

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO VICTOR NUNES SILVA

**PROSPECÇÃO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE MICRORNAS E
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES VARIEDADES DE
LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS L.*)**

PATOS DE MINAS – MG

AGOSTO DE 2022

JOÃO VICTOR NUNES SILVA

**PROSPECÇÃO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE MICRORNAS E
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES VARIEDADES DE
LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS L.*)**

Dissertação de mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia
como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre.

**Orientador: Dr. Marcos de
Souza Gomes**

PATOS DE MINAS – MG

AGOSTO DE 2022

JOÃO VICTOR NUNES SILVA

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, João Victor Nunes, 1996-
2022 PROSPECÇÃO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE MICRORNAS E
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES VARIEDADES DE
LÚPULO (HUMULUS LUPULUS L.) [recurso eletrônico] / João
Victor Nunes Silva. - 2022.

Orientador: Marcos de Souza Gomes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.531>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Gomes, Marcos de Souza, 1981-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

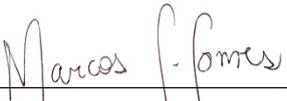
Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

**PROSPECÇÃO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE MICRORNAS E
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES VARIEDADES DE
LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS L.*)**

Dissertação de mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia
como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre.

Aprovado em 31/08/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes



Prof. Dr. Antonio Chalfun Junior



Dra. Livia Carneiro Fidélis Silva

PATOS DE MINAS – MG

2022

RESUMO GERAL

O presente trabalho foi realizado com objetivo de identificar o potencial antioxidante de 3 variedades de amargor (Galena, Sorachi Ace e Columbus Zeus) de lúpulo (*Humulus lupulus*) e de 3 variedades de aroma (East Kent Golding, Sladek e Cascade) por meio de extratos aquosos elaborados com o vegetal em estado peletizado simulando o processo industrial de adição do lúpulo durante a fervura submetidos a diferentes metodologias de avaliação. Objetivou-se também identificar e caracterizar, por meio de análises *in silico*, proteínas da via de biossíntese dos MicroRNAs além de promover a caracterização de suas estruturas primárias e secundárias. Os extratos foram obtidos por meio da fervura de um sistema formado por 0.2g do material vegetal peletizado em 100mL de água. Os tempos de fervura foram de 60 minutos para variedades de amargor e 5 minutos para as de aroma. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do teste Scott-Knott a 5% de probabilidade em sistema de delineamento totalmente casualizado. Os ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (Acido 2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonico) Sal Diamonico) revelaram um maior potencial antioxidante das variedades East Kent, Galena e Cascade. O teste da redução do complexo Fosfomolibdênio evidenciou maior potencial antioxidante das variedades East Kent, Cascade e Sorachii, já o ensaio do Poder redutor mostrou maior potencial antioxidante das variedades East Kent, Sorachi e Galena. Columbus e Sladek não receberam posições de destaques na maioria dos testes. Os valores de equivalência de massa em relação ao padrão BHT (Butilhidroxitolueno) ranqueou o potencial antioxidante das variedades na ordem East Kent, Galena, Cascade, Sorachi, Columbus e Sladek. Os resultados sugeriram que a atividade antioxidante não é dependente da classificação da variedade. Foi possível identificar e caracterizar proteínas da via de síntese dos microRNAs e microRNAs do lúpulo por meio de análises *in silico* via Blast+, ClustalX2, MEGA e RNAalifold. Foram encontradas 82 proteínas, 17 pertencentes as Argonautas, 12 Dicers, 13 DRBs (Proteínas de ligação ao RNA dupla fita) e 1 HEN1(Enzima metil-transferase HUA ENHANCER 1). Identificou-se 140 precursores de microRNAs e 192 maduros que fazem parte de 73 famílias. Um alto nível de conservação de sítios ativos nas proteínas e nas estruturas primárias e secundárias dos microRNAs preditos em comparação com moléculas de microRNAs e proteínas de espécies ortólogas foi evidenciado.

Palavras chaves: *Humulus lupulus*, Antioxidantes, microRNAs, Argonautas, Dicers

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of identifying the antioxidant potential of 3 bittering varieties (Galena, Sorachi Ace and Columbus Zeus) of hops (*Humulus lupulus*) and of 3 aroma varieties (East Kent Golding, Sladek and Cascade) by means of aqueous extracts made with the vegetable in a pelleted state, simulating the industrial process of adding hops during boiling, submitted to different evaluation methodologies. It was also aimed to identify and characterize, through in silico analysis, proteins of the MicroRNAs biosynthesis pathway, in addition to promoting the characterization of their primary and secondary structures. The extracts were obtained by boiling a system formed by 0.2g of pelleted plant material in 100mL of water. Boiling times were 60 minutes for bitter varieties and 5 minutes for aroma varieties. Statistical analyzes were performed using the Scott-Knott test at 5% probability in a completely randomized design. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid) Diamonic Acid) assays revealed a greater antioxidant potential of the East Kent, Galena and Cascade varieties. Columbus and Sladek did not receive top positions in most tests. The mass equivalence values in relation to the standard BHT (Butylhydroxytoluene) ranked the antioxidant potential of the varieties in the order East Kent, Galena, Cascade, Sorachi, Columbus and Sladek. The results suggested that the antioxidant activity is not dependent on the variety classification. It was possible to identify and characterize proteins of the hop microRNAs and microRNAs synthesis pathway by means of in silico analysis via Blast+, ClustalX2, MEGA and RNAalifold. 82 proteins were found, 17 belonging to Argonauts, 12 Dicers, 13 DRBs (Double-stranded RNA binding proteins) and 1 HEN1 (HUA ENHANCER 1 methyl-transferase enzyme). We identified 140 precursors of microRNAs and 192 mature ones that are part of 73 families. A high level of conservation of active sites in the proteins and in the primary and secondary structures of the predicted microRNAs compared to microRNA molecules and proteins from orthologous species was evidenced.

Keywords: *Humulus lupulus*, Antioxidants, microRNAs, Argonauts, Dicers

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 História e mercado do Lúpulo.	13
2.2 Fitoquímicos do lúpulo: resinas macias e duras	16
2.3 Polifenóis e óleos essenciais.....	18
2.4 Estresse oxidativo e contribuição do lúpulo	21
2.5 Métodos de análise de atividade antioxidante	23
2.6 Problemática, Aspectos moleculares e os MicroRNAs	25
REFERÊNCIAS	30
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	37
ARTIGO 1 - Avaliação da atividade antioxidantes e do teor de compostos fenólicos em 3 variedades de lúpulos comerciais de aroma e 3 de amargor.....	38
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Aquisição das amostras para a realização das análises.....	42
2.2 Preparação dos extratos	42
2.3 Análise dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	42
2.3.1 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH•.....	42
2.3.2 Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS ⁺ •	43
2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio	44
2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante por meio da metodologia do Poder Redutor	44
2.3.5 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais.....	44
2.4 Análises estatísticas	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1 Atividade Antioxidante medida por método DPPH	46

3.2 Atividade Antioxidante medida por método ABTS	47
3.3 Atividade antioxidante medida por redução do complexo fosfomolibdênio	49
3.4 Atividade Antioxidante avaliada pela metodologia do poder redutor	51
3.5 Compostos Fenólicos Totais.....	53
3.6 Atividade antioxidante das variedades de lúpulo expressa em equivalentes do padrão	55
4 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
MATERIAL SUPLEMENTAR.	58
ARTIGO 2: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM SUA SÍNTESE NO LÚPULO	61
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Identificação das proteínas da via de síntese dos sRNAs em <i>H. lupulus</i>	64
Predição dos microRNAs maduros e precursores (Pre-miRNAs).....	64
Análises <i>in silico</i> das proteínas da via de síntese dos sRNAs e dos precursores de miRNAs.....	66
Resultados.....	67
Análises das proteínas da via de síntese dos sRNAs em <i>H. lupulus</i> : Prováveis proteínas encontradas	67
Proteínas Argonautas e Dicer no lúpulo: Domínios conservados, sítios ativos e filogenia	68
Proteínas de ligação ao RNA dupla fita (DRBs) e HEN1: Domínios conservados, sítios ativos e filogenia.....	77
Predição de possíveis microRNAs precursores e maduros no lúpulo (<i>H. lupulus</i>).....	81
Discussão	92
Proteínas Argonautas e Dicer: Conservação de domínios e sítios ativos	92
Proteínas DRBs e HEN1.....	96
Muitos microRNAs do lúpulo se encontram conservados	99
Conclusão	101
Referências	102
Recursos de internet.....	106
Material suplementar.	107

ANEXOS..... 125

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A família *Cannabaceae* é composta por plantas angiospermas que se encontram distribuídas pelo planeta habitando principalmente regiões tropicais e temperadas dos hemisférios (JIN *et al.*, 2019). Essa família é composta por 10 gêneros, sendo *Cannabis*, *Humulus*, *Celtis*, *Pteroceltis*, *Aphananthe*, *Chaetachme*, *Gironniera*, *Lozanella*, *Trema* e *Parasponia* sendo os dois primeiros os mais importantes e os oito em sequência antigamente pertencentes a família *Celtidaceae*, juntos todos esses gêneros são representados por cerca de 170 espécies (MCPARTLAND, 2018). Dentre essas espécies destaca-se o lúpulo que é pertencente ao gênero *Humulus* o qual é representado por três principais espécies: *Humulus yunnanensis*, *Humulus japonicus* e *Humulus Lupulus* (BOUCQUET *et al.*, 2018)

Embora o lúpulo possua potencial para aplicação em outras atividades como a indústria farmacêutica aproximadamente 98% da produção mundial do vegetal é direcionada para a indústria cervejeira (KORPELAINEN.; PIETILÄINEN., 2021). Este ramo industrial explora os compostos presentes nos cones femininos não fertilizados que apresentam em suas glândulas de lupulina quantidades consideráveis de resinas e óleos essenciais bem como compostos fenólicos na porção vegetal do eixo central e pétalas (ALMAGER *et al.*, 2014; DURELLO *et al.*, 2019). Esses químicos são capazes de conferir para a bebida amargor, aroma e propriedades antioxidantes que são de extrema importância para o sucesso da cerveja ao longo da história (MURAKAMI *et al.*, 2006).

Os microRNAs são pequenas moléculas com tamanho entre 21 a 24 nucleotídeos, conhecidas por participar de processos regulatórios em animais e plantas (BORGES; MARTIENSSEN., 2015). A síntese dessas moléculas é complexa e depende de uma grande quantidade de proteínas centrais e acessórias que juntas irão compor uma via conservada nas plantas (WANG.; MEI.; REN., 2019). Já são conhecidos diversos processos em que os microRNAs atuam na reprodução e desenvolvimento do indivíduo, epigenética e defesa contra patógenos (BORGES; MARTIENSSEN., 2015). Este último é bastante importante visto que a cultura do lúpulo é alvo de diversos organismos patogênicos (GARGANI *et al.*, 2017).

Porém, pouco se sabe sobre o benefício dos fitoquímicos que o lúpulo pode ofertar para a saúde humana e sobre o perfil de conservação desses microRNAs no

vegetal. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de 3 variedades de lúpulos de amargor e 3 de aromapor meio de diferentes ensaios. Além disso, objetivou-se também identificar e caracterizar proteínas da via de síntese dos microRNAs bem como suas estruturas primárias e secundárias desses microRNAs. Os resultados desse trabalho permitirão entender melhor a conservação da via de síntese dos sRNAs no lúpulo e possibilitar o desenvolvimento de futuras aplicações com base nas proteínas da via e das moléculas de microRNAs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História e mercado do Lúpulo

O lúpulo é uma planta perene e dioica pertencente à família *Cannabaceae* que cresce no aspecto trepadeira, sendo adaptada às condições climáticas do hemisfério norte (MCCALLUM *et al.*, 2019). Há relatos provenientes de análises genéticas que apontam que a origem desse vegetal se deu em terras chinesas com posterior migração para territórios europeus e norte americano. Na Grécia antiga sua utilização tinha intuitos terapêuticos e alguns indícios apontam que os celtas foram os primeiros a destinar o lúpulo na produção da cerveja (MARCUSO; MULLER., 2017).

Relatos históricos apontam o uso de lúpulo em regiões diversas como Babilônia e Egito, entretanto pode-se considerar o estabelecimento de jardins contendo lúpulo em mosteiros na Alemanha e França por volta dos séculos VIII e IX d.C. como uma primeira etapa para a introdução do lúpulo na produção de cerveja (MOIR *et al.*, 2000). Diante disso, o emprego da planta na produção de cerveja por parte dos mosteiros era feito sem conhecimento profundo das propriedades do vegetal, de modo que não foi descrito se era utilizado para aromatizar ou para auxiliar na preservação da bebida. Foi apenas com estudos realizados em 1158 pela abade alemã Hildegard Von Bingen que apontaram propriedades antimicrobianas ligadas ao amargor da planta que auxilia na conservação da cerveja. Então o lúpulo foi recomendado na receita da bebida, sendo esse conhecimento levado adiante pelos mosteiros no século XIII e aprimorado com novas melhorias no processo de produção (SPÓSITO *et al.*, 2019).

Em decorrência da importância que a cerveja alcançou ao longo de sua história e a preocupação com a qualidade do produto final, a relevância do lúpulo também aumentou. Como principal marco que ilustra esse cenário pode-se citar a lei da pureza alemã, que é um dos decretos alimentares mais antigos que se tem conhecimento, promulgada em 1516 pelo duque Guilherme IV da Baviera onde dizia que a cerveja só poderia ser fabricada com água, malte e lúpulo, fazendo com que a preocupação com a qualidade de cada um desses ingredientes fosse constante e obrigando o emprego de lúpulo no processo produtivo. Embora essa lei funcionasse como uma espécie de selo de qualidade, com o advento de novas tecnologias e descoberta das leveduras ela perdeu bastante relevância para o mercado (FERREIRA *et al.*, 2011).

