelular, meduloblastoma, mesotelioma, neoplasias de células escamosas, tumores neuroectodermis primitivos, papiloma intraductal, retinoblastoma), doenças crônicas, aberrações cromossômicas (incluindo: instabilidade cromossomal, deleção cromossômica, fragilidade cromossômica, translocação genética), neoplasias metastáticas, diabetes Mellitus (incluindo: diabetes Mellitus, tipo 1), neoplasias da cabeça e do pescoço (incluindo: neoplasias esofágicas, neoplasias da pálpebra, neoplasias hipofaríngeas, neoplasias laríngeas, leucoplaquia oral, neoplasias da boca, neoplasias nasofaríngeas, neuroma acústico, neoplasias do nariz, neoplasias dos seios paranasais, neoplasias das parótidas, neoplasias das glândulas salivares, carcinoma da tireoide, neoplasias da tireoide, neoplasias da língua, neoplasias traqueais), neoplasias invasivas, danos ao DNA, doenças hematológicas (incluindo: mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, macroglobulinemia de Waldenström), modelo animal de doença, glioma (incluindo: astrocitoma, endioma, ganglioma, glioblastoma, meduloblastoma), doença de Parkinson, doenças ocupacionais, leucemia (incluindo: crise de explosão, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crônica de células B, leucemia mieloide, leucemia mieloide aguda, leucemia</p>
--	--	--

		<p>promielócita aguda de células T), neoplasias dos rins (incluindo: carcinoma de células renais, tumor de Wilms), neoplasias cutâneas (incluindo: neoplasias de glândulas sebáceas, neoplasia de glândulas sudoríparas), transtorno autista, neuroblastoma, leucemia linfocítica crônica de células B, inflamação, carcinoma de pulmão de células não pequenas, lupus eritematoso sistêmico (incluindo: nefrite lúpica), melanoma, artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica, transformação celular neoplásica (incluindo: crise de explosão, transformação celular viral), neoplasias da bexiga, esquizofrenia, neoplasias prostáticas, neoplasias (incluindo: adenoma, adenoma pleiomórfico, crise de explosão, neoplasias ósseas, câncer de mama, neoplasias da mama, linfoma de Burkitt, carcinoma, carcinoma embrionário, carcinosarcoma, transformação celular neoplásica, transformação celular viral, neoplasias do sistema nervosa central, coriocarcinoma, neoplasias colorretais não poliposas hereditárias, neoplasias conjuntivais, neoplasias do sistema digestivo, neoplasias esofágicas, neoplasias da pálpebra, neoplasias gastrintestinais, neoplasias genitais femininas, neoplasias da cabeça e do pescoço, doença de Hodgkin, leucemia, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide, leucoplaquia oral, síndrome de Li-Fraumeni, neoplasias do fígado, linfoma, melanoma, meningioma, neoplasias da boca, mieloma múltiplo, neoplasia invasiva, neoplasia metastática, neoplasia recorrente local, neoplasia experimental, neoplasia glandular e epitelial, neoplasia hormônio-dependente, neoplasia múltipla primária, neoplasias induzidas por radiação, segunda neoplasia primária, neoplasia de células escamosas, síndromes hereditárias neoplásicas, neoplasia da bainha neural, neuroma acústico, neoplasias ovarianas, câncer pancreático, neoplasia pancreática, infecções por papilomavirus, neoplasias do sistema nervosa periférico, síndrome de Peutz-Jeghers, condições pré-cancerosas, blastoma pulmonar, neoplasias da retina, sarcoma, neoplasias de glândulas sebáceas, neoplasias cutâneas, neoplasias de glândulas sudoríparas,</p>
--	--	---

			teratoma, carcinoma de tireoide, neoplasias da tireoide, neoplasias traqueiais, tumor por infecção viral, neoplasias urogenitais, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms tumor, <i>xeroderma pigmentosum</i>), neoplasias pulmonares (incluindo: neoplasias bronquiais, carcinoma pulmonar de células não pequenas, blastoma pulmonar), neoplasias de mama (incluindo: câncer de mama))
44	Citotoxicidade, linhagem SH-SY5Y	544	Organismo: <i>Homo sapiens</i> / Tecido: medula óssea / Doença: neuroblastoma.
45	Regulador do receptor peptídeo 1 tipo glucagon	743262	Receptor parcial de glp-1. É um receptor de glucagon tipo peptídeo 1. A atividade desse receptor é mediada pela proteína G que ativa a adenilil ciclase. Função: existem 40 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> . Funcionalmente, esse gene foi testado em associação a doenças (diabetes Mellitus tipo 2, insulinoma, neoplasias pancreáticas). Doenças TTD: lesão cerebral, diabetes, síndrome do intestino irritável, dispepsia, esteatohepatite não-alcoólica, diabetes não insulino-dependente, obesidade, diabetes tipo 1, diabetes tipo1/2, diabetes tipo 2, não especificada.
46	Regulador de sinalização de proteína G-7	1837	RGS7, parcial. Uma vez que GPCRs regulam vários processos fisiológicos em diversos tecidos, incluindo cérebro, coração, fígado e pulmão, a modulação da interação da proteína com RGS/G tem sido um alvo interessante para descoberta de fármacos. RGS7 (regulador de sinalização da proteína G-7) é um gene que foi encontrado em altos níveis em células de gordura marrom. Além disso, seus níveis foram aumentados em gordura branca, após exposição prolongada ao frio, um tratamento que induz o aparecimento de células de gordura marrom dentro de depósitos de células de gordura branca. A análise genética revelou que o gene RGS7 está associado com a obesidade e diabetes em humanos. RGS7 controla a atividade de sinalizadores de hormônios em células. Os dados demonstram RGS7 como um novo direcionamento ao melanoma e um ponto de relevância no uso de estratégias de estabilização da proteína e então, reestabelecimento de sua

			função. Doenças associadas ao RGS7 incluindo retinosquise 1 juvenil ligada ao X. Função: existem 22 artigos referindo especialmente a esse gene no <i>PubMed</i> .
47	Citotoxicidade, HepG2	1053125	Organismo: <i>Homo sapiens</i> , humano / Tecido: fígado / Doença: carcinoma hepatocelular. Toxicidade hepática. Injúrias causadas ao fígado por medicamentos é o maior problema que impacta na indústria farmacêutica, agências regulatórias de fármacos e médicos. Hepatotoxicidade induzida por fármaco é responsável por mais de 50% de falhas agudas do fígado, sendo a causa majoritária de retirada de fármacos.
48	Domínio Jumonji contendo 2A (counterscreen)	488840	Esse gene é membro da família do domínio 2 Jumonji (JMJD2) e codifica uma proteína contendo domínios JmjN, JmjC, JD2H, dois domínios TUDOR, 2 dois <i>PHD-type zinc fingers</i> . Essa proteína nuclear funciona como uma desmetilase específica de trimetilação, convertendo resíduos de histonas trimetilados em sua forma dimetilada, e um repressor de transcrição [provided by RefSeq]. KDM4A foi selecionado para investigação e está relacionado com vários estágios de doença hipóxicas, incluindo câncer de mama, próstata e pulmão, e hipertrofia cardíaca. Função: existem 22 artigos referindo especificamente a esse gene no <i>PubMed</i> .
49	Deslocamento no Teste Polarização fluorescente ADP (counterscreen)	2712	<i>ADP Fluorescence Polarization Displacement Assay (counterscreen)</i>
50	Coativador do receptor de esteroide 3	602166	Receptor nuclear coativador que direciona ligação de receptores nucleares e estimula atividades transcricionais hormônio-dependentes. É importante na criação do complexo coativador de multisubunidades, que provavelmente age via remodelamento da cromatina. Envolvida na coativação de vários receptores subnucleares, como os de esteroides (GR e ER), retinoides (RARs e RXRs), hormônios tireoidais (TRs), vitamina D3 (VDR) e prostanoides (PPARs). Possui atividade na histona acetiltransferase. Também é envolvida na coativação do NF-kappa-β via sua

		<p>interação com a subunidade NFKB1. Possui atividade associada ao SRC-3 no câncer de mama e em outros, na pesquisa de moléculas pequenas como alvo de SRC-1 e SRC-3 representam uma inovação e potencial estratégia efetiva na identificação de agentes para tratamento de câncer de mama e outros cânceres hormônio-refratários, onde sua coativação está superexpressa. Compostos que possuem como alvo a proteína 3 do coativador do receptor de esteroide (SRC-3) parece ser diferente pois é menos provável que as células cancerosas ignorem a interrupção de vários sistemas de sinalização de fatores de crescimento que resultam da perda da função SRC-3. NCOA3 em condrócitos implica na manipulação de NCOA3, o que se mostra um potencial alvo terapêutico em progressão da osteoartrite. Transcrição em todo o genoma identifica combinação de genes, que podem ser chave na regulação da homeostase do peso (PPARs, glicocorticoides, CEBPs, estradiol), funções de hormônios esteroides (glicocorticoides, estradiol, NCOA3) e sinalizadores de insulina (HNF4A, CEBPs, PPARG) ocupam as posições centrais. O aumento de peso e a regulação desse gene associado homeostasia do peso e a sinalização de insulina observada no presente estudo, sugerem um envolvimento da poluição ambiental na regulação endócrina do metabolismo, possibilitando a diminuição do ganho de peso e obesidade. Função: existem 168 artigos referindo especialmente a esse gene no PubMed. Funcionalmente, esse gene foi testado em associação a doenças (neoplasias de mama, carcinoma, colesterol HDL sérico, predisposição genética a doenças, neoplasias genitais femininas, neoplasias pancreáticas, neoplasias prostáticas).</p>
--	--	---



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


In silico pharmacological prediction and cytotoxicity of flavonoids glycosides identified by UPLC-DAD-ESI-MS/MS in extracts of *Humulus lupulus* leaves cultivated in Brazil

Regislainy Gomes da Silva, Tamires Cunha Almeida, Adriana Cotta Cardoso Reis, Sidney Augusto Vieira Filho, Geraldo Célio Brandão, Glenda Nicioli da Silva, Hildeberto Caldas de Sousa, Vera Lúcia de Almeida, Julio César Dias Lopes & Gustavo Henrique Bianco de Souza


To cite this article: Regislainy Gomes da Silva , Tamires Cunha Almeida , Adriana Cotta Cardoso Reis , Sidney Augusto Vieira Filho , Geraldo Célio Brandão , Glenda Nicioli da Silva , Hildeberto Caldas de Sousa , Vera Lúcia de Almeida , Julio César Dias Lopes & Gustavo Henrique Bianco de Souza (2020): *In silico* pharmacological prediction and cytotoxicity of flavonoids glycosides identified by UPLC-DAD-ESI-MS/MS in extracts of *Humulus lupulus* leaves cultivated in Brazil, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2020.1803308](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1803308)


To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1803308>


 View supplementary material 

 Published online: 07 Aug 2020.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 14

 View related articles

  View Crossmark data 


Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>



SHORT COMMUNICATION



In silico pharmacological prediction and cytotoxicity of flavonoids glycosides identified by UPLC-DAD-ESI-MS/MS in extracts of *Humulus lupulus* leaves cultivated in Brazil

Regislainy Gomes da Silva^a, Tamires Cunha Almeida^b, Adriana Cotta Cardoso Reis^c, Sidney Augusto Vieira Filho^c, Geraldo Célio Brandão^c, Glenda Nicioli da Silva^b , Hildeberto Caldas de Sousa^d, Vera Lúcia de Almeida^e, Julio César Dias Lopes^f and Gustavo Henrique Bianco de Souza^{a,c}

^aNúcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil;

^bDepartamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil;

^cDepartamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil; ^dDepartamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil; ^eServiço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica, FUNED, Belo Horizonte, Brazil;

^fChemoinformatics Group (NEQUIM), ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ABSTRACT

Ethanollic (EB) extract and hexanic (SH) and hydromethanolic (SEM) sub-extracts of *Humulus lupulus* leaves were submitted to cytotoxicity evaluation and to phytochemical methods. The effect of EB and SEM on cellular cycle was evaluated by propidium iodide method and the phases were quantified through flow cytometry. The cytotoxicity assessment was done using T24 and MRC5 cells, with EB and SEM (25–1200 mg/mL). By means of UPLC-DAD-MS/MS data were identified the flavonoids astragaline, nicotiflorin, kaempferol-7-*O*-rutinoside, robinin, hyperin, rutin, quercetin-7-*O*-rutinoside and manghaslin. EB (800 mg/mL) and SEM (1200 mg/mL) reduces the T24 cell viability. These extracts at 25 mg/mL stimulate the growth of MRC5 cells, evidencing a selective cytotoxicity. After 24 h of the treatment with extracts was not observed cycle arrest of T24 cells. The bioactivity prediction of the flavonoids was evaluated *in silico* through *in house* Active-IT software and PASSonline which indicated potential activity as antitumoral, cytotoxic, anti-inflammatory, antiparasitic, antimicrobial, antiviral and others.

ARTICLE HISTORY


Received 20 December 2019

Accepted 19 July 2020

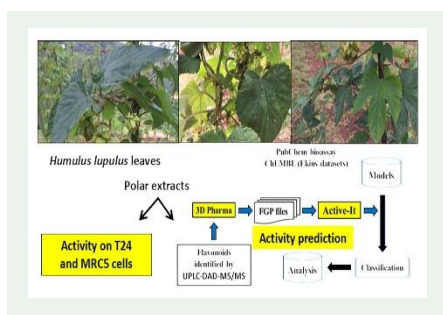
KEYWORDS

Cytotoxicity; flavonoids; *Humulus lupulus*; *in silico* prediction; UPLC-DAD-MS/MS

CONTACT Gustavo Henrique Bianco de Souza  guhbs@yahoo.com.br

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1803308>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



1. Introduction

In recent years, the virtual screening (*in silico*) has been applied allowing more appropriate targeting of biological assays and making the process of drug discovery more suitable for the public financial support (de Oliveira et al. 2014). In this research, were used *in silico* tools Active-IT (Rocha et al. 2018) and PASSonline (Prediction of Activity Spectra for Substances, Lagunin et al. 2010).

Humulus lupulus L. (Cannabaceae) extracts were analysed by UPLC-DAD-MS/MS and the potential activities of the identified compounds were evaluated *in silico* by Active-IT and PASS online programs. The cytotoxicity assessment was done using T24 (bladder carcinoma cells) and MRC5 (normal human fibroblast cells derived from fetal lung) with EB, SH and SEM extracts.

2. Results and discussion

In the chromatograms obtained by UPLC-DAD-MS/MS (Supplementary data Figures 1 and S2) of *H. lupulus* leaves extracts, both EB and SEM extracts presented peaks with similar retention time (r.t.). The majoritarian peaks presented the following r.t.: 3.14; 2.99; 2.83; 2.68; 2.73; 2.63; 2.48 and 2.89 min. The UV spectrum of these compounds has characteristic flavonoid profile (Mabry et al. 1970). The mass spectrum of each compound was compared to SciFinder database (Columbus 2007). The UV spectral data and mass/charge relation (m/z) were compared to literature, enabling 1–8 flavonoid identification (Figure 1, Supplementary data Table S1).

A better resolution figure is sent as an attachment.

In order to predict the potential biological activities of flavonoids in the EB and SEM extracts, the *in silico* calculations with Active-IT system were performed with six of the eight flavonoids due to availability of their 3D structures in PubChem Compound database. Thus, the Active-IT predictions were performed with all flavonoid but robinin (4) and manghaslin (8). Otherwise, PASSonline requires

only 2D structures and all flavonoid could be analysed. The Active-IT procedure for modelling and *in silico* predicting activities can be described in four steps: data set preparation, machine learning modelling, model validation and prediction (Supplementary data Figure 3).