O gênero *Humulus* é pertencente a ordem Rosales e é representado por três espécies: *H. lupulus*, *H. yunnanensis* e *H. japonicus*, embora apenas a primeira e a terceira espécie sejam cultivadas em larga escala para atender a indústria cervejeira. Apesar de apresentar potencial terapêutico, devido a sua atividade antimicrobiana, estrogênica e anti-inflamatória, quase 97% da produção mundial do lúpulo é destinada para indústria cervejeira. Todo esse volume de planta empregado na produção da bebida é justificado porque a flor feminina não fertilizada contém, nas suas glândulas de lupulina localizadas próximas ao eixo central do vegetal, substâncias químicas de interesse em quantidades relevantes, sendo essas responsáveis por garantir amargor, aroma, estabilidade coloidal e proteção contra possíveis contaminantes (DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019).

Apesar do lúpulo ser de grande importância para o processo cervejeiro, ele não pode ser produzido com qualidade em qualquer região do planeta, visto que necessita de condições climáticas específicas para seu desenvolvimento. A planta precisa de um fotoperíodo mais longo no que diz respeito à duração do dia, temperaturas no verão adequadas, solos férteis e profundos e índices pluviométricos ideais. Diante disso, as regiões mais adaptadas para o cultivo do lúpulo são aquelas que apresentam climas moderados, com latitudes entre 35 e 55 dos hemisférios norte e sul do planeta. Esse gargalo implica diretamente na área produtiva do vegetal fazendo com que mais de 60% do território mundial empregado na cultura do lúpulo esteja restrito entre Alemanha e Estados Unidos, além de outros países europeus como Inglaterra, Eslovênia, Polônia e em outros continentes como China e Nova Zelândia (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Diante dessas limitações climáticas, torna-se bastante difícil conseguir produzir lúpulo com qualidade de rendimento e preço em regiões tropicais como o Brasil. Entretanto, esforços têm sido feitos na tentativa de cultivar a planta em regiões sul, sudeste, norte e nordeste do território nacional, conseguindo resultados promissores em cidades dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia. Essa tentativa busca reduzir as importações de lúpulo que é um produto caro e dessa forma, com o advento de variedades nacionais, seria possível reduzir o custo de produção e, conseqüentemente, o preço do produto final. Esse cenário ainda é distante, visto que a maioria do lúpulo produzido no Brasil é destinado a pequenas cervejarias e cervejeiros caseiros que produzem bebidas artesanais (DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019).

Os lúpulos são representados por duas variedades, que podem ser de amargor ou de aroma. Essa classificação se dá pelas propriedades sensoriais que vão garantir para o

produto final, cujas variedades de amargor são marcadas por maiores concentrações de α -ácidos, podendo apresentar variações nas quantidades dessa molécula. Já as variedades de aroma são marcadas pela qualidade e quantidade de óleos essenciais contidos nos cones e que serão disponibilizados para a cerveja. Embora esse tipo de lúpulo seja reconhecido por essa característica, é importante ressaltar que ele também apresenta cerca de 10% de α -ácidos, o que é bem menor em comparação com as variedades de amargor que apresentam entre 10 a 20% desses ácidos. Essas características implicam em diferenças de aplicação dos lúpulos no processo cervejeiro onde os de amargor são utilizados no início do processo de fervura do mosto e os de aroma em fases finais da fervura (ALMAGUER *et al.*, 2015).

O mercado mundial de lúpulo é aquecido devido à grande demanda para atender ao processo cervejeiro, visto que como mostrado anteriormente, quase toda a produção de lúpulo é destinada para a cerveja. Diante disso, os grandes países produtores também se apresentam como exportadores, fazendo com que haja uma diferença natural de área dispendida para o cultivo e da quantidade em toneladas da planta que é produzida e nesse cenário. Nesse contexto, os Estados Unidos e a Alemanha recebem posições de destaque. Isso foi evidente em 2019 quando essas duas nações foram responsáveis por 40 e 38%, da produção vegetal, respectivamente, superando por muito China e República Checa com 5% cada, Reino Unido com 1% e o restante das áreas produtoras que representaram apenas 4% da produção mundial (STATISTA, 2020).

Ao analisar os dados de produção anteriores ao ano de 2019, observa-se que essa tendência de mercado sempre se manteve com o domínio de EUA e Alemanha na produção e área de cultivo. Em 2018 os estadunidenses foram responsáveis por 49.173 toneladas de lúpulo produzidos em uma área de 23.256 hectares, sendo que da produção total 33.272 toneladas foram de lúpulos de aroma e 15.901 toneladas de variedades de amargor fazendo uso de 17.255 hectares para variedades de aroma e 6.001 hectares para variedades de amargor. Já na Alemanha o perfil de produção foi diferente obtendo um total de 41.794 toneladas divididas em 20.054 de aroma e 21.740 de amargor oriundas de 20144 hectares divididos em 10.822 de aroma e 8465 de amargor (IHGC., 2019).

Em 2019, para essas duas nações, houve um leve aumento, tanto na produção quanto na área utilizada, a qual apresenta variações inconstantes desde o ano 2005. Outras nações também apresentaram aumento na produção e área de cultivo, entretanto não se compararam aos estadunidenses e alemães que também são grandes exportadores, arrecadando valores consideráveis nas transações. O Brasil não aparece

nas estatísticas de produção devido a fatores climáticos, entretanto é um grande importador de lúpulo e figura entre os 10 maiores no mundo (IHGC, 2019; TRIDGE, 2018; OEC, 2018).

2.2 Fitoquímicos do lúpulo: resinas macias e duras

Os cones dos lúpulos contêm diversas moléculas já descritas como aminoácidos, proteínas, cinzas, graxas, esteroides, monossacarídeos, celulose, pectinas e polifenóis, entretanto são as resinas e óleos essenciais que recebem maior destaque no processo cervejeiro. Essas resinas totais possuem substâncias responsáveis por conferir sabor e amargor ao produto e podem ser divididas em duas grandes frações, que são as resinas macias e duras, determinadas de acordo com sua solubilidade. As resinas macias possuem aspecto viscoso e denso, enquanto as duras têm aspecto de um pó escuro (ALMAGUER *et al.*, 2014; TANIGUCHI *et al.*, 2014).

As resinas macias são constituídas de α -ácidos, β -ácidos e de uma fração denominada de resinas macias não caracterizadas. Esse grupo compreende compostos que não se enquadraram nas condições dos ácidos previamente citados, pode ser dividido em fração α e β (STEVENS, R., 1966). O grupo dos α -ácidos são encontrados nas glândulas de lupulina no interior dos cones da planta e são compostos em sua maioria por humulonas, cohumulonas, adhumulonas, prehumulonas e posthumulonas, sendo essas duas últimas encontradas em quantidades bem menores (DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019).

Essas moléculas têm a capacidade de se isomerizar durante a fervura, assumindo formas *cis* e *trans* com diferenças nos grupamentos radicais compatíveis com cada molécula origem antes da isomerização, de modo a gerar então dez possíveis isômeros. Esse fenômeno produz esses novos compostos que são mais solúveis que as formas anteriores e são responsáveis pela maioria do amargor que o lúpulo fornece para a cerveja. O composto *cis* é mais amargo que o *trans*, logo essa característica sensorial é mais atribuída a ele (SILVA, FARIA, 2008; DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019).

Embora a principal função dos iso α -ácidos seja contribuir para o amargor da bebida outras propriedades já foram atribuídas a essas moléculas como atividade tensoativa, contribui para estabilização da espuma e protege contra contaminação por bactérias gram positivas e outros microrganismos, apesar de existir bactérias que são

resistentes aos ácidos (KEUKELEIRE, D., 2000). Já os β -ácidos, que também possuem análogos semelhantes aos α -ácidos, são compostos pela lupulona, adlupulona, colupulona, postlupulona e prelupulona que são análogos estruturais das humulonas com a adição de três radicais prenil, possuindo valor de pKa variando entre 4,0 a 7,8, o que reflete em menor acidez quando comparados aos α -ácidos (DOSTÁLEK, KARABIN, JELINEK, 2017; DURELLO, SILVA, JR., 2019).

Pelo fato da sua solubilidade em água ser bem menor, acreditava-se que os β -ácidos não contribuíam para o amargor da cerveja, o que os fazia importante apenas na atividade antimicrobiana proporcionada pela capacidade de alterar trocas iônicas na membrana celular de microrganismos. Entretanto estudos mostraram a capacidade das lupulonas em gerar precursores de substâncias amargas durante a fervura do mosto (DOSTÁLEK, KARABIN, JELINEK, 2017; DURELLO, SILVA, JR., 2019).

Desoxihumulonas já foram reportadas como precursoras de humulonas e lupulonas e, juntamente com hulupolunas, produtos de oxidação dos β -ácidos, foram colocadas como constituintes das resinas macias não caracterizadas (HUDSON *et al.*, 1962). Já foram encontrados nessa fração óleos essenciais e ceras, visto que esses óleos apresentam solubilidade em éter, sendo possível ainda separar essa cera com solução metanólica de maneira lenta, o que faz que restem apenas traços dela na fração de resinas não caracterizadas (ALMAGUER *et al.*, 2014). Essas resinas não caracterizadas não possuem um papel claro no sabor da cerveja e isso faz com que elas não impactem gravemente no valor de um determinado lúpulo, ou seja, não parecem ser parâmetros de extrema importância em sua escolha (LEWIS, YOUNG., 2002).

As resinas duras são caracterizadas por serem insolúveis em hexano, visto que são constituídas por grande parte de compostos polares, e consistem em sua maior parte de chalconas preniladas e flavononas, apresentando o xantohumulol como sendo o componente de destaque dessa fração. Esse composto juntamente com sua forma isomerizada isoxantohumulol, desmetilxantohumulol e os produtos da isomerização 8-prenilnarigenina e 6-prenilnarigenina já foram indicados como possíveis coativadores dos receptores de percepção do amargor em humanos hTAS2R1, hTAS2R14, hTAS2R40. Além disso, outras propriedades interessantes de componentes das resinas duras já foram apontadas, pode-se citar o xantohumulol, 8-prenilnarigenina e isoxantohumulol com possíveis atividades antitumorais para os dois primeiros e estrogênica para o último (DRESEL, DUNKEL, HOFMANN, 2015; STEENACKERS, COOMAN, VOS; 2015).

Estudos iniciais indicaram a presença de uma fração das resinas duras nos lúpulos, formada por oxidação de produtos não solúveis em água. Esses compostos eram verificados em pequenas quantidades em plantas novas, ao passo que em plantas mais velhas as concentrações eram bem maiores, indicando que durante o envelhecimento dos lúpulos armazenados ocorria a oxidação dos compostos previamente citados e eles se acumulavam. Diante disso, foi atribuído a esses compostos a nomenclatura de resinas duras - δ que apresentavam um amargor agradável e propriedades bacteriostáticas fracas quando comparadas às humulonas (WALKERS *et al.*, 1952). Mais tarde essas suspeitas se confirmaram com os resultados de novos trabalhos, provando que de fato essa fração da resina era fruto de oxidação das humulonas e lupulonas, formando compostos com anéis de 5 membros que receberam a nomenclatura de huluponas e ácido hulupulínico (DURELLO; SILVA; JR., 2019).

A última fração das resinas duras é denominada de resinas - ϵ e esta compreende cerca de 80% do conteúdo total das resinas duras. Nessa fração não são encontrados muitos compostos com polaridade muito elevada, ao mesmo tempo que as concentrações de xantohumol e sua forma isomerizada são bem menores, quando comparados com a fração anterior. Além disso, tem-se composições diferenciadas entre variedades diferentes de lúpulo, nos compostos que fazem parte desse grupo, o qual pode ser dividido em muitas frações que divergem entre si em solubilidade e propriedades físicas. As resinas ϵ também são capazes de conferir amargor e atividade antimicrobiana a cerveja, e estudos indicam que as frações mais polares não contribuem para essas características, enquanto as mais apolares as apresentam em grandeza diretamente proporcional a apolaridade, ou seja, quanto mais apolares mais amargas e maior atividade antibacteriana elas vão conferir (ALMAGUER *et al.*, 2014).

2.3 Polifenóis e óleos essenciais

Os polifenóis são um grupo extenso de compostos que ocorrem naturalmente na natureza e podem ser encontrados em inúmeras fontes como frutas, sementes, folhas e outros materiais de origem vegetal. Esse grupo pode ser definido como estruturas que apresentam grupamentos fenóis, os quais se dão pela presença de anéis aromáticos junto a grupamentos hidroxila, sendo essas mais ou menos complexas, fazendo com que existam vários subgrupos com características distintas, sendo que, na natureza, os

polifenóis geralmente não são encontrados em sua forma livre e sim conjugados a açúcares como monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos (CUTRIM; CORTEZ., 2018).

Duas vias bioquímicas que podem ocorrer de maneira sinérgica ou independente são conhecidas por originar grande parte desses compostos: a via dos policetídeos, onde o acetato ativado se liga a esse policetídeos dando início ao processo que terminará na ciclização em polifenóis. O outro caminho é a via do ácido chiquímico responsável por captar precursores da glicólise e pentose fosfato e transformá-los em aminoácidos que darão origem a precursores de polifenóis como os ácidos cafeico e ferúlico (CUTRIM; CORTEZ., 2018).

No lúpulo os polifenóis são bastante heterogêneos, visto que é possível encontrar estruturas químicas diversas que fazem parte desse grupo. Já foram identificadas mais de 1000 representantes nos cones das plantas, geralmente na fração verde onde se encontra maior concentração, visto que apenas os prenilflavonoides estão nas glândulas de lupulina juntamente as resinas e os óleos essenciais. Pode-se dizer que no lúpulo esses polifenóis se apresentam em dois grandes grupos, aqueles glicosilados e os não glicosilados que possuem formas oligoméricas e monoméricas (DOSTÁLEK; KARABIN; JELÍNEK., 2017).

No grupo dos não glicosilados já foram encontrados taninos representando a fração oligomérica, e ácidos fenólicos, cumarinas e flavonoides representando a fração monomérica. No grupo dos flavonoides se tem conhecimento dos flavan-3-ols, catequinas e epicatequinas, antocianinas, flavonols e flavononols e representando o grupo dos glicosilados, tem-se as rutinas e isoquercitrinas como exemplos (DOSTÁLEK; KARABIN; JELÍNEK., 2017).

As propriedades conferidas por esses polifenóis são diversas e estão geralmente ligadas ao seu peso molecular. Trabalhos indicam a importância desses fitoquímicos para a saúde humana, visto que apresentam atividade anticarcinogênica, antimicrobiana, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante, que é uma das principais. No processo cervejeiro os polifenóis de baixo peso molecular contribuem bastante para a proteção contra a oxidação do mosto e da cerveja, ao passo que os de grande peso molecular têm contribuição para a formação da névoa da cerveja e na coloração da bebida (GOIRIS *et al.*, 2014).

O impacto antioxidante desses compostos vem basicamente da capacidade de neutralizar radicais livres, quelar ânions metálicos e inibir enzimas. Além disso, eles

também possuem contribuições para o amargor e adstringência da bebida, dependendo da concentração, bem como capacidade de preservar por mais tempo o sabor da cerveja prevenindo deterioração rápida dele (GOIRIS *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais são substâncias naturais com estruturas complexas e variadas encontradas em diversas plantas como produtos do metabolismo secundário. São substâncias voláteis, líquidas, raramente apresentam cores, geralmente menos densas que a água e solúveis em lipídeos e solventes de características orgânicas. Na natureza são responsáveis por proteger os vegetais de infecções bacterianas, virais e fúngicas além de dificultar a ingestão da planta por parte de herbívoros e atrair polinizadores a fim de facilitar a dispersão da espécie (BAKKALI *et al.*, 2008).

Sabe-se que esses óleos essenciais podem ser produzidos por diversas partes do organismo vegetal como folhas, flores, raízes, sementes e frutas e se apresentam de maneira conjunta de modo que dois ou três componentes representam quase a totalidade da mistura, ao passo que os demais estão presentes em traços. Essa condição determina que a atividade biológica do óleo essencial seja dada pelos componentes majoritários, ou seja, a mesma propriedade deles será a da mistura total (BAKKALI *et al.*, 2008).

No lúpulo os óleos essenciais começam a ser produzidos em estágios diferentes de acordo com a variedade, visto que em algumas, eles começam a ser produzidos juntamente com as resinas, e essa produção só ocorre após o total estabelecimento das resinas. Além disso, a síntese dos óleos é mais lenta que a das resinas, fazendo com que o tempo de colheita seja essencial para fazer o melhor uso das concentrações dos compostos (SHARPE; LAWS., 1981).

A composição química dos óleos do lúpulo é variada e pode ser agrupada em compostos hidrocarbonados que são os monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos, em compostos oxigenados representados por álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres, e em compostos que contêm enxofre como os tioésteres. Diante do exposto, no processo cervejeiro os óleos essenciais do lúpulo são explorados para conferir aromas para a bebida. Embora haja perdas durante a fervura, alguns compostos podem ser percebidos em concentrações pequenas, o que faz que o processo funcione bem e as propriedades dos óleos essenciais sejam transferidas para a bebida no final (SHARPE; LAWS., 1981).

2.4 Estresse oxidativo e contribuição do lúpulo

O estresse oxidativo se dá quando ocorre um desequilíbrio na produção de radicais livres com os mecanismos neutralizantes dos organismos ou de compostos exógenos que auxiliam na contenção dos radicais. As espécies reativas de oxigênio como, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio singleto são conhecidos por participar de diversos eventos celulares como, fosforilação de proteínas e ativação de fatores de transcrição. Entretanto eles devem ser mantidos em concentrações pequenas para garantir o perfeito funcionamento do organismo (PIZZINO *et al.*, 2017).

Diante disso, a célula conta com sistemas enzimáticos, que utilizam essas espécies como substratos, fazendo com que a concentração delas seja equilibrada no interior da célula. Essas enzimas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (Gpx). Entretanto, quando o equilíbrio é desfeito, por aumento da produção das espécies reativas, elas são capazes de causar dano oxidativo em estruturas de valor para célula como proteínas, lipídeos e até mesmo ácidos nucleicos. Essa situação de estresse oxidativo é ligada com inúmeros distúrbios como cânceres, doenças cardiovasculares, influência na maturação sexual, doenças de rim, respiratórias dentre outras (PIZZINO *et al.*, 2017).

O lúpulo pode contribuir para o combate do estresse oxidativo, visto que é fonte de polifenóis que ajudam a prevenir contra o aparecimento de sabores indesejados, devido a oxidação de compostos de interesse, e esses, quando passados para as bebidas, estariam ajudando no balanço dos radicais livres (KROFTA; MIKYSKA; HASKOVÁ., 2008). Esses compostos fazem parte do grupo dos antioxidantes exógenos, o qual é composto por estruturas não enzimáticas obtidas de fontes animais ou vegetais as quais possuem a capacidade de auxiliar no balanço do estresse oxidativo e são exemplos de participantes desse grupo o ácido lipoico, L-arginina e glutathione (PIZZINO *et al.*, 2017).

A capacidade dos polifenóis em atuar como antioxidantes se dá pela sua estrutura, na qual o grupamento hidroxila reage com os radicais livres, fazendo uso do elétron desemparelhado, e isso produz um novo composto menos reativo que é estabilizado pelo anel fenil, logo o radical antes livre não estará mais disponível para reagir com biomoléculas do organismo (Figura 1) (ELROD *et al.*, 2019).

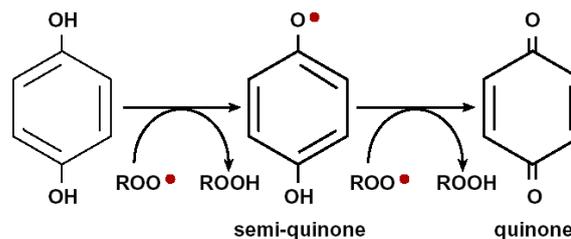


Figura 1: Exemplo do mecanismo de reação antioxidante dos polifenóis

Fonte: Tadapaneni., 2010

Outra contribuição que o lúpulo pode dar para lidar contra o estresse oxidativo é feita via xantohumol. Estudos *in vitro* indicam que esse composto possui atividade antioxidante sendo capaz de inibir oxidação de LDL (Lipoproteína de baixa densidade) em combinação com α -tocopherol e estimular mecanismos de defesa contra estresse oxidativo provocado por químicos. Além disso, ele inibiu respostas inflamatórias em células microglias, induzindo regulação positiva em enzimas antioxidantes. Exibiu também efeito protetor contra peroxidação de lipídeos e proteção da degradação de enzimas antioxidantes, utilizando de vias que culminam na ativação de enzimas antioxidantes que vão auxiliar na hepatoproteção (LIU *et al.*, 2015).

Logo os efeitos do xantohumol na prevenção do estresse oxidativo se dão pela redução direta dos radicais, ou estimulando enzimas antioxidantes dos organismos, entretanto essas características ainda carecem de mais estudos com relação aos seres humanos, visto que boa parte desses experimentos foram feitos *in vitro* ou usando camundongos (LIU *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais também contribuem para a atividade antioxidante dos lúpulos, entretanto, comparado com os polifenóis, os resultados são diferentes. Algumas espécies já foram investigadas, como por o linalol, que mostrou capacidade neutralizante de peroxidação lipídica em cérebros de porcos da Índia, comparando com efeitos da vitamina E e do ácido lipoico. Outros compostos também exibiram alguns resultados interessantes como o mirceno que foi capaz de proteger células de ratos da oxidação, por meio do aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase e os sesquiterpenos α -humuleno e β -cariofileno, os quais foram testados para a capacidade de neutralizar radicais livres, revelando o β -cariofileno com atividade de proteção contra oxidação lipídica (KARABIN *et al.*, 2016).

Além disso, o sesquiterpeno β -farneseno em amostras de sangue humano proporcionou um leve aumento da atividade antioxidante após o tratamento e, em neurônios do córtex cerebral de ratos mostrou redução do radical peróxido de hidrogênio, sugerindo possível atividade neuroprotetora. Logo esses óleos essenciais também podem contribuir para a atividade antioxidante do lúpulo (KARABIN *et al.*, 2016).

2.5 Métodos de análise de atividade antioxidante

Vários métodos para a detecção e quantificação de atividade antioxidante dos compostos estão disponíveis na literatura, e eles podem ser baseados em técnicas cromatográficas, eletroquímicas e espectroscópicas. Este último baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes em interagir com os radicais livres, formando novas estruturas capazes de emitir coloração em determinadas regiões do espectro, que serão quantificadas e interpretadas após esse evento. No grupo nas análises espectroscópicas existem técnicas bastante utilizadas como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (Acido 2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonico) Sal Diamonico), FRAP (Poder redutor do ferro) e CUPRAC (Capacidade antioxidante de redução do íon cobre), sendo que todos eles possuem caráter colorimétrico e são feitos em presença de solventes diferentes. Esses princípios utilizam reação distintas e, conseqüentemente, apresentam limitações distintas, logo é recomendável realizar mais de um ensaio para poder explorar o máximo de cada uma dessas técnicas (OJHA *et al.*, 2018).

O método DPPH é realizado com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, que é uma estrutura estável devidos aos três anéis aromáticos que o compõe. Esses anéis possibilitam o efeito de ressonância que é fundamental para a estabilização da carga eletrônica do radical, que permite ao DPPH ter uma coloração púrpura próximo ao violeta na faixa de 515 a 520 nanômetros em solução de etanol ou metanol. Quando o composto antioxidante doa um átomo de hidrogênio ou um elétron para o radical, este assume sua forma reduzida, o que acarreta na mudança de cor da solução para amarelo pálido ou violeta claro em decorrência da diminuição da absorbância do radical em seu estado não reduzido. Essa queda é medida pelo espectrofotômetro e está relacionada com a capacidade antioxidante dos compostos avaliados (OJHA *et al.*; 2018; OLIVEIRA., 2015).

Já o método ABTS é feito a partir do radical (2,2-azino-bis-3 - etilbenzothiazolino-6-ácido sulfônico) que é um composto cromóforo também estável que apresenta boa solubilidade em água e absorvância primária em 414 nanômetros e secundárias em 645, 734 e 815 nanômetros. Esse composto é reduzido em presença de antioxidantes, provocando redução na absorvância em diferentes tempos os quais são lidos pelo espectrofotômetro e plotados em gráficos (SUCUPIRA *et al.*, 2012). A coloração do cátion ABTS é azul esverdeada e com a ação do antioxidante, reduzindo esse composto essa coloração é perdida, sendo possível aferir a porcentagem de inibição do cátion com a comparação com padrões antioxidantes como o Trolox, ou outro antioxidante sintético, submetido às mesmas condições que o ABTS. Essa técnica é bastante útil para trabalhos com antioxidantes de características puras, em extrato, lipossolúveis ou hidrossolúveis e tem sido aplicado em diversos trabalhos, buscando determinar a capacidade antioxidante de plantas (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

O método do poder redutor baseia-se na capacidade de aumentar a absorvância dos ensaios, os quais se tem interesse em avaliar o potencial antioxidante. Com base nisso, os compostos antioxidantes presentes no analito reagirão com um sistema composto por ferrocianeto de potássio, ácido tri-cloro acético e cloreto de ferro, formando complexos coloridos com absorvância na faixa de 700nm. Desse modo, o aumento da absorvância provocada pela reação dos compostos antioxidantes da amostra com o sistema é responsivo a atividade antioxidante que ele possui, logo quanto maior essa absorvância, maior poder redutor do composto. Trata-se de uma metodologia colorimétrica também lida em espectrofotômetro e comparada a uma amostra em branco previamente estabelecida (ALAM, BRISTI, RAFIQUZZMAN., 2013).

Outra abordagem bastante utilizada em ensaios buscando a atividade antioxidante de extratos vegetais, é a formação do complexo molibdênio. Trata-se de um método colorimétrico que se baseia na redução do molibdênio +6 a molibdênio +5 por meio da ação do composto antioxidante de interesse, com posterior formação de um complexo fosfato/molibdênio +5 de coloração verde que acontece em pH ácido. Essa absorvância também pode ser lida por meio de espectrofotômetro com absorvância por volta de 695 nm e comparada a amostra em branco previamente estabelecida. Esse método já foi bastante trabalhado buscando otimizar padrões de repetibilidade e reprodutibilidade, bem como coeficientes molares de absorvância para diversos compostos antioxidantes (PINEDA, AGUILAR., 1999).

O método de avaliação antioxidante baseado no reagente de Folin-Ciocalteu é de característica colorimétrica e se dá por meio da interação de substâncias redutoras provenientes do analito de interesse com o reagente. Esse reagente é composto por ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico e possui coloração amarela em seu estado natural e irá ser reduzido pela ação dos componentes presentes no analito de interesse (PIRES *et al.*, 2017). Em pH alcalino essas substâncias redutoras como os compostos fenólicos irão dissociar um próton formando o ânion fenolato, o qual é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu produzindo óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, os quais possuem coloração azulada detectável em espectrofotômetro a 760 nm. Logo quanto maior for a atividade antioxidante, mais azul o sistema ficará e conseqüentemente maior quantidade de substâncias redutoras e fenólicas no meio. Entretanto esse reagente não é específico para grupos fenólicos e pode sofrer interferência de outras espécies redutoras no meio (PIRES *et al.*, 2017).