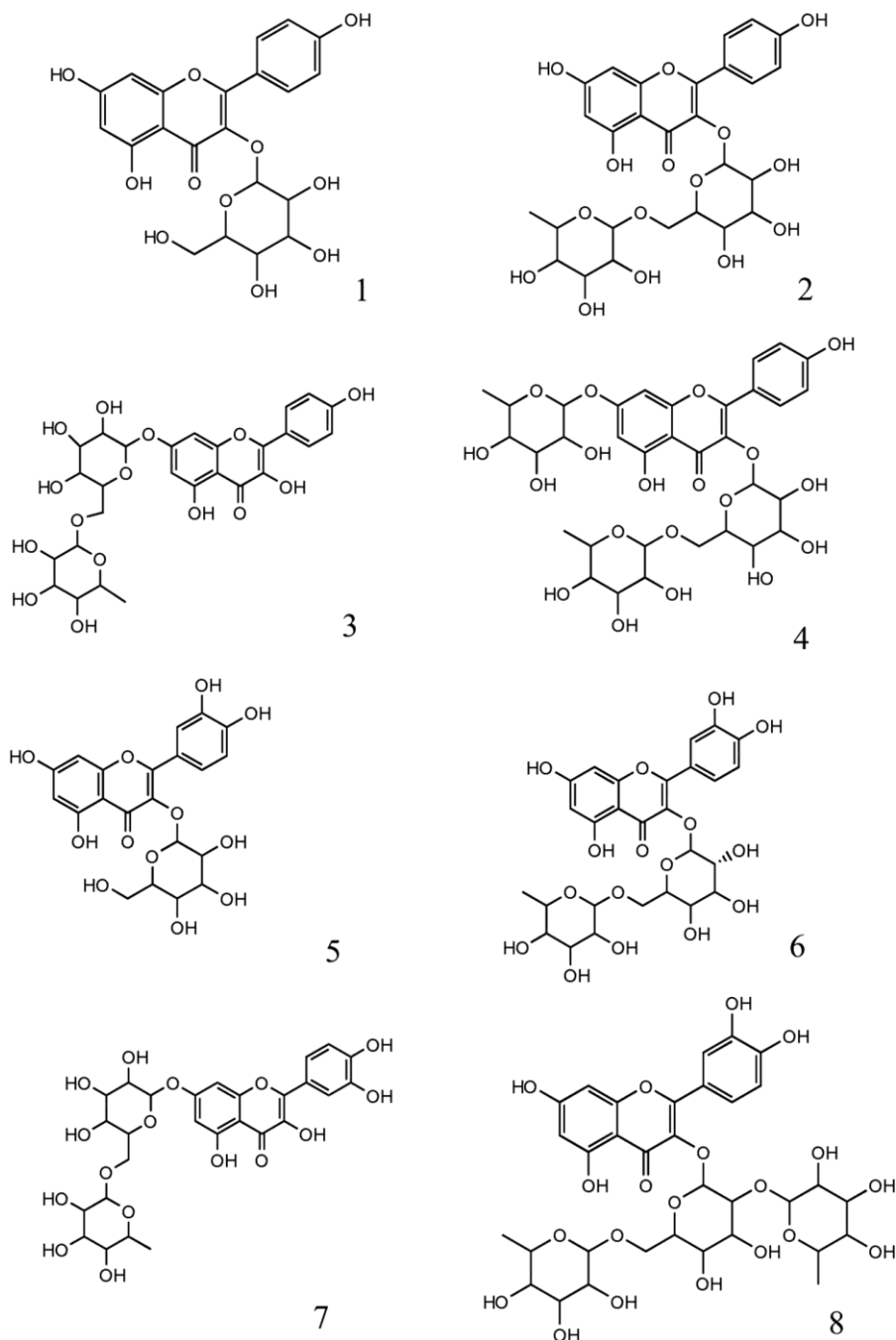


Figure 1. Chemical structure of flavonoids 1 to 8 detected through UPLC-DAD-MS/MS analysis in ethanol extract (EB) and hydromethanol subextract (SEM) obtained from *H. lupulus* leaves.

The Active-IT system is based on pharmacophore fingerprints (Qing et al. 2014) derived from multiple conformations of the compounds (Supplementary data Figure S4) and modelled with machine learning approaches. Most of its bioactivity models are derived from datasets available in PubChem Bioassay database.

Our methodology was validated with a number of PubChem bioassays that were already been modelled in our Activity-IT system and contains any of the flavonoids. The number of bioassays already modeled are 169, and the number of relevant activity data in these bioassays is 171, being 11 positive (active) results and 160 being negatives ones. The number of data points exceed the models (169) because two or more compounds share same bioassays/models. The flavonoids astragalín (1), nicotiflorin (2), hyperin (5) and rutin (6) have at least one activity data among the selected models. The flavonoid 5 was excluded from individual validation because it shows only one activity point where it appears as an inactive compound (PubChem Bioassay identification number – AID: 743268). However, its data was included in the global validation. For (1) and (6), the validation was successful using support vector machine (SVM) and Naïve Bayes techniques. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC) range was between 0.727 and 1.000, respectively. For (2), the Naive Bayes method produced an AUC-ROC of 0.25. This result can be attributed to the poor validation set for this compound with only one positive result (active) and four inactive data. As data for validation comes from different models/bioassays—normalised with score distribution of active and inactive compounds—it becomes very instable with such small number of datapoints. The global validation produced a very good overall AUC-ROC values between 0.831 (SVM) and 0.873 (Naive Bayes) (Supplementary data Figure S5 and Table S2).

In Supplementary data Table S3 and Figure 6 are showed the ranking of PubChem predicted activities and in Supplementary data Table S4 is showed the Active-IT pre- dicted activities considering both machine learning approaches used in this work. The flavonoid presented high probability (position 1 in 800 classes) to have activity on Steinert myotonic dystrophy type 1 (DM1), a dominant autosomal disease caused by dynamics mutations (Chau and Kalsotra 2015). DM1 is characterised by some alterations such as muscle hyperexcitability myotonia, muscular dystrophy, hypogonadism and electrocardiographic alterations.

Considering the number of targets related to antitumoral activity and the classification on *in silico* study (Active-IT, Supplementary data Table S5 and PASS, Supplementary data Table S6), there is a high probability of identified substances on this study present cytotoxic activity on non-tumoral and tumoral cells. Many articles can be found in literature describing the antitumor activity of flavonoid compounds of *H. lupulus* (Miranda et al. 1999; Nwodo et al. 2016) what is in line with antitumor activity predicted by *in silico* tools.

According to Active-IT prediction, the extracts/isolated substances could present cytotoxic activity on cell line A549, human adenocarcinoma (position 4 in 800); acute myeloid leukemia (position 10 in 800); neuroblastoma (position 44 in 800); human liver cancer cell line, HEPG-2 (position 47 in 800); rat fibroblast (position 7 in 800); human fibroblast (position 13 in 800) and subcutaneous connective tissue (position 17 in 800). Based on predicted data, the antitumoral activity could be associated to targetinteraction as RECQ-1 (gene related to ATP-dependent DNA helicase Q1

enzyme, related to repair DNA protein production, predisposition to malignity and chromosomal instability, position 16 in 800), Bloom syndrome protein (protein related to SW1/SNF, 11/800 gene), to SW1/SNF gene (SWItch/Sucrose Non-Fermentable, position 27 in 800), histone H2A.x (position 33 in 800) e GLI family zinc finger 1 (position 35 in 800).

The extracts were cytotoxic against tumoral cell line and stimulate the cell growth to non-tumoral cell line. EB and SEM stimulated the MRC-5 cell line growth as of 25.0 µg/mL, presenting high cell viability even on highest concentration tested (ca 565%, for EB and ca 296%, for SEM). The SH sub extract stimulates the cell growth as of 25.0 µg/mL until 200.0 µg/mL (CC50=1028.80 µg/mL) (Supplementary data Figure S7a). The EB reduces T24 cell line viability as of 800 µg/mL (CC50=600.82 µg/mL) and the SH and SEM sub extracts reduces the cell growth as of 1200 µg/mL, presenting CC50 values over 1200 (ca 74%) and 1139.01 µg/mL, respectively (Supplementary data Figure S7b). The EB did not cause the cell death of T24 cell line, even after 24 h of treatment with doses of 800.0 µg/mL. Supporting on these data, the reduction of cell viability evolves mechanisms that do not induces cell death by interference on cell cycle. On treatment with SEM, the number of T24 cell line were observed on G2/M phases, on 24 h of treatment with concentrations as from 200.0 µg/mL decreases, stopping on S phases, possible interfering on DNA replication (Supplementary data Figure 8). The treatment with EB or SEM stimulates the cell proliferation of MRC5 cell line, without interference on cell cycle, do not increasing sub-G1 content (Supplementary data Figure 9). Its need to bear in mind that the predictions were made on isolated compounds, while the crude extracts were used in the experiments.

Although the antitumor activity of flavonoid compounds have been described before, and supported by *in silico* tools, the activities shown by SH and SEM extracts were low. However, we need to bear in mind that the predictions were made on iso- lated compounds, while the crude extracts were used in the experiments.

3. Conclusion

The results obtained have evidenced the pharmacological and biotechnological poten- tial of *H. lupulus* leaves that constitute a source of bioactive compounds.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), (Finance code 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships in the program 'Science without Border' (JCDL and VLA).

Disclosure statement

The authors declare that that are no competing interests.

ORCID

Glenda Nicioli da Silva  <http://orcid.org/0000-0001-9751-3379>

References

- Chau A, Kalsotra A. 2015. Developmental insights into the pathology of and therapeutic strategies for DM1: back to the basics. *Dev Dyn.* 244(3):377–390.
- Columbus OH. 2007. SciFinder Scholar, version 2007. Chemical Abstracts Service.
- de Oliveira MLG, Assenco RAG, Silva GDF, Lopes JCD, Lanna MCS, Magalhães JC, Duarte LP, Filho SAV. 2014. Citotoxicity, Antipoliavirus activity and *in silico* biological evaluation of constituents of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *Int J Pharm Pharm Sci.* 6:130–137.
- Lagunin A, Filimonov D, Poroikov V. 2010. Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS. *Curr Pharm Des.* 16(15):1703–1717.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. *The systematic identification of flavonoids.* New York: Springer.
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR. 1999. Cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 37(4):271–285. (99)00019-8.
- Nwodo JN, Ibezim A, Conrad V, Simoben CV, Ntie-Kang F. 2016. Exploring cancer therapeutics with natural products from african medicinal plants, part II: alkaloids, terpenoids and flavonoids. *Anticancer Agents Med Chem.* 16(1):108–127.
- Qing X, Lee XY, De Raeymaecker J, Tame J, Zhang K, De Maeyer M, Voet A. 2014. Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery. *J Recept Ligand Channel Res.* 7:81–92.
- Rocha MP, Campana PRV, Scoaris DO, Almeida VL, Lopes JCD, Shaw JMH, Silva CG. 2018. Combined *in vitro* studies and *in silico* target fishing for the evaluation of the biological activities of *Diphylleia cymosa* and *Podophyllum hexandrum*. *Molecules.* 23(12):3303.

Supplementary material

***In silico* pharmacological prediction and cytotoxicity of flavonoids glycosides identified by UPLC-DAD-ESI-MS\MS in extracts of *Humulus lupulus* leaves cultivated in Brazil**

Regislainy Gomes da Silva^a, Tamires Cunha Almeida^b, Adriana Cotta Cardoso Reis^c, Sidney Augusto Vieira Filho^c, Geraldo Célio Brandão^c, Glenda Nicioli da Silva^b, Hildeberto Caldas de Sousa^d, Vera Lúcia de Almeida^e, Julio César Dias Lopes^f and Gustavo Henrique Bianco de Souza^{a,c*}

^a*Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.* ^b*Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.* ^c*Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.* ^d*Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.* ^e*Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica, FUNED, Belo Horizonte, Brazil.* ^f*Chemoinformatics Group (NEQUIM), ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

*Corresponding author: guhbs@yahoo.com.br

Table of contents:

Experimental Section	4
Figure S1	Chromatogram of ethanolic extract (EB) obtained from <i>H. lupulus</i> leaves.....	11
Figure S2	Chromatogram of hydromethanolic sub-extract (SEM) obtained from <i>H. lupulus</i> leaves.....	12
Table S1	Flavonoids identified through UPLC-DAD-MS/MS technique on crude ethanolic extract (EB) and hydromethanolic subextract (SEM) obtained of <i>H. lupulus</i> leaves.....	13
Table S2	Summary of the results obtained in the validation using the compounds rutin, astragalin and nicotiflorin together with the global validation.....	14
Table S3	Diseases and genes described in PubChem associated with flavonoids identified in the ethanolic extract and hydromethanolic subextract of <i>H. lupulus</i> leaves.....	15
Table S4	Descriptions of best biological activities predicted by SVM and Bayes.....	18
Figure S3	Scheme of the procedure adopted for the prediction of biological activities of flavonoids 1 to 8 detected in polar extracts from <i>H. lupulus</i> leaves (Colored only in online version).....	33
Figure S4	Different representations of hyperin (5) used in the 3D-Pharma software (Colored only in online version)	33
Figure S5	ROC curve (TPR versus FPR) used for the validation of flavonoids astragalin (1), nicotiflorin (2), hiperin (5) and rutin (6) found in polar extracts from <i>Humulus lupulus</i> leaves (Colored only in online version).....	34
Figure S6	Word cloud with the most cited diseases found on PubChem for the analyzed flavonoids. The font size is related to the citation number (Colored only in online version).....	34
Table S5	Ethnopharmacological use of <i>Humulus lupulus</i> , biological activities of extracts and isolated compounds, predicted activities using Active-IT system.....	35
Table S6	<i>In silico</i> prediction of potential biological activities of compounds 1-8 identified on crude ethanolic and hidromethanolic extracts of <i>Humulus lupulus</i> leaves using <i>PASS online</i> tool.	37
Figure S7	Percentage of viable cells (logarithm scale), 24 hours after treatment with ethanol extract (EB), hexane (SH) and	

	hydromethanol (SEM) subextracts obtained from <i>Humulus lupulus</i> leaves using MRC-5 (A) and T24 (B) cell lines. Each point represents the experiment mean on triplicate ($p < 0,05$).....	37
Figure S8	Percentage of T24 cells on mitotic phases G0/G1, S and G2M, after treatment with crude ethanolic extract (EB) and hydromethanolic (SEM) sub extracts obtained from <i>Humulus lupulus</i> leaves. The results are expressed as mean \pm standard deviation of triplicate (Colored only in online version).....	38
Figure S9	Percentage of MRC5 cells on mitotic phases G0/G1, S and G2M, after treatment with ethanol extract (EB) and hydromethanol (SEM) subextracts obtained from <i>Humulus lupulus</i> leaves. The results are expressed as mean \pm standard deviation of triplicate (Colored only in online version).....	38
Additional References	39

Experimental Section

Plant material

Leaves of *H. lupulus* were collected on a farming area near to Vale do Gamarra, Baependi (21° 57' 32" S 44° 53' 24" O), Minas Gerais, Brazil, managed by the producer Klaus Dietrich Guth. An exsiccate (OUPR 29768) of this specie was deposited on Prof. José Badini *Herbarium*, Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brazil, SISGEN n° A07DBB0. After dried at room temperature (r.t.), the leaves were fragmented on a knife mill.

Preparation of extracts

The fragmented *H. lupulus* leaves (600 g) were submitted to percolation process in 4 L of ethanol 92.8° (Isofar®), at r.t., during 12 days. Every 2 days, the percolated was collected and filtered, and concentrated at 40 °C using a rotary evaporator, coupled to vacuum controller V-850/vacuum pump V-700 (BUCHI®). To remove residues of the extractor solvent, the material from each percolation was kept under vacuum, on a desiccator. By this process was obtained the crude ethanolic extract (EB, 60 g, 10% yield). Aiming to eliminate the non-polar constituents, part of EB (30 g) was dissolved on 300 mL of methanol Synth® and water (6:4) and the resultant solution was partitioned with hexane Impex® 100 mL. After evaporation of solvents, were obtained the hexanic (SH, 10.5 g, 35%) and hidromethanolic (SEM, 19.5 g, 65%) subextracts.

Identification of metabolites by UPLC-DAD-MS/MS

EB (5.0 mg) e SEM (5.0 mg) were dissolved on methanol and filtered on microfilter 0.2 µm. Chromatographic separation was performed in ACQUITY UPLC HSS RP-18 (1.7 µm, 50 × 2mm i.d.) (Waters). The mobile phase consisted of water 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile 0.1% formic acid (solvent B). The elution protocol was 0–11 min and linear gradient from 5 to 95% B. The flow rate was 0.3mL/min, and the sample injection volume was 4.0 µL. Analyses were performed using an ACQUITY UPLC (Waters) ion trap mass spectrometer in the following conditions: positive and negative ion mode; capillary voltage, 3500 V; capillary temperature, 320°C; source voltage, 5 kV; vaporizer temperature, 320°C; corona needle current, 5 mA; and sheath gas, nitrogen, 27 psi. Analyses were run in the full scan mode (100–2000 Da). The ESI-MS/MS analyses were performed in an ACQUITY UPLC (Waters) system using argon as collision gas, at 30 eV. The UV spectra of extracts were registered from 190 to 450 nm as suggested by Gontijo et al. (2017).

In silico prediction of targets and biological activities

In order to predict the potential biological activities of flavonoids in the EB and SEM extracts, the glycosylated flavonoids structures identified by UPLC-DAD-MS/MS (Fig. S3) were searched on PubChem for treatment with the program 3DPharma to generation of pharmacophore fingerprints and further analyses using Active-IT system. The flavonoids found in PubChem Compound database are enumerated in Table S3, together with its PubChem Compound identification number (CID) and a list of diseases and genes associated with them by PubChem. To exhibit the most cited diseases found on PubChem for the flavonoids, a word cloud was built (Figure S6) where the font size is related to the number of citations.

To construct the models, the potential 3-point pharmacophores obtained by the *in-house* 3D-Pharma software were used to establish the vectors that were subsequently used to build the predictive models. The full description of the method has been published elsewhere (Rocha et al. 2018a and 2018b) and we will present here only the key features. According to our methodology each conformation of the compound was treated separately, and its heavier atoms were converted to potential pharmacophoric points (PPP), which may be one or more of the six types: hydrogen bond donor, hydrogen bond acceptor, positively charged, negatively charged, aromatic and lipophilic. For each conformation, calculated with OMEGA software (Hawkins et al. 2012), all combinations of three points of the potential pharmacophores in 3D space were calculated to compose a binary vector (Figure S7). The union of the uni-conformational vectors produces a unique modal fingerprint for each compound (Wang et al. 2018). The multiconformational (modal) vectors of active and inactive compounds of each data set (obtained from PubChem and others sources) were submitted to the our *in house* ExCVBA (Extensive Cross-Validation and Bootstrap Application) software (Santos et al. 2015) to build and validate machine learning models using the support vector machine (SVM) and Naïve Bayes approaches. Each data set was used to produce predictive models using the two methods, through recurrent stratified random partition of the original data set to produce a training set composed of 70% of the original data set and a validation set composed of 30%. This procedure was repeated at least 30 times and the mean scores of each compound were used to evaluate the modeling performance with the area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC), as well as to predict the activity of new compounds. The calculation of AUC-ROC was performed according to equation (1) with the sum of the classification of active compounds, which is also called Mann-Whitney U test.

$$AUC = 1 - \frac{1}{N_a} \sum_{j=1}^{N_a} \frac{(r_j - j)}{N_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

where r_j is the rank of active j^{th} , N_a and N_i are the number of active and inactive compounds, respectively. When ties occur between actives and inactives the ranking classification was dimensioned by interpolation to avoid any bias.

The SVM models were built using LibSVM software (Hanley and McNeil, 1982) with linear kernel option. To ensure early recovery of active compounds, the cost C , which is a penalty parameter applied to poorly classified compounds in the training data, was selected with exponentially increasing sequences from 2^{-12} to 2^{+6} , by means of a 5-fold cross-validation (CV) using Power Metrics (PM) as objective performance metric (Lopes et al., 2017; De Winter and Lopes, 2018) with in $\chi = \text{TPR} + \text{FPR} = 0.5$. The Naïve Bayes model was obtained using the Perl Module of the CPAN repository (Chang and Lin, 2011), which was incorporated into the ExCVBA software.

To predict biological activities, the multiconformational (modal) fingerprints of the studied compounds were submitted to the Active-IT system, using 2000 available bioactivity ensemble models and two methods of machine learning, SVM and Naives Bayes. The average raw scores obtained were converted into probabilities by comparison with the score distribution of active and inactive compounds used to construct the models (validation sets only), producing a measure of belonging to these two subsets (Filimonov et al. 2014). Considering the SVM or Naive Bayes score of the studied compound as a threshold, the probability of being active (Pa) is equal to the fraction of active compounds with worse score (FNR) than the prediction compound (Equation 2) and the probability of being inactive (Pi) is equal to the fraction of inactive compounds with better score (FPR) than the prediction compound (Equation 3):

$$Pa = \frac{FN}{N_a} = FNR \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Pi = \frac{FP}{N_i} = FPR \quad (\text{Eq. 3})$$

where, N_a and N_i , represent the number of active compounds and the number of inactive compounds; FN is the number of active compounds with worse scores than the threshold; and FP is the number of inactive compounds with better scores than the threshold. For each set of models,

the difference between Pa and Pi ($Pa-Pi$) was used to evaluate the potential activity of the modeled compounds. Although the $Pa-Pi$ variance, as well as its limits, can be analytically derived from the Pa and Pi variances, as previously described by Rocha et al. (2018b), a new approach was used in this work, as described below. The variance of SVM or Naive Bayes scores of each compound when it appears in the validation sets and the standard error of the mean (SEM) (Equation 4) were used to achieve the best estimate of the prediction limits:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (\text{Eq. 4})$$

where SD is the standard deviation, defined as the square root of variance. Thus, the limits of the scores, calculated at 95% of confidence interval, were estimated by equation 5:

$$score_{limits} = score_{mean} \pm t_{95\%} * SEM \quad (\text{Eq. 5})$$

The mean score values were used to calculate the mean value of Pa and Pi , while the maximum and minimum values were used to estimate their upper and lower limits. In the prediction phase, the scores of each new compound over all 30 models of the ensemble are averaged and the limits are calculated with 95% of confidence interval. The mean score was used to calculate the $Pa-Pi$ mean from the mean Pa value minus the mean Pi value. The upper and lower limits of $Pa-Pi$ were calculated as follow: the highest Pa value minus the lowest Pi value lead to the upper limit of $Pa-Pi$, while the lowest Pa value minus the highest Pi value lead to the lowest $Pa-Pi$ value. The limits of the $Pa-Pi$ calculated in this way provide a better confidence interval of the prediction, although greater than the analytical estimate it is more useful, because it can be used as an approximation of the applicability domain, in the same way the proposition of Norinder et al. (2014). If the compound under analysis is similar to an outlier the score variation on all 30 models can be very large and this will reflect in the range of $Pa-Pi$ values. If the lowest value of $Pa-Pi$ falls below zero, the compound cannot be predicted as active.

Then, the structures of flavonoids **1** to **8** were downloaded from PubChem Compound database and treated using the 3D-Pharma program for generation of the pharmacophore fingerprints. Afterward, the prediction of potential activities was performed in the Active-IT system, using 2000 available models and two machine learning methods, SVM and Naive Bayes. For a proper validation of the methodology, the known activity data and the predictions made for the

compounds **1** to **8** were used. The validation procedure requires a number of PubChem bioassays that have already been modeled in the Activity-IT system. This was the case for flavonoids astragalín (**1**), nicotiflorín (**2**) and rutin (**6**), with just one bioassay for hyperin (**5**). The former three compounds were validated separately and the ensemble were also validated. The results of the validation are shown in Table S2. The validation was also used to define the *Pa-Pi* cutoff points, establishing the most probable biological activities for each compound. The cut-off values of 0.7 for SVM and 0.8 for Naive Bayes were used, so for each target or biological activity only compounds with predicted *Pa-Pi* values higher than the cut-off value were considered. In this calculation, 1987 activity models were used for SVM and 1925 for Naive Bayes, all with AUC validation greater than 0.5. The use of both modeling methods on planning activities leads to a result that are more robust.

The name of each compound, the diseases and genes related to these compounds available in the literature (PubChem) are shown in Table S3 and Figure S5. The associations were performed by automatic searches in PubMed, without manual curation, and there is no guarantee that the association is actually valid. Therefore, it is suggested to confirm then by more thorough searches. However, these data will facilitate the analysis of results and help in the validation of the methodology used. To perform the predictions, it is necessary that the 3D structures and their conformations are available in PubChem. This was not the case with robinin (**4**, CID=5281693) and manghaslin (**8**, CID=11498684) compounds. For these compounds, the excessive number of free rotation bonds does not allow their conformations to be calculated according to the PubChem protocol.

The software *PASS online* predicts simultaneous biological activities based on the chemical structure of the compounds, and the possibility of compound be active (*Pa*) or inactive (*Pi*) (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>). The 2D chemical structures of identified compounds were drawn and inserted on PASSonline to carry out the prediction by comparison with the biological activities available on its database. The predictions are expressed by difference (*Pa-Pi*) (Lagunin et al. 2000).

The potential biological activities of compounds **1** a **8** (Fig. S3), predicted by PASSonline program are listed on Table S5. (*Pa-Pi*) values next to 1 means higher probability of the compound be active against analyzed biological activity (de Oliveira et al. 2014).

Citotoxicity

To evaluate the citotoxicity of *H. lupulus* extracts, were used the cell lines MRC-5 (normal human fibroblast cell line derived from fetal lung and it was kindly donated by Prof. Dr. Luiz Orlando

Ladeira of the Department of Physics of the Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais) and T24 (bladder carcinoma, acquired from Cell Bank of Rio de Janeiro). The cell lines MRC5 e T24 were cultivated on culture medium DMEM, supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin G, 100 U/mL streptomycin and 2.5 µg/mL of amphotericin B. All the cell lines were kept at 37° C, 5 % CO₂ atmosphere.

Citotoxicity and cell proliferation

The cell lines T24 and MRC5 were plated on 96 wells microplate (1×10^4 cells/well). After 24 hours, these cells were treated with different concentrations of extracts, 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1000 e 1200 µg/mL for 24 hours. Non-treated cells were used as negative control and cells treated with DMSO 2% were used as solvent control. After treatment, the cells were washed with Hanks solution (0.4 g de KCl; 0.06 g de KH₂PO₄; 0.04 g de Na₂HPO₄; 0.35 g de NaHCO₃; 1 g glucose and 8 g NaCl on 1 L water). Then, was added 12 µL of 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) on each well and after 90 minutes, the plate was read at 450 nm (read values of absorbance proportional to quantity of viable cells). The tests were carried on triplicate. The percentual of viable cells was calculated using the equation:

$$\text{Viable cells (\%)} = \frac{\text{Sample absorbance media}}{\text{Control absorbance media}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Cell cycle kinetics

The cell lines MRC5 and T24 were plated on 12 wells microplate (2×10^5 cells/well). After 24 hours of incubation at 37 °C, 5 % CO₂ atmosphere, the cells were treated, during 24 hours, with extracts of *H. lupulus* at 200.0, 400.0 and 800.0 µg/mL. Non-treated cells and non-marked cells were used as control. After 24 hours, the supernatant was collected, transferred to Falcon tube and centrifugated for 10 minutes. The cells were washed with Hanks solution and then, added 500 µL trypsin. Then, were added 500 µL trypsin inhibitor and the solution was centrifugated for 10 minutes at 1200 rpm and the supernatant was discarded. The residue was treated with 500 µL ethanol 70 %, keeping on freezer. After 24 hours, the solution was centrifugated at 1200 rpm for 10 minutes, discarding the supernatant. The residue was washed with 1 mL Hanks solution and each sample was transferred to a tube of flow cytometer FACSCalibur. After centrifugation, the Hanks solution was discarded. The cells were resuspended in 200 µL propidium iodide solution (0.0914 g magnesium chloride, 0.0774 g sodium citrate, 0.04766 g of Gibco HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) a zwitterionic buffering agent, 10 µL Triton, 250 µL propidium iodide solution 1 mg/mL and 9740 µL distilled water) adapted from Galbraith et al.

(1983). After incubation for 30 minutes under the light, the percentual of cells on G0/G1, S, G2/M phases was measured using the flow cytometer FACSCalibur, 20000 events, by FlowJo[®]. The experiments were conducted on triplicate.

Statistical Analyzes

The results obtained for the cell lines MRC5 and T24 were evaluated by ANOVA and Dunnett's test using the GraphPad Prism 5.0 software.

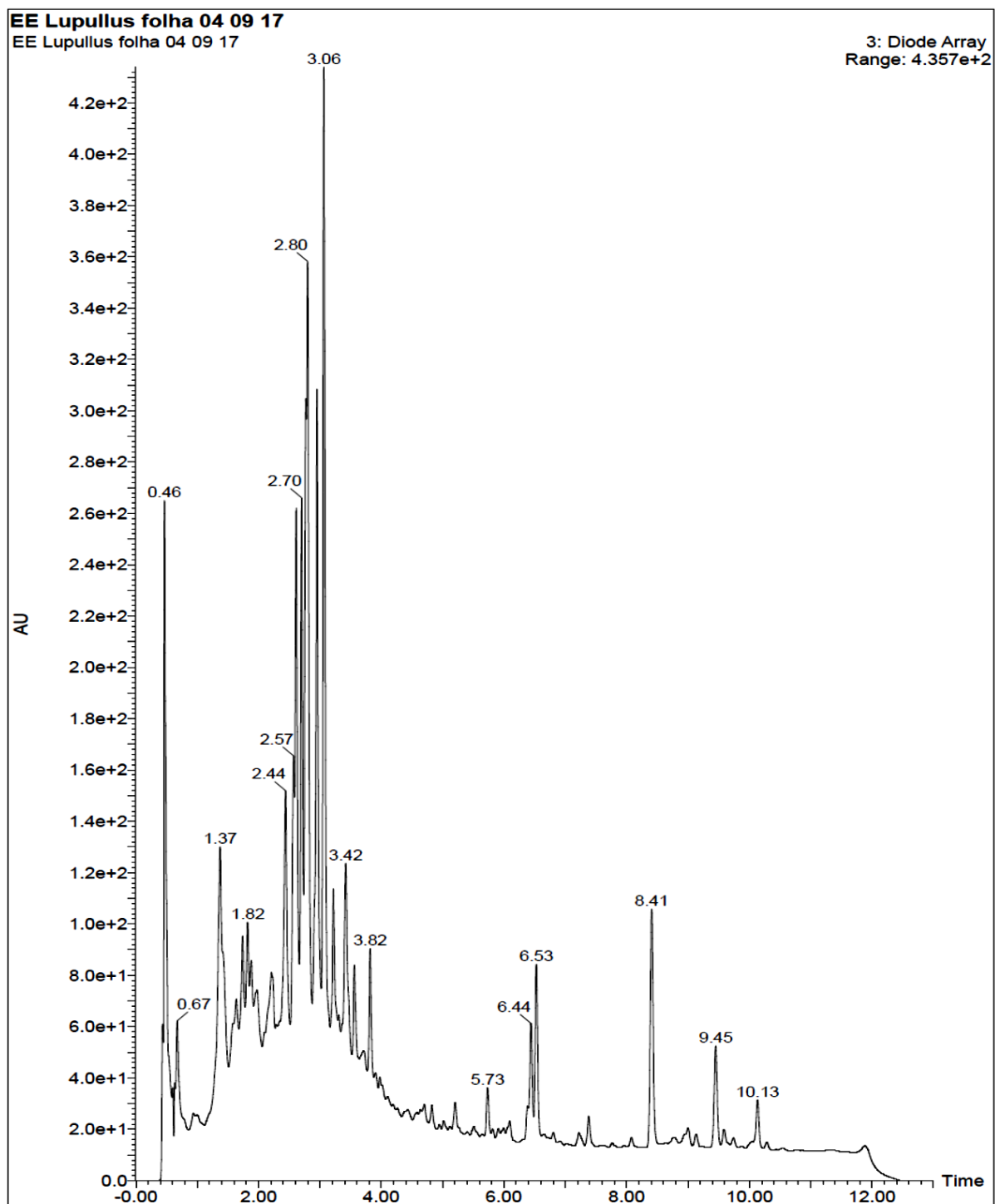


Figure S1: Chromatogram of ethanolic extract (EB) obtained from *H. lupulus* leaves.