2.6 Problemática, aspectos moleculares e os MicroRNAs do lúpulo

Embora o lúpulo se desenvolva melhor em condições ambientais restritas sua cultura ainda sofre com diversas doenças causadas por patógenos variados, como artrópodes, nematoides, fungos e vírus (GARGANI *et al.*, 2017). Pode-se citar *Phorodon humuli* como um dos principais insetos que atacam áreas de produção de lúpulo, já entre os nematoides a espécie mais conhecida por causar danos a culturas de lúpulo é a *Heterodera humuli*, mas também já foram reportadas as espécies *Meloidogyne hapla*, *Xiphinema americanum* e *Meloidogyne incógnita* como parasitas de lúpulo (LORENZANA *et al.*, 2013; WATSON *et al.*, 2020; GONSAGA *et al.*, 2020).

Entre os vírus já são conhecidos diversos tipos capazes de afetar o lúpulo, sendo os principais o vírus dublê do lúpulo (HSVd), vírus latente do lúpulo (HLVd), a cepa do lúpulo do vírus do mosaico arabis (ArMV-H), o vírus do mosaico do lúpulo (HMLV), o vírus latente do lúpulo (HLV) e o vírus latente do lúpulo americano (AHLV) (GARGANI *et al.*, 2017). Já para as doenças causadas por fungos a espécie *Verticillium nonalfalfae* tem como seu principal hospedeiro o lúpulo infectando-o através das raízes espalhando-se pelo xilema da planta secretando fatores de virulências que ocasionam diversos sintomas (FLAJŠMAN.; RADÍŠEK.; JAVORNIK., 2017).

O manejo da plantação infestada com insetos geralmente é feito com o auxílio de inseticidas que vão variar dependendo da espécie do inseto que afeta a cultura, mesma estratégia adotada contra os fungos que demandam o uso de fungicidas. O manejo de culturas afetadas por vírus envolve o uso de inseticidas para diminuir transmissões secundárias e o uso de estoques de plantas livres de vírus para diminuir a transmissão por propagação vegetativa. Os nematoides geralmente são combatidos com uso de nematicidas, que possui algumas limitações com relação a quantidade efetivas aplicadas nos sistemas radiculares profundos. A seleção de todos esses químicos é feita tomando os cuidados com a toxicidade e manejo contra a resistência por parte dos patógenos (GENT *et al.*, 2010).

Entretanto a maioria dos químicos utilizados não são específicos e podem matar indivíduos que são inofensivos ou até mesmo importantes para um ecossistema. Além disso podem também contaminar recursos hídricos, solos, ar e até mesmo se acumular nas cadeias alimentares, afetando os níveis tróficos superiores como os humanos (GILL.; GARG., 2014). Uma boa alternativa para o controle da situação é a implementação de programas de melhoramento no lúpulo os quais existem e buscam além de qualidades interessantes para a indústria cervejeira, como alto amargor e óleos essenciais específicos, a resistência contra os patógenos (TEGHTMEYER., 2018). O lúpulo pode levar até dois anos para atingir a maturidade reprodutiva o que limita o melhoramento convencional e faz necessária a busca por marcadores moleculares que auxiliam na seleção, e por isso um melhor entendimento molecular é essencial para possibilitar o sucesso da técnica (ČERENAK *et al.*, 2019).

Esforços foram feitos para a implementação de métodos moleculares em programas de melhoramento do lúpulo visando a identificação de marcadores polimórficos e a compreensão da diversidade genética (HOWARD *et al.*, 2011). O número de marcadores era escasso levando pesquisadores a adotar novas abordagens como os microssatélites, expandindo o horizonte para a busca de marcadores confiáveis (KOELLING *et al.*, 2012; SINGH *et al.* 2012). Diante disso, foi necessário um melhor entendimento a respeito do genoma das cultivares de lúpulo, situação essa que levou os pesquisadores a elucidar *drafts* de genomas, como foi feito por Natsume e colaboradores, por meio de sequenciamentos e montagens sem genomas de referência, produzindo resultados que cobriam quase a totalidade do genoma do lúpulo (NATSUME *et al.*, 2015).

A fim de fomentar a crescente busca por conhecimento a respeito do genoma do lúpulo e unificar os esforços feitos, por meio dos *drafts* genômicos e montagem de transcriptomas, foi criado o recurso Hopbase que trouxe a anotação gênica ao *draft* genômico Shinsuwase da cultivar Teamaker. Esses dados de anotação genômica foram reunidos em um banco de dados que conta com uma ferramenta de navegador e blast, isso potencializou consideravelmente as pesquisas (HILL *et al.*, 2017). Além disso, esforços também foram feitos para obter conhecimento a respeito da expressão gênica em vias de metabólitos importantes para o lúpulo e para os programas de melhoramento (OKADA.; ITO., 2001; CASTRO *et al.*, 2008).

Diante desse cenário, a regulação da expressão gênica em organismos eucariotos e procariotos ganhou força e a importância dos pequenos RNAs não codificantes, que são compostos por diferentes classes, foi evidenciada (SHIMONI *et al.*, 2007; ZHANG., 2009). Esses pequenos RNAs estão ligados a diversos acontecimentos em plantas, como o desenvolvimento do organismo, reprodução, defesa do organismo contra patógenos e regulação epigenética, eventos esses que variam quanto a relevância entre as espécies (BORGES; MARTIENSSEN., 2015).

Esses microRNAs possuem entre 21 a 24 nucleotídeos, e são divididos em grandes classes: microRNAs (miRNA), os pequenos RNAs interferentes derivados de grampos (hp-siRNAs), os pequenos RNAs interferentes antisensos naturais (natsiRNA) e os pequenos RNAs interferentes secundários e heterocromáticos (hetsiRNAs). Todos eles são modificados na extremidade 3' por uma metilação do tipo 2'-O- em plantas, que é essencial para a estabilidade e proteção contra uridilação 3' e degradação, e participam do silenciamento gênico pós transcricional via repressão transcricional ou clivagem do transcrito (BORGES; MARTIENSSEN., 2015).

As moléculas de pequenos RNAs são oriundas do processamento de precursores de RNA maiores que apresentam estruturas em formas de alças dobráveis que são transcritas de *locus* endógenos no organismo ou de estruturas de RNA dupla fita produzidas pela ação de transcrição proveniente das RNA polimerases dependentes de RNA (PARENT.; ALBA.; VAUCHERET., 2012). Essas moléculas constituem parte do transcriptoma vegetal e são comumente ligadas a respostas contra infecção viral e ao contato com RNAs de dupla fita (AXTELL., 2013).

Os microRNAs fazem parte de uma das classes mais importantes entre os pequenos RNAs não codificantes. Eles podem variar de 20 a 24 nucleotídeos, não são codificantes e participam de diversos processos regulatórios pré e pós transcricionais, e

a maioria é codificado por regiões intergênicas (WU., 2013). Os genes codificantes dessas moléculas são transcritos pela RNA polimerase II em estruturas conhecidas como miRNAs primários (pri-miRNAs) as quais são estabilizadas por uma proteína de ligação ao RNA denominada de DAWDLE (DDL) a qual interage com a DCL1 uma enzima pertencente à família das RNAases do tipo III que processa o pri-miRNA que contém o stem-loop em um duplex miRNA/miRNA* (Figura 2) (YU et al., 2008; YU.; JIA.; CHEN., 2017).

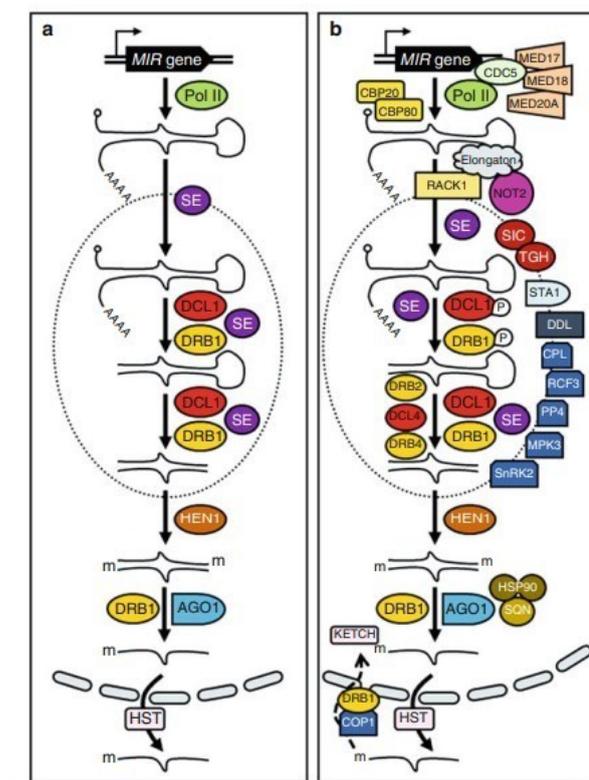


Figura 2: Mecanismo de biossíntese dos miRNAs em plantas

Fonte: PEGLER *et al.*, 2019

Esse processamento ocorre com o auxílio de proteínas acessórias, sendo as principais a proteína de ligação ao RNA dupla fita Hyponastic leaves (HLY1/DRB1) e a proteína dedo de zinco Serrate (SE), as quais auxiliam a proteína DCL1, formando uma estrutura conhecida como corpo Dicer, sendo que outras proteínas dicer podem ser envolvidas na biogênese dos microRNAs (WANG.; MEI.; REN., 2019). O duplex maduro miRNA/miRNA* formado pela clivagem da proteína dicer apresenta pontas 3' em cada extremidade que são metiladas pela enzima metiltransferase HUA ENHACER (HEN1). Essa metilação protege a molécula de miRNA contra ação enzimática que tem

como alvo a hidroxila em 3' protegendo contra a uridilação e degradação (LI.; XU.; LI., 2018; YU *et al.*, 2010).

O transporte do duplex do núcleo para o citoplasma é feito pela proteína HASTY1 (HST) que é capaz de se ligar a essa estrutura e realizar o transporte, função análoga a proteína animal exportina – 5 (LI.; XU.; LI., 2018; CAMBIAGNO *et al.*, 2021). No citoplasma o processamento continua com a seleção da fita guia por parte do complexo RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA) que contém a proteína Argonauta como elemento central a qual processa essa fita guia miRNA do duplex, ao passo que a outra fita miRNA* será degradada. Dentre várias proteínas Argonautas presentes a mais importante nesse mecanismo de processamento é a Argonauta 1 (AGO1) (ZHANG.; LIU.; YU., 2015).

Apesar da proteína argonauta 1 ser a mais importante componente do complexo RISC ela necessita da interação com outras proteínas, como a de choque térmico 90 (HSP90) e a Squint (SQN) que permite a ação correta da argonauta no processamento das fitas do duplex. Essa família de proteínas Argonautas é conhecida por apresentar dois domínios o PAZ e PIWI, o qual apresenta atividade de endonuclease, e geralmente o nucleotídeo presente na extremidade 5' do microRNA maduro e é a característica que vai direcionar a fita guia para a argonauta. Como a maioria dos microRNAs apresentam uma uridina nessa posição eles são processados pela AGO1, entretanto existem outros que não apresentam esses nucleotídeos e por isso são processados por outras Argonautas. (ROGERS.; CHEN., 2013).

A biogênese de microRNAs em plantas conta com diversas proteínas que desempenham funções acessórias. Várias proteínas já foram identificadas, como as de ligação a cap 20 e 80 (CBP 20 e CBP80), proteína de ancoragem receptor da C quinase 1 ativada (RACK1), proteína importina beta carioferina (KETCH1), responsável pelo transporte da HLY1 citoplasmática, outras proteínas de ligação ao RNA dupla fita como DRB2, DRB3, DRB4 e DRB5 que já tem funções relatadas na via de produção de microRNAs em *Arabidopsis*, dentre muitas outras (PEGLER *et al.*, 2019).

Estudos anteriores já identificaram microRNAs no lúpulo. Baseado na homologia dos marcadores de sequência expressa, Mishra e colaboradores (2015) encontraram 22 microRNAs peretencentes a 17 famílias com um total de 47 possíveis alvos. Em um novo trabalho, os mesmos pesquisadores identificaram microRNAs em lúpulo em resposta a infecção do viróide de quebra de casca cítrica (CBCVd), encontrando 67 microRNAs conservados e 49 microRNAs inéditos, sendo que 36

conservados e 37 novos foram expressos diferencialmente em resposta a infecção, foram preditos 311 potenciais alvos para essas moléculas conservadas e novas (MISHRA *et al.*, 2016).

Diante do exposto, as proteínas da via de síntese dos sRNAs tem função vital para a biogênese dessas moléculas e dos microRNAs e esses, por sua vez, apresentam importância em diversos processos já descritos em plantas. Logo, a conservação da estrutura dessas proteínas bem como desses microRNAs deve ser investigada afim de entender melhor os processos no lúpulo e possibilitar o desenvolvimento de aplicações com base nas proteínas e nas moléculas de microRNAs.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 143-152, abr. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- ALMAGUER, C. et al. Humulus lupulus—a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
<https://doi.org/10.1002/jib.160>
- ALMAGUER, C. et al. Comparative Study of the Contribution of Hop (Humulus Lupulus L.) Hard Resins Extracted from Different Hop Varieties to Beer Quality Parameters. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 115-123, abr. 2015.
<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0327-01>
- AXTELL, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 137-159, 2013.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- BORGES, F; MARTIENSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 16, n. 12, p. 727-741, 2015.
<https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- BOUCQUET, L. et al. Humulus lupulus L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 1047-1090, 31 jul. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>

CAMBIAGNO, D. et al. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. **Molecular Plant**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 426-439, mar. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.019>

CASTRO, C. B. et al. DNA Sequence and Expression Variation of Hop (*Humulus lupulus*) Valerophenone Synthase (VPS), a Key Gene in Bitter Acid Biosynthesis. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 102, n. 2, p. 265-273, 2 jun. 2008.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcn089>

ČERENAK, A. et al. New male specific markers for hop and application in breeding program. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50400-z>

CUTRIM, C.S.; CORTEZ, M. A. S. A review on polyphenols: classification, beneficial effects and their application in dairy products. **International Journal Of Dairy Technology**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 564-578, 3 maio 2018.

<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>

DOSTÁLEK, P.; KARABÍN, M.; JELÍNEK, L. Hop Phytochemicals and Their Potential Role in Metabolic Syndrome Prevention and Therapy. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 1761-1771, 19 out. 2017.