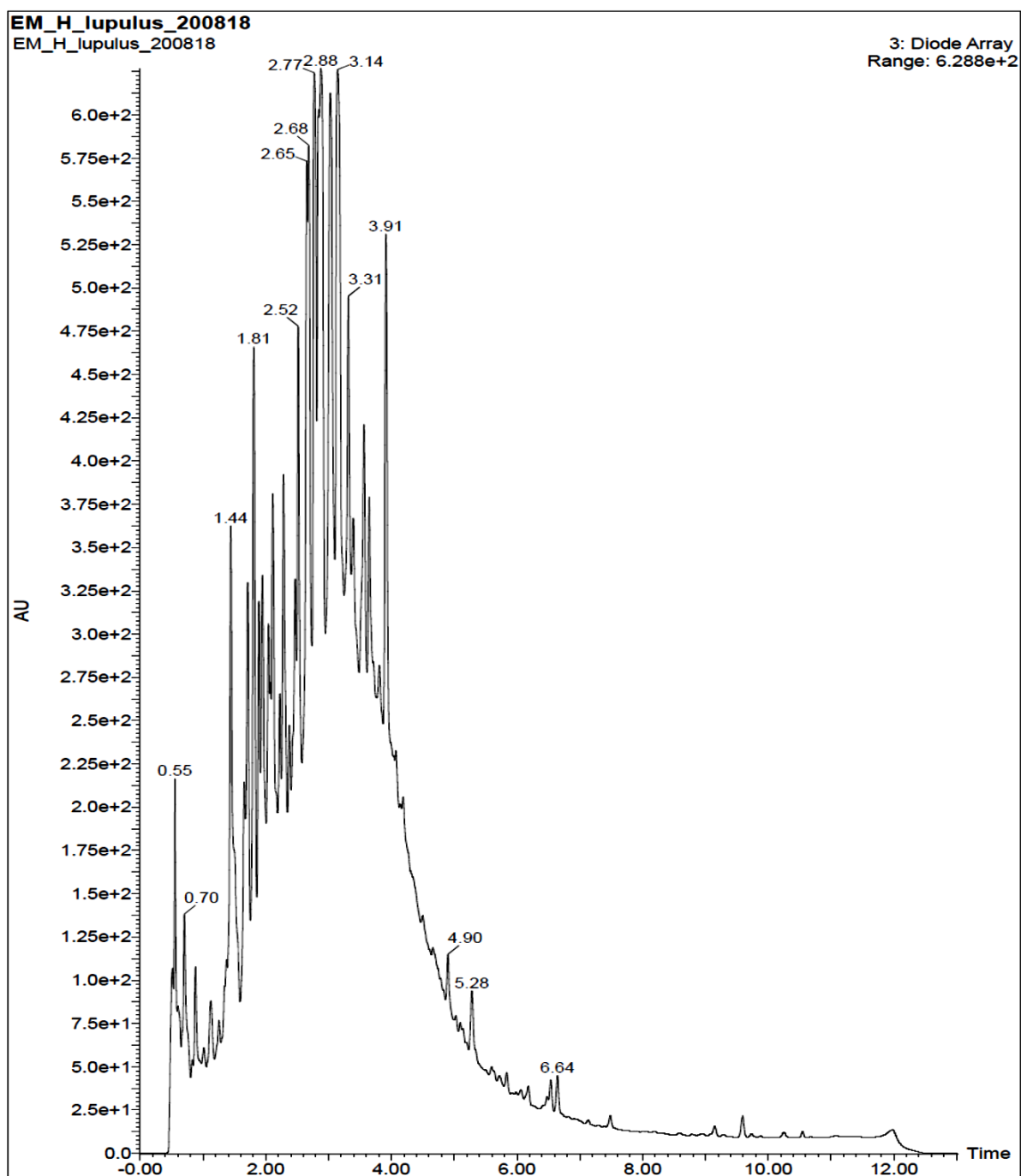


Figure S2: Chromatogram of hydromethanolic sub-extract (SEM) obtained from *H. lupulus* leaves.

Table S1: Flavonoids identified through UPLC-DAD-MS/MS technique on crude ethanolic extract (EB) and hydromethanolic subextract (SEM) obtained of *H. lupulus* leaves

Flavonoids	RT (min)	UVmax (nm)	UPLC-MS (<i>m/z</i>)		Reference
			[M + H] ⁺	[M + H] ⁺ Fragment	
(1) Astragaline	3.14	265, 345	447	(449) 287	Farag et al. (2012 ¹)
(2) Nicotiflorin / Kaempferol-7- <i>O</i> - rutinoside	2.99	256, 352	593	(595) 287	Chadwick (2004 ¹)
(3) Kaempferol-7- <i>O</i> - rutinoside / Nicotiflorin	2.83	265, 345	593	(595) 287	Negri et al. (2010 ^{1,2})
(4) Robinin	2.68	255, 351	739	741 (595; 449)	Sägesser and Deinzer (1996 ^{1*})
(5) Hyperin	2.89	265, 345	463	465 (303)	Fang et al. (2009 ^{2,3})
(6) Rutin / Quercetin 7- <i>O</i> -rutinoside	2.73	255, 351	609	611 (303; 465)	Farag et al. (2012 ¹)
(7) Quercetin 7- <i>O</i> - rutinoside / Rutin	2.63	264, 345	609	611 (303;465)	Sägesser and Deinzer (1996 ^{1*})
(8) Manghaslin	2.48	255, 347	755	757 (303)	Nakamura et al. (2018 ⁴)

H. lupulus parts: ¹Female inflorescences, ²leaves, ³staim, ⁴non-specified; * related, but don't identified.

Table S2: Summary of the results obtained in the validation using the compounds rutin, astragalin and nicotiflorin together with the global validation

Compound	Method	Active	Inactive	AUC-ROC
(1) Astragaline	SVM	4	4	1.000
(2) Nicotiflorin	SVM	1	4	1.000
(6) Rutin	SVM	6	151	0.727
Global	SVM	11	160	0.831
(1) Astragaline	Bayes	4	4	0.750
(2) Nicotiflorin	Bayes	1	4	0.250
(6) Rutin	Bayes	6	151	0.821
Global	Bayes	11	160	0.873

AUC-ROC = Area under the receiver operating characteristic curve.

SVM = Support Vector Machine

Table S3: Diseases and genes described in PubChem associated with flavonoids identified in the ethanol extract and hydromethanol substract of *H. lupulus* leaves.

Compound (CID*)	Diseases described in PubChem	Genes described in PubChem
Astragaline (1) (5282102)	Inflammation, cancer, diabetes mellitus, dermatitis, hepatitis, cardiovascular diseases, edema, hyperglycemia, ulcer, asthma, breast neoplasms, hepatocellular carcinoma, hypoglycemia, infection, ischemia, glucose intolerance, hepatocellular carcinoma, dermatitis, diabetes mellitus type 2, hypersensitivity, liver diseases, obesity, soft tissue injuries	Tumor necrosis factors, interleukin 6, akt serine/threonine kinase 1, apoptosis regulator, insulin, inositol-3-phosphate synthase 1, catalase, interleukin 4, lipase g, endothelial type, interleukin 13.
Nicotiflorin (2) (5318767)	Neoplasms, diabetes mellitus, ischemia, pain, edema, infarction, inflammation, obesity, hypoxia, cerebral ischemia, hypertension, hypoglycemia, infection, neurologic manifestations, stroke, blood platelet disorders, breast neoplasms, callosities, cerebrovascular disorders, dermatitis, diabetes mellitus type 2, fever.	Inositol-3-phosphate synthase 1, peroxime proliferator activated receptor alpha, caspase 3, insulin, pancreatic lipase, α -glucosidase, acid, tyrosinase, tumor necrose fator, akt serine/threonine kinase 1, interleukin 6.
Kaempferol-7-O-rutinosideo (3) (102225228)	No disease described	Farnesyl diphosphate syntase, golgin b1, limonene 3-hydroxylase, mentofuransyntase, pulegonereductase.
Robinin (4) (5281693)	Breast neoplasms, neoplasms, albinism, alcohol withdrawal delirium, alcoholism, anemia, arthritis, colorectal neoplasms, diabetes	Tumor necrosis factor, interleukin 6, insulin, interferon λ receptor 1, cyclin-dependent kinase

	mellitus, heart diseases, inflammation, lymphoma, syphilis, glucose intolerance, carcinogenesis, cardiotoxicity	inhibitor 2a, proto-oncogene, nf-kb subunit, granzym b, inositol-3-phosphate synthase 1, tumor protein p53.
Hyperin (5) (5281643)	Inflammation, neoplasms, diabetes mellitus, depressive disorder, edema, hyperglycemia, cardiovascular disease, hepatitis, pain, hypertension, infection, kidney disease, ischemia, liver disease, diabetes complications, diabetes mellitus type 2, diabetic nephropathies, atherosclerosis, chemical-induced liver damage and medication, colon cancer, heart disease, hemolysis, hypotension, obesity, diarrhea, mental disorders, weight loss, malnutrition, infection, autoimmune diseases, communicable diseases, renal diseases, neoplasms, urinary tract infections, weight gain, sepsis, muscle weakness, metabolic syndrome, lysosomal acid lipase deficiency	Tumour necrosis factor 1, caspase 3, bcl2, apoptosis regulator, interleukin 6, catalase, insulin, heme oxygenase 1, akt serine/threonine quinase 1, caspase 9, mitogen-activated protein kinase.
Rutin (6) (5280805)	Neoplasms, inflammation, diabetes mellitus, edema, carcinogenesis, cardiovascular diseases, pain, breast cancer, renal diseases, hypertension, infection, neurodegenerative diseases, atherosclerosis, albinism, necrosis, obesity, ischemia, Alzheimer's disease, colon cancer, hepatitis, hyperglycemia, liver damage induced by chemicals and drugs, hepatocellular carcinoma, thrombosis	Tumor necrosis factor, catalase, interleukin 6, caspase 3, albumin, insulin, akt serine/threonine kinase 1, inositol-3-phosphate synthase 1, bcl2, apoptosis regulator, myeloperoxidase.

Quercetin 7- <i>O</i> - rutinoside (7) (101764560)	No disease described	No gene described
Mangaslin (8) (11498684)	Cardiomegaly, hypertension, malária	Tumor necrosis factor, AChE.

*CID = PubChem Compound identification number.

Tabela S4: Descriptions of best biological activities predicted by SVM and Bayes

Order	Biological Activity	best model AID	Description
1	muscleblind-like protein 1	493199	Dystrophia myotonica 1 (DM1). A muscular disorder characterized by myotonia, muscle wasting in the distal extremities, cataract, hypogonadism, defective endocrine functions, male baldness and cardiac arrhythmias. Function: There are 21 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to a disease (Myotonic dystrophy)
2	Trypanosoma	743060	Chagas' disease; Trypanolytic infections
3	Plasmodium falciparum	624177	Malaria
4	Anticancer, Lung Tumor	278	A549 Human Adenocarcinoma of Lung
5	Anti-Inflammatory, NF-kappa-B	895	NFkappaB Translocation. Many cellular pathways leading to activation of NF-kB-family transcription factors have been identified to be participating in host-defense, immunity, inflammation, and cancer. NF-kappa-B is a pleiotropic transcription factor present in almost all cell types and is the endpoint of a series of signal transduction events that are initiated by a vast array of stimuli related to many biological processes such as inflammation, immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis and apoptosis. NF-kappa-B is a homo- or heterodimeric complex formed by the Rel-like domain-containing proteins RELA/p65, RELB, NFKB1/p105, NFKB1/p50, REL and NFKB2/p52 and the heterodimeric p65-p50 complex appears to be most abundant one. The dimers bind at kappa-B sites in the DNA of their target genes and the individual dimers have distinct preferences for different kappa-B sites that they can bind with distinguishable affinity and specificity. Different dimer combinations act as transcriptional activators or repressors, respectively. NF-kappa-B is controlled by various mechanisms of post-translational modification and subcellular compartmentalization as well as by interactions with other cofactors or corepressors. NF-kappa-B complexes are held in the cytoplasm in an inactive state complexed with members of the NF-kappa-B inhibitor (I-kappa-B) family. In a conventional activation pathway, I-kappa-B is phosphorylated by I-kappa-B kinases (IKKs) in response to different activators, subsequently degraded thus liberating the active NF-kappa-B complex which translocates to the nucleus. Function: There are 1292 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Bone Cysts, Aneurysmal; Incontinentia Pigmenti; Epiretinal Membrane; Multiple Trauma; Lymphoma, T-Cell, Peripheral; Shock; Polymyalgia Rheumatica ; Microcephaly; Neoplasms, Squamous Cell (including: Carcinoma, Squamous Cell) ; Giant Cell Arteritis ; Ischemia; Barrett Esophagus; Diabetes, Gestational; Vascular Diseases (including: Atherosclerosis; Diabetic Retinopathy; Giant Cell Arteritis; Myocardial Infarction; Vasculitis; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Cervical Intraepithelial Neoplasia; Burkitt lymphoma; Diabetic Retinopathy; Genetic Diseases, Inborn (including: Incontinentia Pigmenti); Heart Failure; Cell Transformation, Viral; Endometriosis; Helicobacter Infections; Laryngeal Neoplasms; Bone Neoplasms; Inflammatory Bowel Diseases (including: Colitis, Ulcerative; Crohn Disease) ; Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL

			Positive; Neovascularization, Pathologic; Lymphoproliferative Disorders (including: Burkitt lymphoma; Hodgkin Disease; Leukemia, B-Cell, Chronic; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Atherosclerosis ; Hodgkin Disease ; Disease Susceptibility (including: Genetic Predisposition to Disease) ; Chromosome Aberrations (including: Translocation, Genetic); HIV Infections; Mental Retardation; Cholesterol, HDL/blood* ; Head and Neck Neoplasms (including: Esophageal Neoplasms; Laryngeal Neoplasms; Thyroid Neoplasms) ; Neoplasm Invasiveness; Uterine Cervical Neoplasms; Hematologic Diseases (including: Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL Positive; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Recurrence ; Parkinson disease ; Occupational Diseases ; Kidney Neoplasms (including: Carcinoma, Renal Cell) ; Skin Neoplasms; Myocardial Infarction; Neuroblastoma; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell (including: Leukemia, B-Cell, Chronic) ; Inflammation ; Multiple Sclerosis; Celiac disease ; Lupus Erythematosus, Systemic ; Disease Progression ; Diabetes Mellitus, Type 1 ; Arthritis, Rheumatoid ; Carcinoma (including: Adenocarcinoma; Carcinoma, Renal Cell; Carcinoma, Squamous Cell; Cervical Intraepithelial Neoplasia) ; Stomach Neoplasms; Ovarian Neoplasms; Colorectal Neoplasms (including: Colonic Neoplasms; Rectal Neoplasms) ; Prostatic Neoplasms; Neoplasms (including: Bone Cysts, Aneurysmal; Bone Neoplasms; Breast Neoplasms; Burkitt lymphoma; Carcinoma; Cell Transformation, Viral; Esophageal Neoplasms; Head and Neck Neoplasms; Hodgkin Disease; Neoplasm Invasiveness; Neoplasms, Squamous Cell; Ovarian Neoplasms; Precancerous Conditions; Skin Neoplasms; Thyroid Neoplasms; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Breast Neoplasms). TTD-Diseases: Cancer; Type 2 diabetes
6	regulator of G-protein signaling 16	1838	regulator of G-protein signaling 16. Regulates G protein-coupled receptor signaling cascades. Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits, thereby driving them into their inactive GDP-bound form. Plays an important role in the phototransduction cascade by regulating the lifetime and effective concentration of activated transducin alpha. May regulate extra and intracellular mitogenic signals. Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits thereby driving them into their inactive GDP-bound form. Binds to G(i)-alpha and G(o)-alpha, but not to G(s)-alpha. May play a role in regulating the kinetics of signaling in the phototransduction cascade. Function: There are 28 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Asthma; Cell Transformation, Neoplastic; Colorectal Neoplasms; Gastrointestinal Neoplasms)
7	Citotoxicity, NIH3T3	541	Organism: <i>Mus musculus</i> , mouse / Cell Type: fibroblast / Tissue: embryo.
8	regulator of G-protein signaling 19	1884	Regulates G protein-coupled receptor signaling cascades. Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits, thereby driving them into their inactive GDP-bound form (PMID:11602604, PMID:18434541). Plays an important role in the phototransduction cascade by regulating the lifetime and effective concentration of activated transducin alpha. May regulate extra and intracellular mitogenic signals. Function: There are 25 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to a disease (Neoplasms)
9	Hsf1 protein	602296	Function as a stress-inducible and DNA-binding transcription factor that plays a central role in the transcriptional activation of the heat shock response (HSR), leading to the expression of a large class of molecular chaperones heat shock proteins (HSPs) that protect cells from cellular insults' damage. Involved in stress-induced cancer cell proliferation in a IER5-dependent manner. Function: There are 100 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally,

			the gene has been tested for association to diseases (Carcinoma, Squamous Cell; Colorectal Neoplasms; Gastrointestinal Neoplasms; Hypopharyngeal Neoplasms; Laryngeal Neoplasms; Lymphoma, B-cell; Prostatic Neoplasms; Spinocerebellar Ataxias). TTD-Diseases: Amyotrophic lateral sclerosis; Atrial fibrillation; Cancer; Diabetes; Diabetic neuropathy; Gastrointestinal cancers; Herpes simplex virus infection; Leukemia; Metastasis
10	Anticancer, Acute Myeloid Leukemia	1502	core-binding factor, beta subunit isoform 1; runt-related transcription factor 1 isoform AML1c. CBF is a transcription factor complex that plays a key role in hematopoiesis [14]. The CBF complex includes two subunits: RUNX1 (AML1, CBFA2) and CBFβ. Disruption of CBF can lead to various hematopoietic neoplasms such as myelodysplastic syndrome (MDS), acute lymphoblastic leukemia (ALL), and AML [15]. The protein encoded by this gene is the beta subunit of a heterodimeric core-binding transcription factor belonging to the PEBP2/CBF transcription factor family which master-regulates a host of genes specific to hematopoiesis (e.g., RUNX1) and osteogenesis (e.g., RUNX2). Function: There are 39 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Acute Disease; Chromosome Aberrations; Cleidocranial dysplasia; Leukemia; Myeloid leukemia, acute, M4Eo subtype).
11	Bloom's syndrome helicase (BLM)	2364	Bloom syndrome protein isoform 1. Human BLM is important in resolving abnormal DNA structures formed during replication or homologous recombination. Shutting down the expression of BLM leads to chromosomal instability and higher radiation sensitivity in cultured cells. Cancer cells develop resistance to therapy through enhanced activity of DNA repair functions; this has led to an increased interest in developing drugs that interfere with DNA repair, which could sensitize cancer cells to conventional therapy. Function: There are 144 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Bloom syndrome ; Werner syndrome; Ataxia Telangiectasia; Lymphoproliferative Disorders (including: Hodgkin Disease; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Hodgkin Disease ; DNA Damage; Hematologic Diseases (including: Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Occupational Diseases ; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell ; Carcinoma; Stomach Neoplasms; Colorectal Neoplasms ; Neoplasms (including: Carcinoma; Hodgkin Disease; Waldenstrom Macroglobulinemia))
12	Bacteria, Salmonella Typhimurium	2834	Bacteria, Salmonella Typhimurium
13	Citotoxicity, Human Lymphoblastoid Cells	946	lymphoblastoid cell line
14	cysteine protease ATG4B	504756	cysteine protease ATG4B isoform a. Autophagy protease ATG4B is a key regulator of the LC3/GABARAP conjugation system required for autophagosome formation, maturation and closure. Members of the ATG4 and the LC3/GABARAP family have been implicated in various diseases including cancer, and targeting the ATG4B protease has been suggested as a potential therapeutic anti-cancer strategy. Chemical modulators of autophagy are essentially non-existent. ATG4B protease and autophagy play a crucial role protecting epithelial cells against bleomycin-induced stress and apoptosis, and in the regulation of the inflammatory and fibrotic responses. Modulators of Atg4b-dependent autophagic flux as new potential targets in the treatment of Huntington's disease. Several studies have shown that dysregulation of ATG4B is implicated in cancer, inflammatory bowel diseases, lung fibrosis or hepatitis C virus infection, but the role of ATG4B in these and other diseases is still unclear. Treatment based on the blockade of these proteases has also been suggested for type 1 diabetes mellitus. Function: There are 15 articles specifically referring to this gene in PubMed.

15	fibrinogen beta chain	720628	Chain E, Fragment Double-D From Human Fibrin. ischemic stroke, myocardial infarction, pulmonary embolism, and deep vein thrombosis. Function: There are 272 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Dysfibrinogenemia, beta type; Afibrinogenemia, congenital; Thrombophilia, dysfibrinogenemic; Pulmonary Embolism ; Blood Coagulation Disorders (including: Afibrinogenemia; Coagulation Protein Disorders); Fetal Death ; Thrombophilia ; Diseases in Twins; Carotid Artery Diseases ; Metabolism, Inborn Errors; Liver Diseases (including: Carcinoma, Hepatocellular; Liver Neoplasms); Migraine Disorders ; Thrombosis (including: Venous Thrombosis) ; Glomerulonephritis, IGA ; Arteriosclerosis (including: Atherosclerosis, Coronary; Coronary Artery Disease) ; Fetal Diseases; Pre-Eclampsia ; Brain Ischemia ; Kidney Failure, Chronic; Recurrence ; Stroke (including: Cerebrovascular Accident) ; Kidney Neoplasms; Coronary Disease (including: Atherosclerosis, Coronary; Coronary Artery Disease; Coronary Restenosis; Coronary Stenosis) ; Myocardial Infarction ; Inflammation ; obesity; Osteoporosis ; Diabetes mellitus, type 2 ; Cardiovascular Diseases (including: Arteriosclerosis; Brain Ischemia; Carotid Artery Diseases; Cerebrovascular Accident; Coronary Disease; Hypertension; Myocardial Infarction; Stroke; Thrombosis; Vascular Diseases) ; Adenocarcinoma (including: Carcinoma, Hepatocellular); Lung Neoplasms; Breast Neoplasms)
16	Anticancer, RecQ-Like Dna Helicase 1 (RECQ1)	504841	Chain A, Structure Of Human Recq-like Helicase In Complex With A Dna Substrate. Human RECQ1 Is a DNA Damage Responsive Protein Required for Genotoxic Stress Resistance and Suppression of Sister Chromatid Exchanges. PLoS ONE. 2007; 2(12): e1297. Developing drugs that interfere with DNA repair, which could sensitize cancer cells to conventional therapy. RECQL mutations may serve as a useful biomarker for breast cancer. Targeting RECQL associated tumors with novel DNA repair inhibitors may provide a new strategy for anti-cancer therapy. Function: There are 30 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to a disease (Liver Neoplasms)
17	Citotoxicity, L929	463181	Organism: <i>Mus musculus</i> , mouse / Tissue: subcutaneous connective tissue; areolar and adipose /
18	Herpes simplex virus Virion Protein 16 (counterscreen)	2763	Interference with HTS
19	Virus, HIV-1	346	Virus, HIV-1
20	Antiparasitic, Caenorhabditis elegans	449745	Antiparasitic, Caenorhabditis elegans
21	Anti-Inflammatory, TLR2	1065534	The protein encoded by this gene is a member of the Toll-like receptor (TLR) family which plays a fundamental role in pathogen recognition and activation of innate immunity. TLRs are highly conserved from Drosophila to humans and share structural and functional similarities. This protein is a cell-surface protein that can form heterodimers with other TLR family members to recognize conserved molecules derived from microorganisms known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Activation of TLRs by PAMPs leads to an up-regulation of signaling pathways to modulate the host's inflammatory response. This gene is also thought to promote apoptosis in response to bacterial lipoproteins. This gene has been implicated in the pathogenesis of several autoimmune diseases. Alternative splicing results in multiple transcript variants. [provided by RefSeq, Jan 2016] Function: There are 594 articles specifically referring to this

			gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Leprosy, susceptibility to; Colorectal cancer, susceptibility to; Mycoses (including: Dermatomyces) ; Leptospirosis; Pneumonia, Pneumococcal ; Schistosomiasis haematobia; Dental Plaque ; Leprosy, Lepromatous; Staphylococcal Infections ; Genital Diseases, Female (including: Chlamydia Infections); Bronchiectasis ; Herpes Simplex; Gingival Hemorrhage ; Periodontal Diseases (including: Gingival Hemorrhage; Periodontitis) ; Fetal Membranes, Premature Rupture; Sinusitis; Cytomegalovirus Infections ; Chlamydia Infections; Tuberculosis (including: Tuberculosis, Pulmonary); Behcet Syndrome; Heart Diseases (including: Heart Disease; Rheumatic Heart Disease) ; Carotid Artery Diseases ; Osteoarthritis; Glomerulonephritis, IGA ; Dermatitis, atopic; Infection (including: Chlamydia Infections; Dermatomyces; Herpes Simplex; Schistosomiasis haematobia; Sepsis; Sinusitis; Tuberculosis, Pulmonary) ; Lymphoproliferative Disorders (including: Hodgkin Disease; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Atherosclerosis ; Hodgkin Disease ; Bronchiolitis, Viral ; Chronic Disease ; Respiratory Syncytial Virus Infections ; Crohn Disease ; Hematologic Diseases (including: Hematologic Neoplasms; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Occupational Diseases ; Infant, Premature, Diseases ; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell ; Inflammation (including: Sepsis) ; Diabetes Complications ; Lupus Erythematosus, Systemic ; Diabetes Mellitus, Type 1 ; Arthritis, Rheumatoid ; obesity ; Asthma ; Colorectal Neoplasms)
22	Citotoxicity, 697B	489034	B cell precursor leucemia
23	Bacteria, Staphylococcus aureus	1014	Quorum sensing is a cell-to-cell communication system that permits members of a bacterial population to coordinate their behavior dependent on cell density (for review see Waters and Bassler, 2005). The mediators of this communication system are small, diffusible pheromones or autoinducers that are secreted by the bacteria and that accumulate extracellularly. At the appropriate concentration threshold that reflects a sufficient number or quorum of bacteria, the autoinducers signal gene expression programs that direct the coordinated action of the population. The list of bacterial pathogens that use this method of communication to regulate virulence is expanding and now includes some of the most common bacterial pathogens of humans including the medically important pathogen Staphylococcus aureus. (Waters and Bassler, 2005).
24	Dye Displacement (counterscreen)	2564	Dye Displacement (counterscreen)
25	fMet-Leu-Phe receptor	519	fMet-Leu-Phe receptor. The formylpeptide receptor (FPR) family of G-protein coupled receptors (GPCR) contributes to the localization and activation of tissue-damaging leukocytes at sites of chronic inflammation. FPR ligands trigger a variety of biologic activities in myeloid cells, including chemokinesis, chemotaxis, cytokine production and superoxide generation. FPR have also recently been identified in hepatocytes, immature dendritic cells, astrocytes, microglial cells, and the tunica media of coronary arteries. FPR have been proposed as prospective targets for therapeutic intervention against malignant gliomas. Function: There are 68 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Aggressive Periodontitis; Brain Neoplasms; Glioblastoma; Leukemia, Promyelocytic, Acute). TTD-Diseases: Inflammatory disease; Peptic ulcer
26	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	624274	PDI is a key participant in an extracellular electron transport involved in the activation of the coagulation cascade. Inhibition of extracellular PDI displayed on the surface of platelets and/or vascular cells prevents platelet accumulation and fibrin generation that leads to thrombus formation. Arterial thrombosis mediates tissue infarction in coronary artery

			disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease. Function: There are 62 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Abetalipoproteinemia; Amyotrophic Lateral Sclerosis; Fibrosarcoma; Liver Cirrhosis; Liver Neoplasms)
27	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	652260	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2, isoform CRA. SWI/SNF complexes regulate genes that are involved in many processes, including repairing damaged DNA; copying (replicating) DNA; and controlling the growth, division, and maturation (differentiation) of cells. The SMARCA2 protein and other SWI/SNF subunits are thought to act as tumor suppressors, which keep cells from growing and dividing too rapidly or in an uncontrolled way. Function: There are 66 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Adenocarcinoma; Cholesterol, HDL/blood*; Leukemia; Prostatic Neoplasms; Schizophrenia)
28	sphingosine 1-phosphate receptor 1	1563	sphingosine 1-phosphate receptor 1. Agonists of S1P1 would be of interest in the enhancement of endothelial barriers and therefore potentially for the treatment of multiple sclerosis, transplant rejection and adult respiratory distress syndrome(10). G-protein coupled receptor for the bioactive lysosphingolipid sphingosine 1-phosphate (S1P) that seems to be coupled to the G(i) subclass of heteromeric G proteins. Signaling leads to the activation of RAC1, SRC, PTK2/FAK1 and MAP kinases. Plays an important role in cell migration, probably via its role in the reorganization of the actin cytoskeleton and the formation of lamellipodia in response to stimuli that increase the activity of the sphingosine kinase SPHK1. Plays an important role in the regulation of sprouting angiogenesis and vascular maturation. Inhibits sprouting angiogenesis to prevent excessive sprouting during blood vessel development. Required for normal egress of mature T-cells from the thymus into the blood stream and into peripheral lymphoid organs. Plays a role in the migration of osteoclast precursor cells, the regulation of bone mineralization and bone homeostasis (By similarity). Plays a role in responses to oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by pulmonary endothelial cells and in the protection against ventilator-induced lung injury. Function: There are 66 articles specifically referring to this gene in PubMed. TTD-Diseases: Acne vulgaris; Advanced non-small cell lung cancer; Autoimmune diabetes; Cancer; Cardiovascular disorder; Cutaneous lupus erythematosus; Hepatocellular carcinoma; Multiple sclerosis; Immune disorder; Inflammatory disease; Macular degeneration; Multiple sclerosis; Primary progressive multiple sclerosis; Psoriasis; Rheumatoid arthritis
29	inward rectifier potassium channel 2	492993	inward rectifier potassium channel 2. Potassium channels are present in most mammalian cells, where they participate in a wide range of physiologic responses. The protein encoded by the KCNJ2 gene is an integral membrane protein and inward-rectifier type potassium channel. The encoded protein, which has a greater tendency to allow potassium to flow into a cell rather than out of a cell, probably participates in establishing action potential waveform and excitability of neuronal and muscle tissues. Mutations in the KCNJ2 gene have been associated with Andersen syndrome, which is characterized by periodic paralysis, cardiac arrhythmias, and dysmorphic features. [provided by RefSeq, Jul 2008] May be a potential therapeutic target in the treatment of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and restenosis following percutaneous coronary intervention. Function: There are 69 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (OMIM: andersen cardiodyrhythmic periodic paralysis; short qt syndrome 3; Other sources: Abnormalities, Multiple; Atrial fibrillation; Facies; Heart Defects,

			Congenital; Long QT syndrome-7; Paralyzes, Familial Periodic; Short QT syndrome-3; Tachycardia, Ventricular; Ventricular Dysfunction)
30	Mitochondria, disruptor membrane potential	651755	Maintaining mitochondrial structural integrity is essential for cells to produce energy, overcome environmental stresses such as nutrient deprivation and hypoxia and respond to genotoxic agents, including chemotherapy. Consequently, the disruption of mitochondrial metabolism sensitizes cells to apoptosis and opens new therapeutic avenues in cancer treatment. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the converging pathogenic processes involved in Parkinson's disease (PD). Mitochondria provide cellular energy in the form of ATP via oxidative phosphorylation, but as an integral part of this process, superoxides and other reactive oxygen species are also produced. Excessive free radical production contributes to oxidative stress. Mitochondrial membrane potential (MMP), one of the parameters for mitochondrial function, is generated by mitochondrial electron transport chain that creates an electrochemical gradient by a series of redox reactions.
31	Anticancer, Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	2168	The protein encoded by this gene belongs to the Bcl-2 family. Alternative splicing occurs at this locus and two transcript variants encoding distinct isoforms have been identified. The longer gene product (isoform 1) enhances cell survival by inhibiting apoptosis while the alternatively spliced shorter gene product (isoform 2) promotes apoptosis and is death-inducing. [provided by RefSeq]. Function: There are 196 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Germinoma; Cholangiocarcinoma; Testicular Neoplasms; Lymphoma, Large B-Cell, Diffuse; Multiple myeloma; Leukemia, Myeloid (including: Leukemia, Myeloid, Acute); Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Translocation, Genetic; Melanoma; Arthritis, Rheumatoid; Pancreatic Neoplasms; Stomach Neoplasms; Ovarian Neoplasms; Liver Neoplasms (including: Carcinoma, Hepatocellular); Lung Neoplasms (including: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung)). TTD-Diseases: Cancer; Rheumatoid arthritis; Solid tumours; Trematode infection
32	Virus, Hepatitis C	2152	Virus, Hepatitis C
33	Agonista, Histone H2A.x	1224896	[H2AFX] Histones are basic nuclear proteins that are responsible for the nucleosome structure of the chromosomal fiber in eukaryotes. Two molecules of each of the four core histones (H2A, H2B, H3, and H4) form an octamer, around which approximately 146 bp of DNA is wrapped in repeating units, called nucleosomes. The linker histone, H1, interacts with linker DNA between nucleosomes and functions in the compaction of chromatin into higher order structures. This gene encodes a member of the histone H2A family, and generates two transcripts through the use of the conserved stem-loop termination motif, and the polyA addition motif. [provided by RefSeq]. Function: There are 156 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Ataxia Telangiectasia; DNA Damage; Lymphoma, Mantle-Cell; Neoplasms; Uterine Cervical Neoplasms)
34	Carcinogenic, DSSTox	1201	Carcinogenic, DSSTox
35	GLI family zinc finger 1	651995	Glioma, B-cell lymphoma, sarcoma. Medulloblastoma, the most common pediatric brain tumor. Hh pathway dysregulation has been linked to tumors of the brain, skin, pancreas, breast, ovaries, and blood, and small molecules targeting this pathway are now being pursued as anti-cancer therapies. Human Gli1 encodes a transcription activator involved in development that is a known oncogene.[9][16]. Gli1 is not only a strong target to treat AML patients but also

			an excellent approach for developing a novel therapeutic for patients where Gli1 expression and activity is high, such as patients with RAS mutations. Studies suggest inhibiting GLI1 -expressing cells could help treat myeloproliferative neoplasms (MPN). Studies suggest inhibiting GLI1 could help treat atherosclerosis associated with chronic kidney disease (CKD). Function: There are 86 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Neoplasms, Nerve Tissue (including: Glioma); Gastrointestinal Stromal Tumors; Intestinal Neoplasms (including: Colonic Neoplasms); Soft Tissue Neoplasms; Endometrial Neoplasms; Glioblastoma; Glioma (including: Glioblastoma); Skin Neoplasms; Esophageal Neoplasms; Translocation, Genetic; Carcinoma (including: Adenocarcinoma; Carcinoma, Basal Cell; Carcinoma, Squamous Cell); Colonic Neoplasms; Prostatic Neoplasms; Breast Neoplasms)
36	Genotoxicity, ATAD5	Tox21-SR-ATAD5	ATPase family AAA domain-containing protein 5. Involved in DNA damage response. Involved in a RAD9A-related damage checkpoint, a pathway that is important in determining whether DNA damage is compatible with cell survival or whether it requires cell elimination by apoptosis. Modulates the RAD9A interaction with BCL2 and thereby induces DNA damages-induced apoptosis. Function: There are 7 articles specifically referring to this gene in PubMed.
37	Fungus, Candida albicans	588522	Bacteria, Candida albicans, drug resistance protein 1
38	Valosin-containing protein	1517	The discovery of p97 missense mutations in a genetic form of human dementia (5-7), the localization of p97 in ubiquitylated inclusions in affected neurons of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease (8), and the overproduction of p97 in multiple cancers (10-14), suggests that p97 has diverse and essential cellular roles. Function: There are 119 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (OMIM: Inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia; Other sources: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Dementia; Frontotemporal Dementia; Genetic Predisposition to Disease; Liver Neoplasms; Lung Neoplasms; Muscular Diseases; Muscular Dystrophies; Myositis, Inclusion Body; Osteitis Deformans). TTD-Diseases: Multiple myeloma
39	dual specificity protein phosphatase 3	2684	dual specificity protein phosphatase 3. The protein encoded by this gene is a member of the dual specificity protein phosphatase subfamily. These phosphatases inactivate their target kinases by dephosphorylating both the phosphoserine/threonine and phosphotyrosine residues. They negatively regulate members of the mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), which are associated with cellular proliferation and differentiation. Dual-specificity phosphatase 3 (DUSP3) in platelet signaling and the formation of blood clots. As reported recently in the journal Circulation, the researchers developed a novel DUSP3 inhibitor that decreases the aggregation of human platelets. The findings pave the way for the development of effective drugs for the treatment of blood clotting in heart attack and ischemic stroke in humans. Dual-specificity phosphatase 3 deficiency or inhibition limits platelet activation and arterial thrombosis. Among the biological roles attributed to VHR (discussed later) is its ability to control the cell cycle, which affects cell proliferation. This makes the study of VHR important for developing therapeutic strategies for different types of cancers. Function: There are 20 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Genetic Predisposition to Disease; Heat Stress Disorders).

40	Ape1 Endonuclease	1705	Chain A, Human Ape1 Endonuclease With Bound Abasic Dna And Mn2+ Ion. overexpression of APE1 in many cancers and resistance of these tumor cells to radio- and chemotherapy. Thus, targeting APE1 could improve the efficacy of current treatment paradigms by promoting selective sensitization or protection of diseased and normal cells, respectively. Multifunctional protein that plays a central role in the cellular response to oxidative stress. The two major activities of APEX1 in DNA repair and redox regulation of transcriptional factors. APE1 acts as a reductive activator of many transcription factors (TFs) and has also been named redox effector factor 1, Ref-1. For example, APE1 activates activator protein-1, nuclear factor kappa B, hypoxia-inducible factor 1 α , paired box gene 8, signal transducer activator of transcription 3 and p53, which are involved in apoptosis, inflammation, angiogenesis and survival pathways. APE1/Ref-1 maintains cellular homeostasis (redox) via the activation of TFs that regulate various physiological processes and that crosstalk with redox balancing agents (for example, thioredoxin, catalase and superoxide dismutase) by controlling levels of reactive oxygen and nitrogen species. APE1/Ref-1's versatile nature in various human etiologies, including neurodegeneration, cancer, cardiovascular and other diseases that have been linked with alterations in the expression, subcellular localization and activities of APE/Ref-1. Function: There are 275 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Rhabdomyosarcoma, Embryonal; Rhabdomyosarcoma, alveolar; Motor Neuron Disease; Soft Tissue Neoplasms; Helicobacter Infections; Neoplasm Recurrence, Local; Bone Neoplasms; Osteosarcoma; Chronic Disease ; DNA Damage ; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung ; Pulmonary Disease, Chronic Obstructive ; Stomach Neoplasms; Ovarian Neoplasms; Colorectal Neoplasms (including: Colonic Neoplasms) ; Adenocarcinoma; Neoplasms (including: Bone Neoplasms; Breast cancer; Breast Neoplasms; Neoplasm Recurrence, Local; Ovarian Neoplasms; Soft Tissue Neoplasms) ; Lung Neoplasms (including: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung) ; Breast Neoplasms (including: Breast cancer)). TTD-Diseases: Ocular câncer
41	putative hydrolase RBBP9	1537	The protein encoded by this gene is a retinoblastoma binding protein that may play a role in the regulation of cell proliferation and differentiation. we identify retinoblastoma-binding protein 9 (RBBP9) as a tumor-associated serine hydrolase that displays elevated activity in pancreatic carcinomas. Whereas RBBP9 is expressed in normal and malignant tissues at similar levels, its elevated activity in tumor cells promotes anchorage-independent growth in vitro as well as pancreatic carcinogenesis in vivo. Retinoblastoma binding protein 9 (RBBP9) may be a possible anti-cancer target. Function: There are 7 articles specifically referring to this gene in PubMed.
42	Anticancer, Leukemia	1053195	Anticancer, Leukemia
43	Agonista, p53	Tox21-SR-p53	TP53. Cellular tumor antigen p53, a tumor suppressor protein, is activated following cellular insult, including DNA damage and other cellular stresses. The activation of p53 regulates cell fate by inducing DNA repair, cell cycle arrest, apoptosis, or cellular senescence. The activation of p53, therefore, is a good indicator of DNA damage and other cellular stresses. The TP53 gene provides instructions for making a protein called tumor protein p53 (or p53). This protein acts as a tumor suppressor, which means that it regulates cell division by keeping cells from growing and dividing (proliferating) too fast or in an uncontrolled way. Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces growth arrest or apoptosis depending on the physiological circumstances and cell type. Involved in cell cycle regulation as a trans-activator that acts to negatively regulate cell division by controlling a set of genes required for this process. One of the activated genes is an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Apoptosis induction seems to be mediated either by stimulation of BAX and FAS

		<p>antigen expression, or by repression of Bcl-2 expression. In cooperation with mitochondrial PPIF is involved in activating oxidative stress-induced necrosis; the function is largely independent of transcription. Induces the transcription of long intergenic non-coding RNA p21 (lincRNA-p21) and lincRNA- Mkl1. LincRNA-p21 participates in TP53-dependent transcriptional repression leading to apoptosis and seem to have to effect on cell-cycle regulation. Implicated in Notch signaling cross-over. Prevents CDK7 kinase activity when associated to CAK complex in response to DNA damage, thus stopping cell cycle progression. Isoform 2 enhances the transactivation activity of isoform 1 from some but not all TP53-inducible promoters. Isoform 4 suppresses transactivation activity and impairs growth suppression mediated by isoform 1. Isoform 7 inhibits isoform 1-mediated apoptosis. Regulates the circadian clock by repressing CLOCK-ARNTL/BMAL1-mediated transcriptional activation of PER2. Function: There are 4043 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Histiocytoma (including: Histiocytoma, Benign Fibrous); Li-Fraumeni-like syndrome; Multiple malignancy syndrome; Papilloma, Intraductal; Roseolovirus Infections; Cholecystitis; Conjunctival Neoplasms; Choroid Plexus Neoplasms (including: Choroid plexus papilloma; Papilloma, Choroid Plexus); Dermatofibrosarcoma; Eyelid Neoplasms; Lichen Sclerosus et Atrophicus; Nasopharyngeal carcinoma; Urogenital Neoplasms (including: Carcinoma, Endometrioid; Carcinoma, Renal Cell; Endometrial Neoplasms; Genital Neoplasms, Female; Kidney Neoplasms; Ovarian Neoplasms; Prostatic Neoplasms; Urinary Bladder Neoplasms; Uterine Cervical Neoplasms; Uterine Neoplasms; Vulvar Neoplasms; Wilms tumor) ; Focal Nodular Hyperplasia; Balkan Nephropathy; Craniocerebral Trauma; Nose Neoplasms (including: Paranasal Sinus Neoplasms); Peripheral Nervous System Neoplasms (including: Nerve Sheath Neoplasms; Neuroma, Acoustic); Pterygium; Epidermolysis Bullosa Dystrophica; Sunburn; Xanthomatosis; Progeria; Bloom syndrome; Cockayne Syndrome; Neuroma, Acoustic; Digestive System Neoplasms (including: Bile Duct Neoplasms; Carcinoma, Hepatocellular; Carcinoma, Pancreatic Ductal; Colorectal cancer; Colorectal Neoplasms; Esophageal Neoplasms; Gallbladder Neoplasms; Gastrointestinal Neoplasms; Hepatocellular carcinoma; Intestinal Neoplasms; Liver Neoplasms; Pancreatic cancer; Pancreatic Neoplasms; Stomach Neoplasms) ; Hepatolenticular Degeneration; Hypopharyngeal Neoplasms; Intracranial Arteriovenous Malformations; Neuroectodermal Tumors, Primitive (including: Medulloblastoma; Neuroblastoma); Intestinal Diseases (including: Anus Neoplasms; Colitis, Ulcerative; Colonic Neoplasms; Colorectal cancer; Colorectal Neoplasms; Colorectal Neoplasms, Hereditary Nonpolyposis; Inflammatory Bowel Diseases; Intestinal Neoplasms; Peutz-Jeghers syndrome; Rectal Neoplasms) ; Carcinoma, Embryonal; Herpes Simplex; Werner syndrome; Retinal Neoplasms (including: Retinoblastoma); Lichen Planus, Oral; Ataxia Telangiectasia; Central Nervous System Neoplasms (including: Brain Neoplasms; Choroid Plexus Neoplasms; Meningioma); Pleural Neoplasms; Gallbladder Neoplasms; Adrenal Cortex Neoplasms (including: Adrenal cortical carcinoma; Adrenocortical Carcinoma); Thyroid Diseases (including: Thyroid carcinoma; Thyroid Neoplasms); Pemphigus ; Cystadenocarcinoma, Serous; Vitiligo; Rhabdomyosarcoma; Barrett Esophagus; Teratoma; Hemochromatosis; Bile Duct Neoplasms; Sarcoma (including: Carcinosarcoma; Dermatofibrosarcoma; Osteosarcoma; Rhabdomyosarcoma; Sarcoma, synovial) ; Genomic Instability (including: Chromosomal Instability; Chromosome Fragility); Leukemia, T-Cell; Lymphoma, T-cell; Anoxia; Leiomyoma; Meningioma; Abortion, Habitual; Glaucoma, Open-Angle ; Hepatitis B ; Pancreatitis; Huntington disease; Psychology; Hepatitis C (including: Hepatitis C, Chronic) ; Smoking; Nasopharyngeal Neoplasms ; Endometriosis; Hearing Loss; Helicobacter Infections ; Laryngeal Neoplasms; Neoplasm Recurrence, Local; Myelodysplastic Syndromes; Arteriosclerosis; Bone Neoplasms (including: Nose Neoplasms; Paranasal</p>
--	--	--