<https://doi.org/10.3390/molecules22101761>

DRESEL, M.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T. Sensomics Analysis of Key Bitter Compounds in the Hard Resin of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Their Contribution to the Bitter Profile of Pilsner-Type Beer. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 13, p. 3402-3418, 27 mar. 2015.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00239>

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.

<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

ELROD, S. M. et al. Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 134-139, 3 abr. 2019.

<https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1587701>

FERREIRA, R. H. et al. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 171-191, dez. 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1413-99362011000400011>

FLAJŠMAN, M.; RADIŠEK, S.; JAVORNIK, B. Pathogenicity assay of *Verticillium nonalfalfae* on hop plants. **Bio-protocol**, v. 7, n. 6, 2017.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2171>

GARGANI, E. et al. A survey on pests and diseases of Italian Hop crops. **Italus Hortus**, v. 24, n. 2, p. 1-17, 2017.

<https://doi.org/10.26353/j.itahort/2017.2.117>

GENT, D. H. et al. Field guide for integrated pest management in hops. **Oregon State University, University of Idaho, USDA Agricultural Research Service, Washington State University, USA**, 2009.

GILL, H. K.; GARG, H. Pesticide: environmental impacts and management strategies. **Pesticides-toxic aspects**, v. 8, p. 187, 2014.

GONSAGA, R. F. et al. First report of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, infecting hops, *Humulus lupulus*, in São Paulo, Brazil. **Journal Of Nematology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 1-4, 1 jan. 2021.

<https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-008>

HILL, S. T. et al. HopBase: a unified resource for *Humulus* genomics. **Database**, v. 2017, 2017.

<https://doi.org/10.1093/database/bax009>

HOWARD, E. L. et al. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). **Theoretical And Applied Genetics**, [S.L.], v. 122, n. 7, p. 1265-1280, 18 jan. 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00122-011-1529-4>

HUDSON, J. R.; STEVENS, R.; WHITEAR, A. L. Hop resins and beer flavour. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 431-438, 10 set. 1962.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1962.tb01886.x>

INTERNATIONAL HOP GROWERS' CONVENTION. **Economic commission-Summary Reports**. Disponível em <hmeljgiz.si/ihgc/doc/2019%20APR%20IHGC%20EC%20Report_Final.pdf> Acesso em: 8 set.2020.

JASKULA-GOIRIS, B. et al. The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, maio 2014.

<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0616-01>

JIN, J. J. et al. Born migrators: Historical biogeography of the cosmopolitan family Cannabaceae. **Journal of systematics and evolution**, v. 58, n. 4, p. 461-473, 2020.

<https://doi.org/10.1111/jse.12552>

KARABÍN, M. et al. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 542-567, 1 mar. 2016.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 108-112, fev. 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>

KOELLING, J. et al. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. **Molecular Breeding**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 479-484, 17 set. 2011.

<https://doi.org/10.1007/s11032-011-9637-z>

KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. Hop (*Humulus lupulus* L.): traditional and present use, and future potential. **Economic Botany**, [S.L.], v. 75, n. 3-4, p. 302-322, 24 set. 2021.

<https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>

KROFTA, K.; MIKYŁKA, A.; HAŁKOVÁ, D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00321.x>

LI, Z.; XU, R.; LI, N. MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication?. **Nutrition & metabolism**, v. 15, n. 1, p. 1-21, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s12986-018-0305-8>

LIU, M. et al. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 754-779, 7 jan. 2015.

<https://doi.org/10.3390/molecules20010754>

LORENZANA, A. et al. Population dynamics and integrated control of the damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Schrank) on hops in Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 2, p. 505-517, 2013.

<https://doi.org/10.5424/sjar/2013112-2968>

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. A economia e o território do lúpulo: A história, análise mercadológica e o desenvolvimento do lúpulo no Brasil e no mundo. **Revista Latino-Americana de Cerveja**, Brasília/DF, 2017.

MCCALLUM, J. L. et al. Phytochemical Characterization of Wild Hops (*Humulus lupulus* ssp. *lupuloides*) Germplasm Resources From the Maritimes Region of Canada. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 10, dez. 2019.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01438>

MCPARTLAND, J. M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. **Cannabis And Cannabinoid Research**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 203-212, out. 2018.

<https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>

MICHAEL J. L.; TOM W. Y. **Brewing**. 2.ed. Nova York: Editora Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

MISHRA, A. K. et al. Computational exploration of microRNAs from expressed sequence tags of *Humulus lupulus*, target predictions and expression analysis. **Computational Biology And Chemistry**, [S.L.], v. 59, p. 131-141, dez. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.09.005>

MISHRA, A. K. et al. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3271-4>

MOIR, M. Hops—A Millennium Review. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 131-146, set. 2000.
<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0131>

MURAKAMI, A. et al. Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. **Heredity**, v. 97, n. 1, p. 66-74, 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>

NATSUME, S. et al. The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. **Plant And Cell Physiology**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 428-441, 20 nov. 2014.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcu169>

OEC. **Hops (Hs:1210) Product Trade, Exporters and Importers**. Disponível em <<https://oec.world/en/profile/hs92/21210>> Acesso em: 8 set.2020.

OJHA, K. et al. A review on different methods of determination of antioxidant activity assay of herbal plants. **Research Journal Of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutic And Chemical Sciences**, Bilaspur, v. 6, n. 4, p. 707-730, nov. 2018

OKADA, Y.; ITO, K. Cloning and Analysis of Valerophenone Synthase Gene Expressed Specifically in Lupulin Gland of Hop (*Humulus lupulus* L.). **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 150-155, jan. 2001.
<https://doi.org/10.1271/bbb.65.150>

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**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 36-44, mar. 2015.
https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165

PARENT, J. S.; MARTINEZ DE ALBA, A. E.; VAUCHERET, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 179, 2012.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00179>

PEGLER, J. L.; GROF, C. P.L; EAMENS, A. L. The plant microRNA pathway: The production and action stages. **Plant MicroRNAs**, p. 15-39, 2019.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_2

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1-5, set. 2017.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin e. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, maio 1999.

<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. **The Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2383-2399, 2013.

<https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops a review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 96-107, 4 mar. 1981.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x>

SHIMONI, Y et al. Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view **Molecular systems biology**, v. 3, n. 1, p. 138, 2007.

<https://doi.org/10.1038/msb4100181>

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 902-906, dez. 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400021>

SINGH, S.; MANI, A.; CHATURVEDI, A. Mining and gene ontology based annotation of SSR markers from expressed sequence tags of *Humulus lupulus*. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 114-122, 3 fev. 2012.

<https://doi.org/10.6026/97320630008114>

SPÓSITO, M. B. et al. A cultura do lúpulo. Piracicaba, SP: **Esalq-Divisão de Biblioteca**, 2019.

STATISTA. **Distribution share of hop production volume worldwide in 2019**, by leading country. Disponível em < [statista.com/statistics/757917/share-of-hop-production-worldwide-by-major-producer/](https://www.statista.com/statistics/757917/share-of-hop-production-worldwide-by-major-producer/) > Acesso em: 7 set. 2020

STEENACKERS, B.; COOMAN, L.; VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 172, p. 742-756, abr. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>

STEVENS, R. The Chemistry of Hop Constituents. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 19-71, 1 fev. 1967.

<https://doi.org/10.1021/cr60245a002>

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TANIGUCHI, Y. et al. 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**, [S.L.], v. 62, n. 47, p. 11602-11612, 12 nov. 2014.

<https://doi.org/10.1021/jf504394h>

TADAPANENI, Ravi Kiran. Effect of High Pressure Processing & Dairy on the Antioxidant Activity of Strawberry Based Beverages. 2010. **Tese de Doutorado**. Illinois Institute of Technology.

TEGHTMEYER, S. Hops. **Journal Of Agricultural & Food Information**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 9-20, 2 jan. 2018.
<https://doi.org/10.1080/10496505.2018.1403248>

TRIDGE. **Hop global export and top exporting countries**. Disponível em <<https://www.tridge.com/intelligences/hop/export>> Acesso em: 8 set.2020.

YU, B. et al. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 10073-10078, 2008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804218105>

YU, B. et al. SiRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 38, n. 17, p. 5844-5850, 6 maio 2010.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq348>

YU, Y.; JIA, T.; CHEN, X. The 'how' and 'where' of plant micro RNA s. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1002-1017, 2017.
<https://doi.org/10.1111/nph.14834>

WALKER, T K; ZAKORMONY, M.; BLAKEBROUGH. "Delta resin", a water-soluble, bitter, bacteriostatic portion of the resins of hops. **Journal Of The Institute Of Brewing, Manchester**, v. 58, p. 439-442, dez. 1952.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1952.tb06194.x>

WANG, J.; MEI, J.; REN, G. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 360, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>

WATSON, T. T. et al. Plant-parasitic nematodes associated with the root zone of hop cultivars planted in a Florida field soil. **Journal Of Nematology**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-10, 1 jan. 2020.
<https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-040>

WU, G. Plant microRNAs and development. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 5, p. 217-230, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.04.002>

ZHANG, C. Novel functions for small RNA molecules. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 641, 2009.

ZHANG, S.; LIU, Y.; YU, B. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 6, n. 5, p. 533-545, 2015.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1292>

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DO TEOR DE
COMPOSTOS FENÓLICOS EM 3 VARIEDADES DE LÚPULOS
COMERCIAIS DE AROMA E 3 DE AMARGOR**

RESUMO

O lúpulo é uma planta pertencente à família *Cannabaceae* do gênero *Humulus*. Possui fitoquímicos como resinas, óleos essenciais e compostos fenólicos presentes em sua composição que podem auxiliar no controle do estresse oxidativo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de 3 variedades de lúpulo de aroma (East Kent Golding, Sladek e Cascade) e 3 de amargor (Galena, Sorachi Ace e Columbus Zeus), por meio das metodologias DPPH, ABTS, redução do complexo fosfomolibdênio e poder redutor, e os compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu. Os extratos foram preparados com 0,2g de lúpulo peletizado e 100 mL de água sob fervura por 60 minutos para as variedades de amargor e 5 minutos para as de aroma. As análises estatísticas foram feitas sob delineamento inteiramente casualizado por teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os resultados por DPPH e ABTS demonstraram maior atividade antioxidante de East Kent, Galena e Cascade sob as demais variedades, o ensaio de fosfomolibdênio revelou maiores atividades antioxidantes expressas por East Kent, Cascade e Sorachi, já o poder redutor revelou maior atividade antioxidante das variedades East Kent, Sorachi e Galena. Columbus e Sladek exibiram menor atividade antioxidante do que as demais de acordo com a maioria dos testes. East Kent, Galena e Cascade exibiram os maiores valores de fenólicos totais. A equivalência com o padrão BHT ranqueou a atividade antioxidante na ordem do maior para o menor, as variedades East Kent, Galena, Cascade, Sorachi, Columbus e Sladek. Não foi possível relacionar o tipo de variedade com a atividade antioxidante, logo ela parece não depender do tipo da variedade.

Palavras-chave: *Humulus lupulus*, óleos essenciais, compostos fenólicos, fitoquímica, antioxidantes, alfa ácidos

ABSTRACT

Hops is a plant belonging to the Cannabaceae family of the genus *Humulus*. It has phytochemicals such as resins, essential oils and phenolic compounds present in its composition that can help in the control of oxidative stress. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of 3 aroma hop varieties (East Kent Golding, Sladek and Cascade) and 3 bitter hop varieties (Galena, Sorachi Ace and Columbus Zeus), using the DPPH, ABTS, reduction of the phosphomolybdenum complex and reducing power, and the phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method. The extracts were prepared with 0.2g of pelleted hops and 100 mL of boiling water for 60 minutes for the bitter varieties and 5 minutes for the aroma varieties. Statistical analyzes were performed in a completely randomized design using the Scott-Knott test at 5% probability. The results by DPPH and ABTS showed greater antioxidant activity of East Kent, Galena and Cascade under the other varieties, the phosphomolybdenum assay revealed greater antioxidant activities expressed by East Kent, Cascade and Sorachi, while the reducing power revealed greater antioxidant activity of the East Kent, Sorachi and Galena varieties. Columbus and Sladek exhibited lower antioxidant activity than the others in most tests. East Kent, Galena and Cascade exhibited the highest values of total phenolics. The equivalence with the BHT standard ranked the antioxidant activity in order from the highest to the lowest, the East Kent, Galena, Cascade, Sorachi, Columbus and Sladek varieties. It was not possible to relate the type of variety with the antioxidant activity, so it does not seem to depend on the type of the variety.

Keywords: *Humulus lupulus*, essential oils, phenolic compounds, phytochemistry, antioxidants, alpha acids

1 INTRODUÇÃO

O lúpulo é uma planta perene e dioica que cresce em forma de trepadeira. Essa planta faz parte da família *Cannabaceae* que contém três espécies marcantes de lúpulo que são: *H. lupulus*, *H. yunnanensis* e *H. japonicus*. Dentre elas destacam-se a primeira e a terceira com relevância de produção para a indústria cervejeira, visto que aproximadamente 97% do lúpulo produzido mundialmente é destinado para a produção de cerveja, embora ele apresente propriedades terapêuticas interessantes (DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019). O interesse da indústria no lúpulo se dá pela presença de fitoquímicos que conferem características muito importantes para a cerveja, com destaque para as resinas, óleos essenciais e compostos fenólicos (ALMAGUER *et al.*, 2014; SHARPE, LAWS, 1981; GORIS *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo, o qual é marcado por um desequilíbrio entre defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas, possibilita que esses radicais danifiquem estruturas de biomoléculas, condição bastante estudada e ligada a inúmeros distúrbios humanos (PIZZINO *et al.*, 2017). O lúpulo pode contribuir significativamente no combate ao estresse oxidativo, visto que ele é fonte de antioxidantes exógenos como os compostos fenólicos, o xantohumol e os óleos essenciais que já exibiram atividade antioxidante em diversos trabalhos descritos na literatura (KROFTA, MIKYSKA, HASKOVÁ, 2008; LIU *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2016).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi determinar o teor de compostos fenólicos totais pelo método da redução do radical Folin Ciocalteu, bem como avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos provenientes de 3 variedades comerciais de lúpulos de aroma e 3 de amargor, por meio de mecanismos reacionais diferentes provenientes dos métodos de avaliação afim de verificar possíveis diferenças significativas entre os tipos de variedades que possam ser exploradas, atribuindo a atividade antioxidante a presença dos fitoquímicos que compõe os extratos como os compostos fenólicos, óleos essenciais e alfa-ácidos. Além disso buscou-se evidenciar se os óleos essenciais e alfa-ácidos isomerizados nos extratos aquosos podem diferenciar o potencial antioxidante das variedades.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição das amostras para a realização das análises

As 6 amostras de lúpulo foram adquiridas em mais de um estabelecimento especializado na comercialização de produtos para a fabricação de cerveja. Foram utilizadas 3 variedades de amargor (Columbus Zeus, Sorachi Ace e Galena) e 3 variedades de aroma (Cascade, East Kent Golding e Sladek). As amostras estavam na forma de *pellets*, simulando como se faz em uma linha de produção cervejeira. Tendo posse dos lúpulos peletizados realizou-se um acondicionamento no refrigerador durante a realização das análises em uma temperatura de 4°C, a fim de manter a qualidade das amostras e evitar perdas significativas dos fitoquímicos de interesse. A escolha das variedades se deu pelo critério de teor de alfa-ácidos e óleos essenciais totais.

2.2 Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos, foram pesados em balança analítica 0,2 g do lúpulo seco peletizado de todas as variedades. Após isso, em um erlenmeyer, 100 mL de água foi submetido ao processo de ebulição, por ação do bico de Bunsen. Com o início da fervura a massa de lúpulo foi adicionada e o sistema ficou em ebulição por 60 minutos para as variedades de amargor e 5 minutos para os lúpulos de aroma, reproduzindo as condições utilizadas na produção da cerveja industrial. Em seguida, cada extrato foi armazenado no ultra freezer a -80 °C até o início das análises químicas.

2.3 Análise dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

2.3.1 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH*

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz *et al.* (2008), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL⁻¹. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição dos extratos de lúpulo 1000; 500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Para a comparação das atividades, o padrão BHT (hidroxitolueno butilado) foi avaliado nas concentrações 1000; 500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Gehaka UV-340G)

no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg⁻¹).

2.3.2 Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS^{•+}.

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes et al. (2010). Para o ensaio foram misturados 10 µL dos extratos de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹) e 990 µL da solução do radical ABTS^{•+}. A absorbância foi monitorada por leitura em espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) a 735 nm, durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS^{•+} foi utilizada como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} (AA%) pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo

A_{Am} = Absorbância da amostra

Os valores de atividade antioxidante dos extratos foram comparados com o padrão BHT nas concentrações 1000; 500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹. Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg⁻¹).

2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio foi realizado conforme PRIETO *et al.*, (1999). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionada em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução dos reagentes (ácido sulfúrico 0,6M; fosfato de sódio 28mM e molibdato de amônio 4mM). Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, realizou-se a leitura no espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) a 695 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante por meio da metodologia do Poder Redutor

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do poder redutor foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Oyaizu (1986). Cem microlitos do extrato de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram misturadas com 1 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 1 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%. Após 20 minutos de incubação a 50°C, 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura, sendo essa agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada e 600 μL de cloreto férrico 0,1% foram adicionados. As leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) no comprimento de onda de 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.5 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,50 mL dos extratos de lúpulo com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 0,2 mol L⁻¹. Posteriormente 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L⁻¹) foi

adicionado à mistura reacional. As leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm em especofotômetro (Gehaka UV-340G) após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata

2.4 Análises estatísticas

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (7 x 5), sendo (6 extratos do lúpulo e o antioxidante padrão BHT) e 5 concentrações (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 3 repetições. Já para o teor de fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 6 tipos de extratos (3 repetições). O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

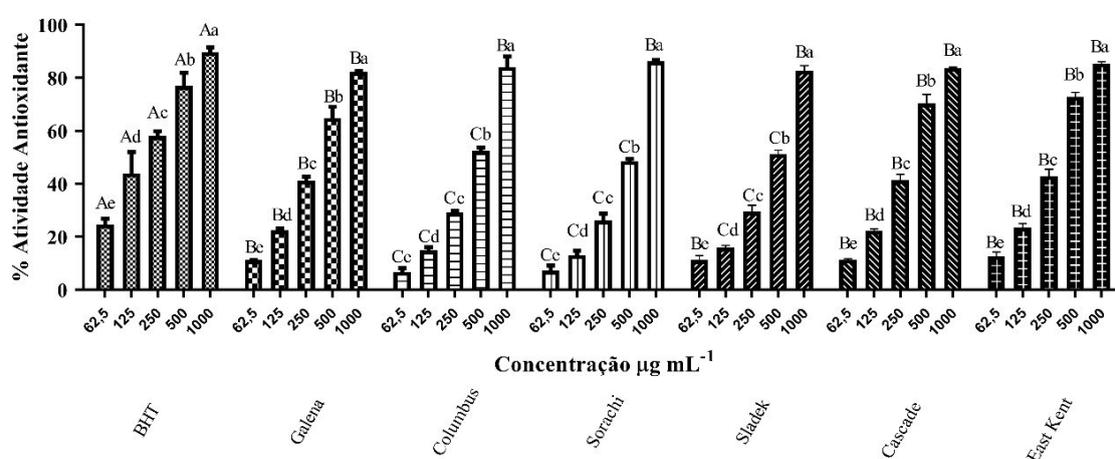
Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem antioxidante e absorvância em relação às concentrações analisadas para os testes DPPH, ABTS, Complexo Fosfomolibdênio e Poder Redutor, respectivamente. Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de equivalentes ao ácido gálico, expressos em miligramas de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade Antioxidante medida por método DPPH

Os valores de atividade antioxidante observados por meio do método DPPH referentes ao padrão e as amostras das 6 variedades de lúpulo estão dispostos no Material suplementar 1 que reflete o gráfico exposto na Figura 1.

Figura 1 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão BHT pelo método DPPH. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



O maior valor foi obtido pela variedade Sorachi (86,17%) na concentração de 1000 µg mL⁻¹, enquanto que o menor valor foi apresentado pela variedade Columbus (6,81%) na concentração de 62,5 µg mL⁻¹. Os demais resultados de atividade antioxidante foram bastante variados dentro das faixas de concentração e entre as variedades e o padrão.

Foi possível observar que houve diferenças significativas na porcentagem de atividade antioxidante entre as variedades e entre as diferentes faixas de concentração de uma mesma variedade. Diante disso, nenhum extrato aquoso foi capaz de exibir uma atividade antioxidante superior ao padrão BHT, analisando na mesma faixa de concentração. Este foi superior a todas as amostras independente se a variedade do lúpulo foi de amargor ou de aroma. As variedades Galena, Cascade e East Kent foram ligeiramente superiores às variedades Columbus e Sorachi na faixa de concentração 62,5 a 500 µg mL⁻¹. Entretanto, na concentração de 1000 µg mL⁻¹ nenhuma das amostras exibiu diferenças estatisticamente significativas (valor de $p \geq 0,05$).

Quando analisadas as faixas de concentração dentro de cada extrato e do padrão Observou-se que o aumento da concentração acarretou um aumento na atividade antioxidante, tanto no padrão BHT quanto nas variedades de amargor e aroma. Logo as porcentagens de atividade antioxidante proporcionados pelos extratos aquosos das amostras e do padrão são significativamente menores (valor de $p \geq 0,05$) na menor faixa de concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do que na faixa de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, mantendo essa situação até a faixa de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Krofta e colaboradores (2008) mediram a atividade antioxidante dos extratos de diversas variedades de lúpulo comercializadas em todo o mundo ao longo dos anos de 2005 a 2006. Os autores evidenciaram que os maiores valores de atividade antioxidante, entre 70 a 80%, foram obtidos das variedades Saaz e Spalter Select, as quais são classificadas como variedades de aroma (Hopslit., 2018). As demais variedades exibiram valores de atividade antioxidante que variaram entre 40 a 60%. Esses resultados, quando comparados aos do presente trabalho para as variedades analisadas, corroboram com a hipótese de que o potencial antioxidante não está ligado ao tipo de variedade, visto que, apesar dos dois valores de atividade antioxidante mais expressivos serem provenientes de 2 variedades de aroma, houve outras de amargor que superaram variedades de aroma.

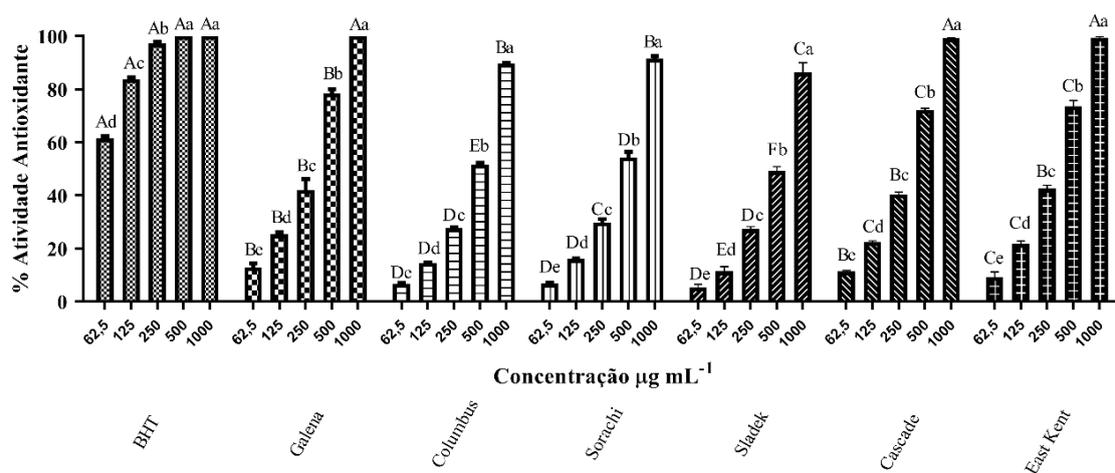
3.2 Atividade Antioxidante medida por método ABTS

Os valores de atividade antioxidante medidos por ABTS nas diferentes concentrações e variedades estão representados pelo Material suplementar 2, que reflete o gráfico exposto na Figura 2. Foi possível alcançar 100% de atividade antioxidante no padrão a partir da concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, e nas amostras, esse valor foi observado na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a variedade Galena.

Além disso, valores mais expressivos de atividade antioxidante nessa mesma concentração apareceram para as variedades Cascade e East Kent, 99,21% e 99,47% respectivamente, a ponto de não serem diferentes estatisticamente ao padrão BHT (valor de $p \geq 0,05$). Os menores valores de atividade antioxidante foram observados para as variedades Columbus (6.7%), Sorachi (6,76%) e Sladek (5.4%) na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar disso, Columbus e Sorachi exibiram valores bastante expressivos na

concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os quais foram menores apenas das variedades citadas anteriormente.

Figura 2 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método ABTS. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Foi possível perceber diferenças estatisticamente significantes (valor de $p \geq 0,05$) entre as variedades em todas as concentrações, com destaque para a variedade Galena, sendo superior em quase todas as concentrações. Em contrapartida a variedade Sladek exibiu valores significativamente inferiores em quase todas as concentrações utilizadas. Apesar das diferenças encontradas na metodologia ABTS terem sido mais significativas do que no DPPH, nenhuma das variedades conseguiu superar o padrão BHT. Analisando as porcentagens de atividade antioxidante de cada amostra referente ao aumento da concentração o que se observou foram diferenças significativas no aumento do potencial antioxidante à medida que a concentração aumenta, cenário esse presente em todas as variedades e no padrão até a concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

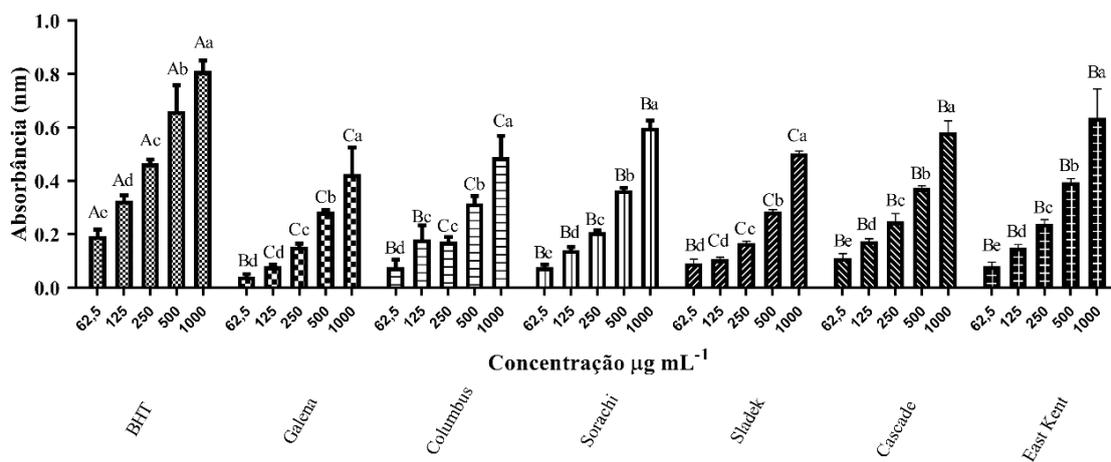
Resultados obtidos por Kowalczyk e colaboradores (2013) indicam menor atividade antioxidante do extrato aquoso em comparação com extratos metanólicos e etanólicos. Trabalhando com lúpulos peletizados T45 e T90 e com as variedades Magnum de amargor e Marynka considerada mista, os autores conseguiram valores de

EC50 (Metade da concentração efetiva máxima) significativamente maiores nos extratos aquosos do que naqueles feitos com 50% etanol e 50% metanol. Isso indica que o extrato aquoso de fato tem menor poder antioxidante medido por ABTS. A superioridade do extrato metanólico pode ser devido a uma melhor extração de compostos fenólicos e não extração de outros produtos do metabolismo dos lúpulos como alfa ácidos e óleos essenciais que diferem as variedades do nosso trabalho (SZWAJGIER, TARGOŃSKI., 2000).