		<p>Sinus Neoplasms); Lymphoma, B-cell (including: Burkitt lymphoma); Liver Cirrhosis; Psoriasis; Neovascularization, Pathologic; Lymphoproliferative Disorders (including: Burkitt lymphoma; Hodgkin Disease; Leukemia, Hairy Cell; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Leukemia, T-Cell; Lymphoma; Lymphoma, B-cell; Lymphoma, T-cell; Multiple myeloma; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Disease Susceptibility (including: Genetic Predisposition to Disease) ; Neoplasms, Glandular and Epithelial (including: Adenocarcinoma; Adenocarcinoma, Mucinous; Adenocarcinoma, Sebaceous; Adenoma; Adenoma, Pleomorphic; Adrenal cortical carcinoma; Adrenocortical Carcinoma; Astrocytoma; Carcinoma; Carcinoma in Situ; Carcinoma, Acinar Cell; Carcinoma, Adenoid Cystic; Carcinoma, Basal Cell; Carcinoma, Ductal; Carcinoma, Endometrioid; Carcinoma, Hepatocellular; Carcinoma, Lobular; Carcinoma, Pancreatic Ductal; Carcinoma, Papillary; Carcinoma, Renal Cell; Carcinoma, Small Cell; Carcinoma, Squamous Cell; Carcinoma, Transitional Cell; Cervical Intraepithelial Neoplasia; Cholangiocarcinoma; Choriocarcinoma; Cystadenocarcinoma, Serous; Ependymoma; Ganglioglioma; Glioma; Hepatocellular carcinoma; Medulloblastoma; Mesothelioma; Neoplasms, Squamous Cell; Neuroectodermal Tumors, Primitive; Papilloma; Papilloma, Intraductal; Retinoblastoma) ; Chronic Disease; Chromosome Aberrations (including: Chromosomal Instability; Chromosome Deletion; Chromosome Fragility; Translocation, Genetic); Neoplasm Metastasis; Diabetes Mellitus (including: Diabetes Mellitus, Type 1); Head and Neck Neoplasms (including: Esophageal Neoplasms; Eyelid Neoplasms; Hypopharyngeal Neoplasms; Laryngeal Neoplasms; Leukoplakia, Oral; Mouth Neoplasms; Nasopharyngeal Neoplasms; Neuroma, Acoustic; Nose Neoplasms; Paranasal Sinus Neoplasms; Parotid Neoplasms; Salivary Gland Neoplasms; Thyroid carcinoma; Thyroid Neoplasms; Tongue Neoplasms; Tracheal Neoplasms) ; Neoplasm Invasiveness; DNA Damage; Hematologic Diseases (including: Multiple myeloma; Myelodysplastic Syndromes; Waldenstrom Macroglobulinemia) ; Disease Models, Animal; Glioma (including: Astrocytoma; Ependymoma; Ganglioglioma; Glioblastoma; Medulloblastoma); Parkinson disease; Occupational Diseases ; Leukemia (including: Blast Crisis; Leukemia, Hairy Cell; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Leukemia, Myeloid; Leukemia, Myeloid, Acute; Leukemia, Promyelocytic, Acute; Leukemia, T-Cell) ; Kidney Neoplasms (including: Carcinoma, Renal Cell; Wilms tumor); Skin Neoplasms (including: Sebaceous Gland Neoplasms; Sweat Gland Neoplasms); Autistic Disorder; Neuroblastoma; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell ; Inflammation; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Lupus Erythematosus, Systemic (including: Lupus Nephritis) ; Melanoma; Arthritis, Rheumatoid; Pulmonary Disease, Chronic Obstructive ; Cell Transformation, Neoplastic (including: Blast Crisis; Cell Transformation, Viral) ; Urinary Bladder Neoplasms; Schizophrenia; Prostatic Neoplasms; Neoplasms (including: Adenoma; Adenoma, Pleomorphic; Blast Crisis; Bone Neoplasms; Breast cancer; Breast Neoplasms; Burkitt lymphoma; Carcinoma; Carcinoma, Embryonal; Carcinosarcoma; Cell Transformation, Neoplastic; Cell Transformation, Viral; Central Nervous System Neoplasms; Choriocarcinoma; Colorectal Neoplasms, Hereditary Nonpolyposis; Conjunctival Neoplasms; Digestive System Neoplasms; Esophageal Neoplasms; Eyelid Neoplasms; Gastrointestinal Neoplasms; Genital Neoplasms, Female; Head and Neck Neoplasms; Hodgkin Disease; Leukemia; Leukemia, Hairy Cell; Leukemia, Myeloid; Leukoplakia, Oral; Li-Fraumeni syndrome; Liver Neoplasms; Lymphoma; Melanoma; Meningioma; Mouth Neoplasms; Multiple myeloma; Neoplasm Invasiveness; Neoplasm Metastasis; Neoplasm Recurrence, Local; Neoplasms, Experimental; Neoplasms, Glandular and Epithelial; Neoplasms, Hormone-Dependent; Neoplasms, Multiple Primary; Neoplasms, Radiation-Induced; Neoplasms, Second Primary; Neoplasms, Squamous Cell; Neoplastic Syndromes, Hereditary; Nerve Sheath Neoplasms; Neuroma, Acoustic; Ovarian Neoplasms; Pancreatic cancer; Pancreatic Neoplasms; Papillomavirus Infections;</p>
--	--	---

			Peripheral Nervous System Neoplasms; Peutz-Jeghers syndrome; Precancerous Conditions; Pulmonary Blastoma; Retinal Neoplasms; Sarcoma; Sebaceous Gland Neoplasms; Skin Neoplasms; Sweat Gland Neoplasms; Teratoma; Thyroid carcinoma; Thyroid Neoplasms; Tracheal Neoplasms; Tumor Virus Infections; Urogenital Neoplasms; Waldenstrom Macroglobulinemia; Wilms tumor; Xeroderma Pigmentosum) ; Lung Neoplasms (including: Bronchial Neoplasms; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Pulmonary Blastoma) ; Breast Neoplasms (including: Breast cancer)
44	Citotoxicity, SH-SY5Y	544	Organism: Homo sapiens, human / Tissue: bone marrow / Disease: neuroblastoma
45	glucagon like peptide 1 receptor	743262	glp-1 receptor, partial. This is a receptor for glucagon-like peptide 1. The activity of this receptor is mediated by G proteins which activate adenylyl cyclase. Function: There are 40 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Diabetes mellitus, type 2; Insulinoma; Pancreatic Neoplasms). TTD-Diseases: Brain injury; Diabetes; Irritable bowel syndrome; Dyspepsia; Non-alcoholic steatohepatitis; Non-insulin dependent diabetes; Obesity; Obesity; Diabetes; Type 1 diabetes; Type 1/2 diabetes; Type 2 diabetes; Unspecified
46	regulator of G-protein signaling 7	1837	RGS7, partial. Since GPCRs control numerous physiologic processes in diverse tissues, including brain, heart, liver, and lung, modulation of the RGS/G protein interaction has become an attractive target for drug discovery. Rgs7 (Regulator of G protein signalling 7) is a gene that we found was present at high levels in brown fat cells. Furthermore, it was increased in white fat upon prolonged cold exposure, a treatment which induces the appearance of brown fat cells within white fat depots. Importantly, genetic analysis has revealed the RGS7 gene is associated with obesity and diabetes in humans. Rgs7 controls the activity of hormone signalling pathways in cells. Our findings identify RGS7 as a novel melanoma driver and point to the clinical relevance of using strategies to stabilize the protein and, thereby, restore its function. Diseases associated with RGS7 include Retinoschisis 1, X-Linked, Juvenile. Our findings identify RGS7 as a novel melanoma driver and point to the clinical relevance of using strategies to stabilize the protein and, thereby, restore its function. Function: There are 22 articles specifically referring to this gene in PubMed.
47	Citotoxicity, HepG2	1053125	Organism: Homo sapiens, human / Tissue: liver / Disease: hepatocellular carcinoma. Toxicidade hepática. Drug-induced liver injury is a major health problem that impacts the pharmaceutical industry, drug regulatory agencies and doctors. Drug induced hepatotoxicity accounts for more than 50% of acute liver failure, and is the major cause of drug withdrawals.
48	jumonji domain containing 2A (counterscreen)	488840	This gene is a member of the Jumonji domain 2 (JMJD2) family and encodes a protein containing a JmjN domain, a JmjC domain, a JD2H domain, two TUDOR domains, and two PHD-type zinc fingers. This nuclear protein functions as a trimethylation-specific demethylase, converting specific trimethylated histone residues to the dimethylated form, and as a transcriptional repressor. [provided by RefSeq]. KDM4A was chosen for investigation as it has been implicated in numerous hypoxic disease states, including breast, prostate, and lung cancers, and cardiac hypertrophy. Function: There are 22 articles specifically referring to this gene in PubMed.
49	ADP Fluorescence Polarization Displacement Assay (counterscreen)	2712	ADP Fluorescence Polarization Displacement Assay (counterscreen)

50	Steroid Receptor Coactivator 3	602166	<p>Nuclear receptor coactivator that directly binds nuclear receptors and stimulates the transcriptional activities in a hormone-dependent fashion. Plays a central role in creating a multisubunit coactivator complex, which probably acts via remodeling of chromatin. Involved in the coactivation of different nuclear receptors, such as for steroids (GR and ER), retinoids (RARs and RXRs), thyroid hormone (TRs), vitamin D3 (VDR) and prostanoids (PPARs). Displays histone acetyltransferase activity. Also involved in the coactivation of the NF-kappa-B pathway via its interaction with the NFKB1 subunit. Given the central role that SRC-3 plays in breast and other cancers, the search for small molecule agents that target SRC-1 and SRC-3 represent an innovative and potentially effective strategy to identify agents to treat hormone-refractory breast cancers and other cancers where these coactivators are overexpressed. Compounds that target the function of steroid receptor coactivator 3 (SRC-3) protein promise to be different because cancer cells are less likely to bypass the comprehensive disruption of multiple growth factor signaling systems that result from the loss of SRC-3 function. Critical role of NCOA3 in chondrocytes imply that manipulating NCOA3 might present a potential therapeutic approach to interfere Osteoarthritis progression. Genome-wide transcription profiling identified functional networks of genes, in which key regulators of weight homeostasis (PPARs, glucocorticoids, CEBPs, estradiol), steroid hormone functions (glucocorticoids, estradiol, NCOA3) and insulin signaling (HNF4A, CEBPs, PPARG) occupied central positions. The increased weight and the regulation of genes associated with weight homeostasis and insulin signaling observed in the present study suggest that environmental pollution may affect the endocrine regulation of the metabolism, possibly leading to increased weight gain and obesity. Function: There are 168 articles specifically referring to this gene in PubMed. Functionally, the gene has been tested for association to diseases (Breast Neoplasms; Carcinoma; Cholesterol, HDL/blood*; Genetic Predisposition to Disease; Genital Neoplasms, Female; Neoplasms; Pancreatic Neoplasms; Prostatic Neoplasms)</p>
----	--------------------------------	--------	---

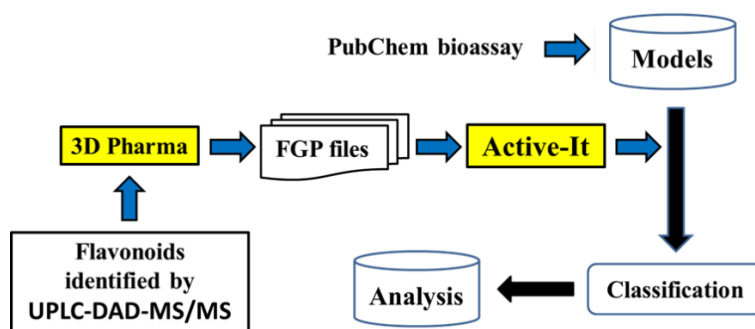


Figure S3: Scheme of the procedure adopted for the prediction of biological activities of flavonoids 1 to 8 detected in polar extracts from *H. lupulus* leaves (Colored only in online version).

Conformation	3D Structure	Potential Pharmacophores	Example of 3-point pharmacophore	Pharmacophore Fingerprint
1				...010101010101010...
2				...001101000101001...
3				...010001100000001...
Multi-conformational (Modal)				...011101110101011...

Figure S4 – Different representations of hyperin (5) used in the 3D-Pharma software. Starting from several (up to ten) conformations the 3D coordinates of each non-hydrogen atom are converted into potential pharmacophores. All combinations of 3 points of potential pharmacophores are encoded in pharmacophore fingerprint for each conformation. The modal fingerprint of each compound is the union of all its mono-conformational fingerprint. Thus, each compound is represented by a single modal fingerprint that comprise information about all its conformations. (Colored only in online version).

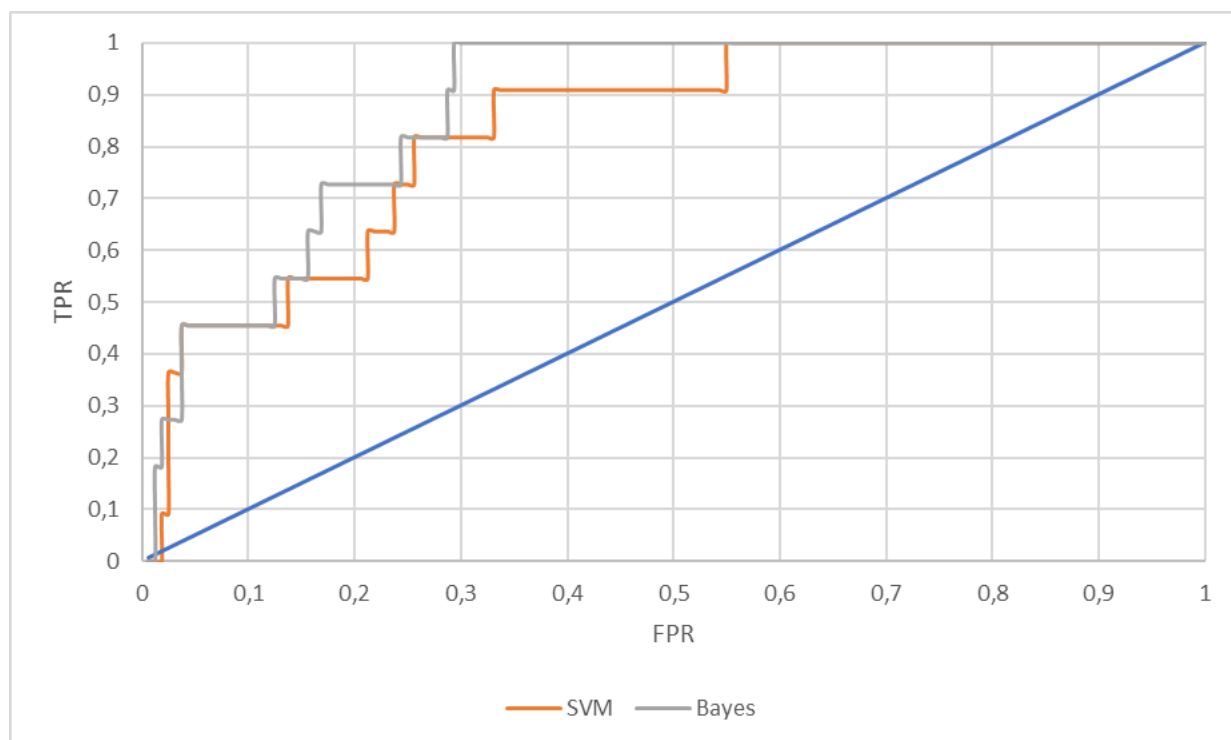


Figure S5: ROC curve (TPR versus FPR) used for the validation of flavonoids astragalín (1), nicotiflorin (2), hiperin (5) and rutin (6) found in polar extracts from *Humulus lupulus* leaves (Colored only in online version).



Figure S6: Word cloud with the most cited diseases found on PubChem for the analyzed flavonoids. The font size is related to the number of citations (Colored only in online version).

According to Active-IT prediction, the extracts/isolated substances could present cytotoxic activity on cell lines A549, human adenocarcinoma (position 4 in 800); acute myeloid leukemia (position 10 in 800); neuroblastoma (position 44 in 800); human liver cancer cell line, HEPG-2 (position 47 in 800); rat fibroblast (position 7 in 800); human fibroblast (position 13 in 800) and subcutaneous connective tissue (position 17 in 800).

Table S5: Ethnopharmacological use of *H. lupulus*, biological activities of extracts and isolated compounds, predicted activities using Active-IT system.

Studies	Ethnopharmacological use, biological activities and predicted activities		Reference
Ethnopharmacological use	Lepra, foot odor, constipation and blood purification, anxiety, insomnia, stimulant of appetite, dyspepsia, pulmonary diseases and tuberculosis.		Karabín et al. (2015) and Karabin et al. (2016).
Biological activities described on literature	Sedative, estrogenic activity and related to osteoporosis, antimicrobial, anti-inflammatory, antiproliferative and antitumoral, neuroprotection, including brain bleeding, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, inhibit obesity, gastric stimulant, allergies.		Bocquet et al. (2018)
Predicted biological activities using two methods of software learning tools	Activity	Target	
	Antitumor	Cell line A549, human liver adenocarcinoma (4/800); acute myeloid leukemia (10/800); RECQ-1 (16/800); SWI/SNF (27/800); acute leukemia – related to BCL2 (31/800); histone H2A.x (33/800); <i>GLI family zinc finger 1</i> (35/800); retinoblastoma-related to protein 9 -RBBP9 (41/800); leukemia (42/800); cellular tumoral antigen (44/800); neuroblastoma (44/800); HEPG-2 (47/800)	
	Cytotoxicity/genotoxicities	Rat fibroblast (7/800); human fibroblast (13/800); subcutaneous connective tissue (17/800); carcinogenic (34/800); genotoxicity ATAD-5 (36/800)	
	Anti-parasitic	Trypanosome (2/800); <i>Plasmodium falciparum</i> (3/800); <i>Caenorhabditis elegans</i> (20/800)	
	Anti-inflammatory	NF-Kappa β (5/800); TLR-2 (21/800); fMet-Leu-Phe receptor (25/800); receptor 1 of esfingosin-1-phosphate (28/800)	
	Anti-microbial	<i>Salmonella typhimurum</i> (12/800); <i>Staphylococcus aureus</i> (23/800); <i>Candida albicans</i> (37/800)	
	Virus	Herpes simplex (18/800); HIV-1 (19/800); hepatitis C (32/800)	

	Cardiovascular/coagulation	Fibrogen – β chain (15/800); PDI (26/800); protein 3 (39/800)
	Endocrine	Steroid Coactivator Receptor 3- SRC-3 (50/800)

The numbers on parentheses indicates the classification position of the 800 class of activities

Table S6: *In silico* prediction of potential biological activities of compounds **1-8** identified on crude ethanolic and hidromethanolic extracts of *Humulus lupulus* leaves using *PASS online* tool

Potential biological Activities	Chemical compounds identified							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Anti-bacterial	0.613	0.678	0.668	0.665	0.611	0.677	0.588	0.702
Antifungal	0.717	0.786	0.780	0.780	0.714	0.784	0.685	0.805
Antioxidant	0.912	0.924	0.900	0.918	0.917	0.927	0.893	0.934
Antitumor	0.953	0.978	0.978	0.978	0.967	0.984	0.911	0.990
Antiviral	0.332	0.259	0.259	0.249	0.334	0.263	0.231	0.257
Anti-inflammatory	0.747	0.743	0.720	0.734	0.750	0.746	0.623	0.749

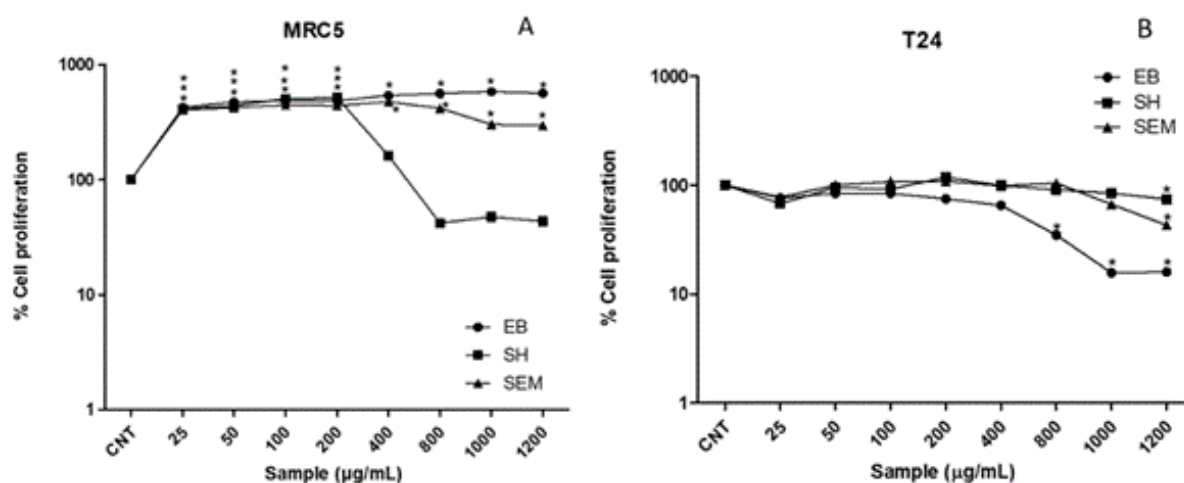


Figure S7: Percentage of viable cells (logarithm scale), 24 hours after treatment with ethanol extract (EB), hexane (SH) and hydromethanol (SEM) subextracts obtained from *Humulus lupulus* leaves using MRC-5 (A) and T24 (B) cell lines. Each point represents the experiment mean on triplicate ($p < 0,05$).

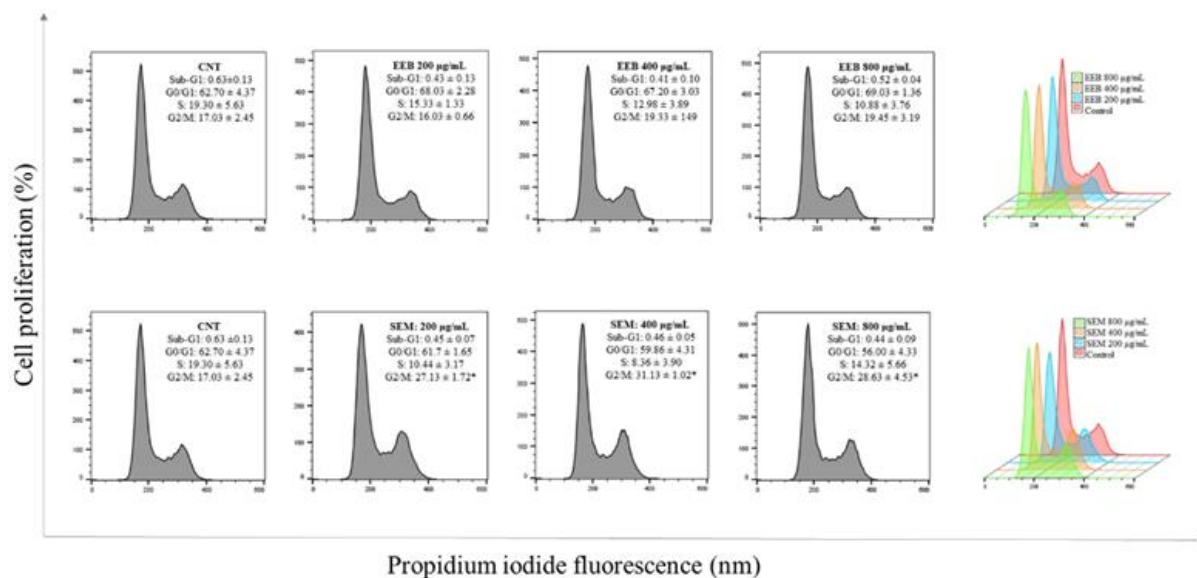


Figure S8: Percentage of T24 cells on mitotic phases G0/G1, S and G2M, after treatment with crude ethanolic extract (EB) and hydromethanolic (SEM) sub extracts obtained from *Humulus lupulus* leaves. The results are expressed as mean \pm standard deviation of triplicate (Colored only in online version).

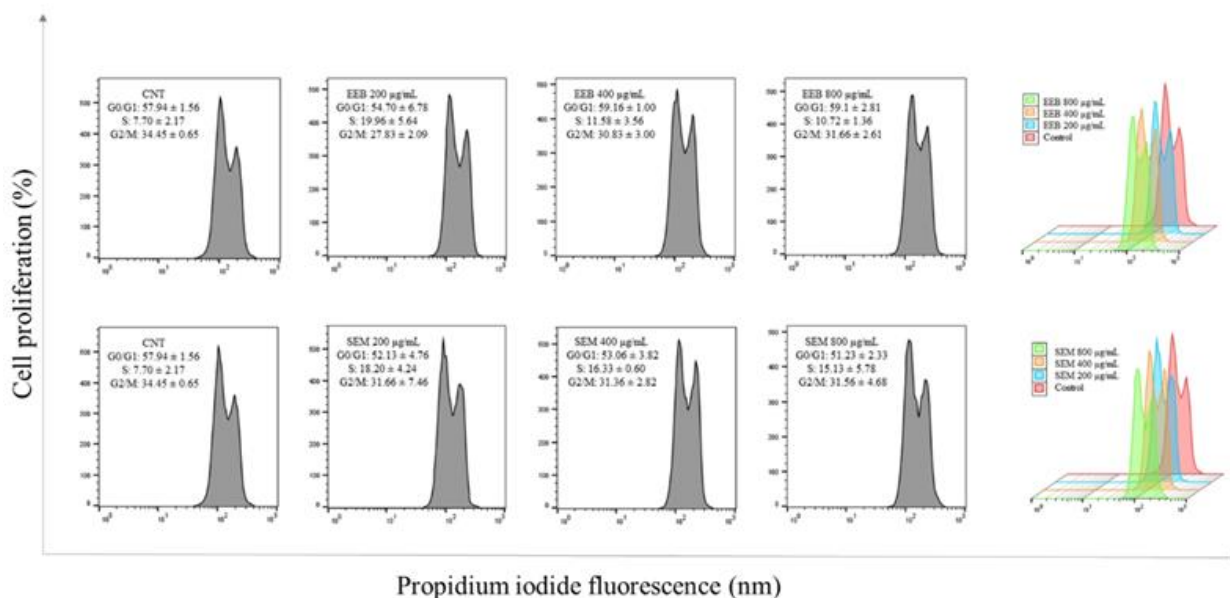


Figure S9: Percentage of MRC5 cells on mitotic phases G0/G1, S and G2M, after treatment with ethanol extract (EB) and hydromethanol (SEM) subextracts obtained from *Humulus lupulus* leaves. The results are expressed as mean \pm standard deviation of triplicate (Colored only in online version).

Additional References

- Bocquet L, Sahpaz S, Hilbert JL, Rambaud C, Riviere C. 2018. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochem. Rev.* 17: 1047–1090.
- Chadwick LR. 2004. Estrogens and congeners from spent hops [dissertation]. Chicago (IL): University of Illinois.
- Chang, CC, Lin, CJ. 2011. LIBSVM: A Library for Support Vector Machines. *ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology*, 2:27:1-27:27. [accessed 2019 Oct 1st]. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~{ }cjlin/libsvm>.
- de Oliveira, MLG, Assenco RAG, Silva GDF, Lopes JCD, Lanna MCS, Magalhães JC, Duarte LP, Filho SAV. 2014. Citotoxicity, Antipoliavirus activity and *in silico* biological evaluation of constituents of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- De Winter H, Lopes JCD. 2018. Reply to the comment made by Šicho, Vor´silák and Svozil on ‘The Power metric: A new statistically robust enrichment-type metric for virtual screening applications with early recovery capability’. *J. Cheminform.*
- Fang W, Xiong J, Xing Y, Xi T. 2009. *In Vitro* Anticancer Activities of Different Extraction Parts from the Stems and Leaves of *Humulus lupulus* L. and Identification of the Chemical Constituents Therein. [China]: Progress in Pharmaceutical Sciences.
- Farag MA, Porzel A, Schimidit J, Wessjohan LA. 2012. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*. 8: 492–507.
- Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2014;50:444–457.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*. 220: 1049-1051.
- Gontijo DC, Brandão GC, Gontijo PC, Oliveira AB, Diaz MAN, Fietto LG, Leite JPV. 2017. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. *Food Chemistry*. 230: 618–662.
- Hanley JA, McNeil BJ. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 143: 29–36.

- Hawkins PCD, Nicholls A. 2012. Conformer Generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.* 52: 2919–2936.
- Hawkins PCD, Skillman AG, Warren GL, Ellingson BA, Stahl MT. 2010. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and Cambridge structural database. *J. Chem. Inf. Model.* 50: 572–584.
- Karabın M, Hudcova T, Jelınek L, Dostálek P. 2016. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15: 542–567.
- Karabın M, Hudcova T, Jelınek L, Dostálek P. 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol. Adv.* 33: 1063–1090.
- Lagunin A, Stepanchikova A, Filimonov D, Poroikov V. 2000. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics.* 16: 747-748.
- Lopes JCD, Dos Santos FM, Martins-José A, Augustyns K, DeWinter H. 2017. The power metric: A new statistically robust enrichment-type metric for virtual screening applications with early recovery capability. *J. Cheminform.*
- Nakamura Y, Asahi H, Altaf-ul-amin MD, Kurokawa K, Kanaya S. 2018. KNApSAcK: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. [accessed 2018 Nov 18] <http://foodb.ca/compounds/FDB017133>.
- Negri G, Di Santi D, Tabach R. 2010. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 20(6):850-859.
- Nicholls A. 2011. What do we know?: Simple statistical techniques that help. *Methods Mol. Biol.* 672:531–581.
- Norinder U, Carlsson L, Boyer S, Eklund M. 2014. Introducing Conformal Prediction in Predictive Modeling. A Transparent and Flexible Alternative to Applicability Domain Determination. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (6): 1596-1603. doi.org/10.1021/ci5001168.
- Petito ES, Foster DJR, Ward MB, Sykes MJ. Molecular Modeling Approaches for the Prediction of Selected Pharmacokinetic Properties. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(26):2230-2238. doi: 10.2174/1568026619666181220105726.
- Rocha MP, Campana PRV, Scoaris DO, Almeida VL, Lopes JCD, Silva AF, Pieters L, Silva CG. 2018a. Biological activities of extracts from *Aspidosperma subincanum* Mart. and in silico prediction for inhibition of acetylcholinesterase

- Rocha MP, Campana PRV, Scoaris DO, Almeida VL, Lopes JCD, Shaw JMH, Silva CG. 2018b. Combined *in Vitro* Studies and *in Silico* Target Fishing for the Evaluation of the Biological Activities of *Diphylleia cymosa* and *Podophyllum hexandrum*. *Molecules* 23: 3303.
- Sägesser M, Deinzer M. 1996. HPLC-Ion Spray-Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 54: 129-134.
- Santos FM, DeWinter H, Augustyns K, Lopes JCD. 2015. Use of Extensive Cross-Validation and Bootstrap Application (ExCVBA) for Molecular Modeling of Some Pharmacokinetics Properties. [accessed 2018 December 1st]
https://www.researchgate.net/profile/Julio_Lopes2/publication/282644866_2015_-_Poster_OpenTox-_Use_of_Extensive_Cross-validation_and_Bootstrap_Application_ExCVBA_for_Molecular_Modeling_
- Wang X, Yu J, Li W, Wang C, Li H, Ju W, Chen J, Sun J. 2018. Characteristics and antioxidant activity of lignans in *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* from different locations. *Chem. Biodivers.* 15(6): e1800030. doi: 10.1002/cbdv.201800030.

In Machine Learning, performance measurement is an essential task. Thus, when it comes to a classification problem, we can count on an AUC-ROC curve. When we need to check or visualize the performance of the multi-class classification problem, we use AUC (Area Under the Curve) ROC (Receiver Operating characteristics) curve. It is one of the most important evaluation metrics for checking any classification model's performance. It is also written as AUROC (Area Under the Receiver Operating Characteristics).

<https://towardsdatascience.com/understanding-auc-roc-curve-68b2303cc9c5>