3.3 Atividade antioxidante medida por redução do complexo fosfomolibdênio

Os valores de atividade antioxidante podem ser visualizados no Material suplementar 3 e o gráfico que os representa está disposto na Figura 3. O menor valor de absorbância foi exibido pela variedade Galena (0,04) na concentração de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar disso, não houve diferenças significativas (valor de $p \geq 0,05$) com os demais valores das variedades nessa mesma concentração, apenas o padrão BHT apresentou um valor significativamente superior a todos os extratos. Os maiores valores de absorbância foram observados para as variedades East Kent (0,64), Cascade (0,58) e Sorachi (0,60) e todos eles na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As demais variedades Galenas, Columbus e Sladek revelaram valores de absorbância nessa mesma concentração sem diferença significativa entre elas, entretanto com diferenças significantes em relação às demais variedades e ao BHT.

Figura 3 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método redução do complexo fosfomolibdênio. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Para as demais concentrações de 125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi possível perceber novamente uma superioridade das variedades Sorachi, Cascade e East Kent em relação às demais. Apenas o extrato da variedade Columbus na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi capaz de exibir um valor de absorvância (0,18) sem diferença estatística com os extratos das variedades previamente citadas. Novamente nenhuma variedade conseguiu superar ou igualar os valores do padrão BHT em nenhuma concentração utilizada no trabalho.

Ao analisar o comportamento da absorvância em relação ao aumento na concentração, dentro de cada variedade e do padrão, foi possível perceber uma tendência de aumento, na maioria das vezes significativa, de maneira semelhante com os métodos anteriores. Esse cenário ocorreu para o padrão e para todas as variedades, com exceção da Columbus na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de absorvância podem ser utilizados para medir a atividade antioxidante, visto que a redução do complexo fosfomolibdênio é dependente da ação dos antioxidantes para a formação do cromógeno verde, logo quanto maior a atividade antioxidante do extrato maior será a absorvância apresentada por ele (PINEDA, AGUILAR., 1999).

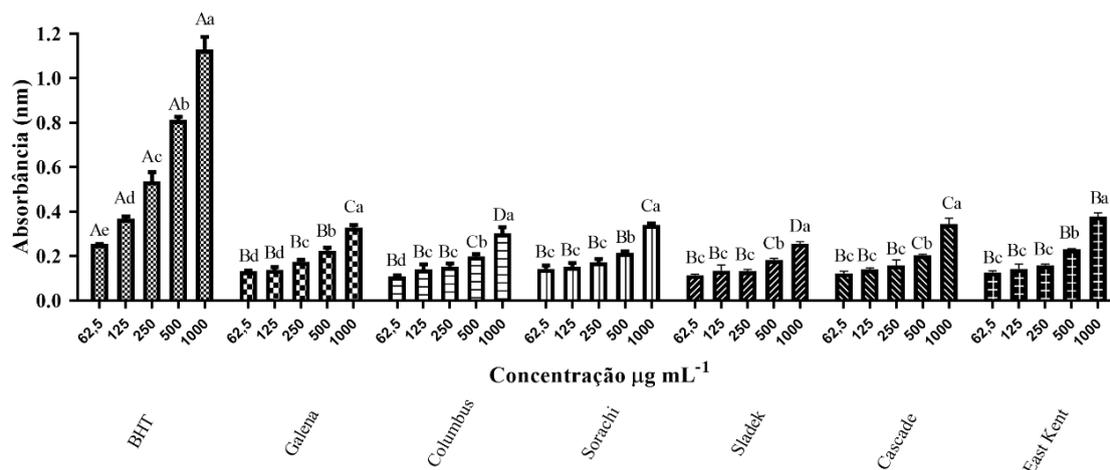
George e colaboradores (2014) testaram a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos (50% de álcool etílico) de cones de lúpulos por redução do complexo fosfomolibdênio, em concentrações de 1, 0,1, 0,001 e 0,0001 mg mL^{-1} . Seus resultados evidenciaram atividade antioxidante relevante na concentração de 1 mg mL^{-1} com valor de equivalência do ácido ascórbico de 0,628 mg . Próximo aos resultados do presente trabalho no qual a atividade antioxidante foi maior nas concentrações mais altas e

diminuiu consideravelmente nas concentrações mais baixas (GEORGE *et al.*, 2014). Além disso, Vergun e colaboradores (2021) realizaram a mesma metodologia em folhas, flores e caules de lúpulos e evidenciaram maior potencial antioxidante nas flores do vegetal, além de forte correlação do poder redutor do complexo com o teor total de polifenóis encontrados no trabalho (VERGUN *et al.*, 2021).

3.4 Atividade Antioxidante avaliada pela metodologia do poder redutor

Os valores de absorvância referentes aos extratos e o padrão obtidos pela metodologia do poder redutor estão dispostos no Material Suplementar 4 e o gráfico que os representa está exibido na Figura 4. O maior valor de absorvância encontrado foi 0,38 na variedade East Kent na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido pelos valores de 0,34; 0,34; 0,33; 0,30 e 0,25 encontrados nas variedades Cascade, Sorachi, Galena, Columbus e Sladek respectivamente, nessa mesma concentração. Esses resultados revelaram um valor significativamente maior da variedade East Kent em relação às demais. As variedades Cascade, Sorachi e Galena não apresentaram diferenças significantes entre si em nenhuma das concentrações trabalhadas (valor de $p \geq 0,05$). As demais variedades Columbus e Sladek não foram diferentes estatisticamente entre si em nenhuma das concentrações, entretanto foram inferiores às demais nas concentrações de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método poder redutor. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



O padrão BHT gerou valores de absorvância significativamente superiores a todos os extratos em todas as concentrações testadas no trabalho, logo o antioxidante sintético exibe maior atividade antioxidante também pela metodologia do poder redutor. Ao comparar as concentrações e a absorvância de cada variedade e do padrão, de maneira individual, revelou-se uma tendência clara de aumento da absorvância em resposta ao aumento na concentração no padrão, onde todas as concentrações maiores foram significativamente superiores às menores (valor de $p \geq 0,05$).

Entretanto, nas variedades, esse aumento foi menor e nem sempre resultou em superioridade da concentração maior sob a menor, como evidenciado nas variedades Galena (62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Columbus (62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Sorachi (62,5, 125 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Sladdek (62,5, 125 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Cascade (62,5, 125 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e East Kent (62,5, 125 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A metodologia do poder redutor tem a capacidade de avaliar o potencial antioxidante por meio da redução do sistema, ocasionada pelo potencial dos antioxidantes do analito, sendo assim quanto maior a absorvância obtida maior será a atividade antioxidante da amostra ou do padrão (ALAM, BRISTI, RAFIQUZZMAN., 2013).

Niknejad e colaboradores também utilizaram a metodologia do poder redutor em seu trabalho com extrato etanólico 50% de flores de lúpulo. Trabalhando com as concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os autores conseguiram evidenciar comportamento semelhante aos resultados deste trabalho com valores de absorvância a 700 nm bastante semelhante, alcançando 0,377 de absorvância na concentração de 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com pequenos aumentos nas concentrações superiores. O padrão BHT de maneira análoga aos encontrados neste trabalho foi significativamente superior ao

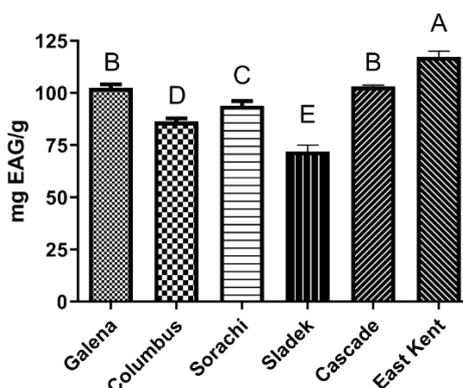
extrato, exibindo aumentos na absorbância em resposta à concentração. Esses resultados evidenciaram a capacidade do extrato de lúpulo em doar elétrons para a redução do complexo Fe^{3+} ferrocianeto para Fe^{2+} , logo os resultados desse trabalho também indicam essa propriedade no extrato aquoso de variedades de amargor e de aroma (NIKNEJAD et al., 2015).

3.5 Compostos Fenólicos Totais

O total de compostos fenólicos presentes nos extratos de cada uma das variedades pode ser observado no Material Suplementar 5 e o gráfico que os representa está disposto na Figura 5. Os maiores valores de fenólicos totais encontrados foram 117,34; 103,03; e 102,44 mg EAGg⁻¹ referentes às variedades East Kent, Cascade e Galena, respectivamente, e dessas variedades, a East Kent foi significativamente superior às demais, com Cascade e Galena em segundo lugar sem diferença significativa entre elas.

As demais variedades exibiram valores de fenólicos totais inferiores com 93,81; 86,26 e 71,95 mg EAGg⁻¹, representando as variedades Sorachi, Columbus e Sladek. Dentre esses menores, todos esses foram diferentes significativamente, e entre eles, Sorachi foi maior que Columbus, que foi maior que Sladek. Portanto, duas variedades de aroma e uma de amargor (East Kent, Cascade e Galena) exibiram maior quantidade de fenólicos totais, enquanto duas de amargor e uma de aroma (Sorachi, Columbus e Sladek) apresentaram os menores valores de fenólicos totais.

Figura 5 – Teor de compostos fenólicos totais utilizando seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade, East Kent). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Almeida e colaboradores (2019), trabalhando com extratos etanólicos, evidenciaram resultados que indicam a forte participação desses compostos fenólicos do lúpulo na capacidade antioxidante do extrato. Diversos compostos fenólicos encontrados nos extratos da variedade Cascade podem ter contribuído, com destaque para isoquercetina e a quercetina, que foram presentes em maior concentração que os demais (ALMEIDA *et al.*, 2019). No presente trabalho a variedade Cascade exibiu o segundo maior valor encontrado para o teste do teor dos compostos fenólicos, entretanto outros compostos encontrados no trabalho citado podem estar expressos em diferentes concentrações nos pellets, superando inclusive a quercetina e a isoquercetina.

Já para a metodologia da redução do complexo de fosmolibdênio, os compostos fenólicos parecem não ser os principais agentes determinantes, quando George e colaboradores (2014), evidenciaram que o extrato etanólico de lúpulo com quantidades menores de fenólicos exibiu maior atividade antioxidante por essa abordagem, quando comparado ao extrato etílico de mirtilo, muito mais rico em compostos fenólicos (GEORGE *et al.*, 2014).

Aaron e colaboradores (2012), trabalharam com extrato aquoso de lúpulos da variedade Galena e eluíram por cromatografia polifenóis de interesse. Foram identificados a presença de quercetina, kaempferol e catequina os primeiros encontrados em conjugados a glicosídeos e o último em formas de dímeros e trímeros. É possível que esses compostos também estejam presentes nos nossos extratos, contribuindo para o valor de compostos fenólicos encontrados nessa variedade (AARON *et al.*, 2012).

Mikyška e Jurková (2019), encontraram compostos fenólicos livres em extratos aquosos de lúpulos da variedade Sladek. Nessa variedade os fenólicos livres foram representados pelas hidroxycoumarinas seguidos de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavan-3-ols, flavonas, flavononas e flavonóis, todos esses podem estar presentes no extrato do presente trabalho da variedade Sladek e podem ter contribuído para fazer dessa variedade a detentora do menor valor de fenólicos por Folin Ciocalteu (MIKYŠKA, JURKOVÁ., 2019).

3.6 Atividade antioxidante das variedades de lúpulo expressa em equivalentes do padrão

Os valores de equivalentes de massa/massa obtidos no presente trabalho estão dispostos no Material suplementar 6. Esses valores expressam a equivalência da atividade antioxidante produzida pela massa em miligramas do padrão BHT que corresponde a massa de 1 g do material vegetal, oriundo da variedade testada. No ensaio DPPH as variedades East Kent (626,7 mg EBHT g⁻¹), Galena (593,3 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (588 mg EBHT g⁻¹) exibiram os maiores valores respectivamente sem nenhuma diferença significativa entre elas. Os menores valores foram expressos pelas variedades Sorachi (213,3 mg EBHT g⁻¹), Columbus (284,0 mg EBHT g⁻¹) e Sladek (290,7 mg EBHT g⁻¹) também sem diferenças significativas entre si. Entretanto todas as três variedades foram inferiores às demais.

Para a metodologia ABTS os maiores valores também foram expressos pelas variedades East Kent (167,7 mg EBHT g⁻¹), Galena (165,3 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (155,7 mg EBHT g⁻¹), os quais não foram significativamente diferentes entre si. Os menores valores continuaram sendo apresentados pelas variedades Sladek (92,3 mg EBHT g⁻¹), Columbus (94,0 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (104,0 mg EBHT g⁻¹) sem diferenças significantes entre si, mas significativamente inferiores às demais variedades. Valores estes coerentes com o gráfico de atividade antioxidante medida por ABTS que evidenciou a superioridade de Sladek, Galena e Cascade sob as demais.

Na metodologia da redução do complexo fosfomolibdênio os maiores valores encontrados foram exibidos pelas variedades East Kent (398,7 mg EBHT g⁻¹), Cascade (363,7 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (352,0 mg EBHT g⁻¹), com a primeira sendo significativamente superior às outras duas que não foram diferentes entre si. Os menores valores foram exibidos pelas variedades Galena (231,7 mg EBHT g⁻¹), Sladek (232,0

mg EBHT g⁻¹) e Columbus (276,8 mg EBHT g⁻¹) e dentre elas a variedade Galena foi significativamente inferior às demais que não foram diferentes entre si. A alternância da posição da capacidade antioxidante dos extratos nas diferentes metodologias indica que a complexidade dos extratos que podem conter certos componentes que participam ou não do mecanismo de reação da metodologia de avaliação da atividade antioxidante.

Os resultados obtidos pela metodologia do poder redutor expressos em equivalência indicaram superioridade do potencial antioxidante das variedades East Kent (97,2 mg EBHT g⁻¹), Galena (90,1 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (75,3 mg EBHT g⁻¹) sob as demais variedades e essas três não apresentaram diferenças significantes entre si. Já as variedades Sladek (30,5 mg EBHT g⁻¹), Columbus (53,4 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (62,0 mg EBHT g⁻¹) foram inferiores estatisticamente das outras 3 com Sladek em último lugar e Cascade e Columbus empatadas em segundo sem diferenças significantes entre si.

Todos esses resultados colocam o potencial antioxidante ranqueado da seguinte maneira East Kent > Galena > Cascade > Sorachi > Columbus > Sladek, o que não é suficiente para colocar as variedades de aroma como superiores às de amargor, reforçando a ideia de o potencial antioxidante ser individual de cada variedade e não responsivo ao tipo dela.

4 CONCLUSÃO

É notório que os fitoquímicos presentes no lúpulo podem contribuir consideravelmente para a atividade antioxidante da cerveja. Dentre as variedades e tipos de lúpulos utilizados pela indústria cervejeira existe um potencial antioxidante variável a ser explorado. Os resultados indicam que o potencial antioxidante do lúpulo não depende se a variedade é de amargor ou aroma, análises mais refinadas são necessárias para confirmar a hipótese.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 143-152, abr. 2013.
- ALMAGUER, C. et al. Comparative Study of the Contribution of Hop (*Humulus Lupulus* L.) Hard Resins Extracted from Different Hop Varieties to Beer Quality Parameters. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 115-123, abr. 2015.
- ALMEIDA, A. R. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 340-347, 16 ago. 2019. Wiley.
- ANTUNES, M.D.C. et al. Effects of posthar-vest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, p. 6173–6181, 2010.
- ARON, P. M.; TING, P. L.; SHELLHAMMER, T. H. HPLC-ESI-MS Identification of Hop-Derived Polyphenols That Contribute Antioxidant Capacity and Flavor Potential to Beer. **Acs Symposium Series**, [S.L.], p. 217-234, jan. 2012. American Chemical Society.
- D, L. L. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.
- DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; BOGUSZ, Stanislaw. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.
- GEORGE, B.; CORINA, B.; GHEORGHE, C. Antioxidant activity of *Humulus lupulus* and *Vaccinium myrtillus* individual and combined extracts. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucareste, v. 20, n. 2, p. 10277-10285, 2015.
- HOPLIST. **Hop Varieties**. Disponível em <<https://www.hopslist.com/hops/>> Acesso em: 8 set. 2020.
- JASKULA-GOIRIS, B. et al. The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, maio 2014.
- KARABÍN, M. et al. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 542-567, 1 mar. 2016.
- KOWALCZYK, D. et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], p. 103-110, jul. 2013. Wiley.
- KROFTA, K.; MIKYŁKA, A.; HAŁKOVÁ, D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008. Wiley.

LIU, M. et al. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 754-779, 7 jan. 2015.

NIKNEJAD, F. et al. Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Flower Extracts. **Advances In Environmental Biology**, [s. l], v. 24, n. 8, p. 395-401, 2015.

OYAIZU, M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. **Jpn. J. Nutr**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin e. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, maio 1999. Elsevier BV

SINGLETON, V. L. ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144-158, 1965.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops a review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 96-107, 4 mar. 1981.

SZWAJGIER, D.; TARGOŃSKI, Z. Comparison of in vitro antioxidant activities of malt, hops, worts and lager type beer. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences: formerly Acta Alimentaria Polonica**, [s. l], v. 50, n. 4, p. 53-59, 2000

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão BHT pelo método DPPH.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	11,21 Be	22,50 Bd	41,20 Bc	64,84 Bb	82,21 Ba
Columbus	6,81Ce	14,88 Cd	29,19 Cc	52,33 Cb	84,08 Ca
Sorachi	7,20 Ce	13,10 Cd	26,10 Cc	48,58 Cb	86,17 Ca
Sladek	11,32 Be	16,00 Cd	29,46 Cc	51,30 Cb	82,71 Ba
Cascade	11,44 Be	22,30 Bd	41,39 Bc	70,39 Bb	83,82 Ba
East Kent	12,72 Be	23,49 Bd	42,92 Bc	72,88 Bb	85,42 Ba
BHT	24,66 Ac	43,99 Ad	58,08 Ac	76,96 Ab	89,71 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Material suplementar 2. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método ABTS.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	12,98 Be	25,41 Bd	42,10 Bc	78,47 Bb	100,0 Aa
Columbus	6,70 De	14,52 Dd	27,71 Cc	51,63 Eb	89,72 Ba
Sorachi	6,76 De	16,00 Dd	29,81 Cc	54,36 Db	91,56 Ba
Sladek	5,40 De	11,48 Ed	27,30 Dc	49,24 Fb	86,33 Ca
Cascade	11,37 Be	22,48 Cd	40,34 Bc	72,20 Cb	99,21 Aa
East Kent	9,32 Ce	21,80 Cd	42,55 Bc	73,62 Cb	99,47 Aa
BHT	61,50Ad	83,78 Ac	97,32 Ab	100,0 Aa	100,0 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Material suplementar 3. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método redução do complexo fosfomolibdênio.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	0,04 Bd	0,08 Cd	0,15 Cc	0,28 Cb	0,42 Ca
Columbus	0,08 Bd	0,18 Bc	0,17 Cc	0,32 Cb	0,49 Ca
Sorachi	0,08 Be	0,14 Bd	0,21 Bc	0,36 Bb	0,60 Ba
Sladek	0,09 Bd	0,11 Cd	0,17 Cc	0,28 Cb	0,50 Ca
Cascade	0,11 Be	0,17 Bd	0,25 Bc	0,37 Bb	0,58 Ba
East Kent	0,08 Be	0,15 Bd	0,24 Bc	0,39 Bb	0,64 Ba
BHT	0,19Ae	0,33 Ad	0,47 Ac	0,66 Ab	0,81 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Material suplementar 4. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método poder redutor.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	0,13 Bd	0,14 Bd	0,17 Bc	0,22 Cb	0,33 Ca
Columbus	0,11 Bd	0,14 Bc	0,15Cc	0,20 Cb	0,30 Da
Sorachi	0,14 Bc	0,15 Bc	0,17 Bc	0,21 Bb	0,34 Ca
Sladek	0,11 Bc	0,13 Bc	0,13 Bc	0,18 Cb	0,25 Da
Cascade	0,12 Bc	0,14 Bc	0,16 Bc	0,20 Bb	0,34 Ba

East Kent	0,13 Bc	0,14 Bc	0,16 Bc	0,23 Bb	0,38 Ba
BHT	0,25Ae	0,37 Ad	0,54 Ac	0,81 Ab	1,13 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Material suplementar 5. Valores de compostos fenólicos totais expressos mg de equivalentes de ácido Gálico por grama de peso seco dos lúpulos (mg EAG g⁻¹).

Amostras	mg EAG/g
Galena	102,44 B
Columbus	86,26 D
Sorachi	93,81 C
Sladek	71,95 E
Cascade	103,03 B
East Kent	117,34 A

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Material suplementar 6. Valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT (mg equivalente ao BHT por g do extrato) das 6 variedades de lúpulo analisadas

Amostras	DPPH mg EBHT g ⁻¹	ABTS mg EBHT g ⁻¹	Complexo fosfomolib. mg EBHT g ⁻¹	Poder Redutor mg EBHT g ⁻¹
Galena	593,3 A	165,3 A	231,7 D	90,1 A
Columbus	284,0 B	94,0 B	276,8 C	53,4 B
Sorachi	213,3 B	104,0 B	352,0 B	75,3 A
Sladek	290,7 B	92,3 B	232,0 C	30,5 C
Cascade	588,0 A	155,7 A	363,7 B	62,0 B
East Kent	626,7 A	167,7 A	398,7 A	97,2 A

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

ARTIGO 2**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAs E PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS EM SUA SÍNTESE NO LÚPULO**

Identificação e caracterização de micrornas e proteínas envolvidas em sua síntese no lúpulo

João Victor Nunes Silva¹, Marcos de Souza Gomes².....

¹ Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Instituto de Biotecnologia, Campus Patos de Minas, Bloco Palácio dos Cristais, Sala 202, Avenida Getúlio Vargas, 230, Patos de Minas, MG, Brasil,

² Grupo Multidisciplinar de Pesquisa em Ciência e Tecnologia (RMPCT), Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Campus Patos de Minas, Rua Major Jerônimo, 566, Patos de Minas, MG, Brasil.

Resumo

O lúpulo, espécie (*Humulus Lupulus*), é amplamente cultivado no mundo para o abastecimento da indústria cervejeira. Pouco se sabe sobre os aspectos moleculares desse vegetal, logo é necessário maior conhecimento nessa área para potencializar programas de melhoria e desenvolvimento de aplicações. Os microRNAs são moléculas envolvidas em diversos processos regulatórios e sua síntese é dependente de uma maquinaria proteica complexa. Diante disso, esse estudo objetivou identificar e caracterizar as proteínas da via de síntese dos sRNAs (pequenos RNAs) e as moléculas de miRNAs presentes no lúpulo, por meio de alinhamentos locais via BLAST+, alinhamentos globais via ClustalX2, análises filogenéticas realizadas pelo programa MEGA11 e ferramenta RNAalifold. Foram identificadas 82 prováveis proteínas envolvidas na biossíntese dos sRNAs dentre elas 17 Argonautas, 12 Dicers, 13 DRBs (proteínas de ligação ao RNA dupla fita), 1 HEN1 (Enzima metil-transferase HUA ENHANCER 1), 140 precursores de miRNAs e, 191 miRNAs maduros todos eles pertencentes a 73 famílias. As proteínas encontradas exibiram conservação de domínios e sítios ativos enquanto os miRNAs estiveram conservados a nível de estrutura primária e secundária em relação as espécies ortólogas. Essa conservação sugere a importância da via no lúpulo e possibilita um melhor entendimento dela para o desenvolvimento de aplicações futuras.

Palavras chave: *Humulus lupulus*, Argonautas, Dicer-like, DRBs, MicroRNAs

Introdução

O lúpulo é uma planta milenar que assume aspecto de trepadeira e se desenvolve melhor em regiões localizadas entre as latitudes 35° e 55° devido a condições climáticas e ambientais favoráveis encontradas nesses lugares (Rossini *et al.*, 2021; Almager *et al.*, 2014; Marceddu *et al.*, 2020). O vegetal é altamente comercializado no planeta devido a sua importância para a indústria cervejeira que absorve quase a totalidade da produção mundial do lúpulo (Korpelainen and Pietiläinen., 2021). Esse interesse se deve aos fitoquímicos que o cone da planta feminina disponibiliza para a cerveja, principalmente as resinas e os compostos fenólicos (Almager *et al.*, 2014; Durello *et al.*, 2019).

A cultura de lúpulo enfrenta obstáculos como as diversas patologias causadas por agentes de tipos variados como vírus, nematoides e insetos (Gargani *et al.*, 2017). Para o combate dessas doenças o melhoramento genético é uma alternativa e ele demanda maior conhecimento a respeito dos aspectos moleculares e genéticos do vegetal (Moose and Mumm., 2008). Além disso, muitos aspectos do desenvolvimento das plantas, como por exemplo, a floração e o crescimento de raízes têm uma participação muito importante dos pequenos RNAs não codificadores de proteínas, como os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenas moléculas pertencentes a classe dos sRNAs e estão envolvidos em diversos processos de regulação no vegetal dentre eles a resistência a patologias e desenvolvimento floral (Teghtmeyer., 2018; Čerenak *et al.*, 2019).

Para a síntese destes ácidos nucléicos é necessária a ação de diversas proteínas centrais e acessórias que estabelecem uma via bem conservada nos vegetais (Wang *et al.*, 2019). Dentre as proteínas já identificadas, as Argonautas (AGOs), Dicers (DCLs), DRBs (Proteínas de ligação ao RNA dupla fita), Serrate (SE), e HEN1 (Enzima metiltransferase HUA ENHANCER 1) recebem destaque com suas funções primordiais para

a síntese correta dos sRNAs (Pegler *et al.*, 2019). A ação das proteínas acessórias como as proteínas de choque térmico 90 (HSP90), Squint (SQN) e proteínas de ligação a cap (CPBs) 20 e 80 também é vital para o sucesso da biogênese dos miRNAs (Pegler *et al.*, 2019). Diante disso a identificação e caracterização das proteínas e das moléculas de miRNAs se faz necessária para um melhor entendimento do processo no lúpulo.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar proteínas da via de síntese dos miRNAs bem como as estruturas primárias e secundárias dos miRNAs preditos no lúpulo afim de entender melhor o funcionamento da via de síntese dessas moléculas bem como a conservação das proteínas e das moléculas de miRNA no lúpulo em relação a espécies ortólogas possibilitando o desenvolvimento de aplicações futuras visando essas proteínas e miRNAs.

Material e métodos

Identificação das proteínas da via de síntese dos sRNAs em *H. lupulus*

As sequências das proteínas envolvidas na biogênese dos sRNAs em *A. thaliana* e *C. sativa* foram identificadas e retiradas do banco de referência de proteínas (refseq-protein) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Essas sequências foram utilizadas como *query* (referência) para a identificação de prováveis proteínas envolvidas na via de biossíntese dos sRNAs no lúpulo usando o recurso BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool), por meio do programa BLAST+ (ncbi-blast-2.12.0). Com o auxílio das sequências referencias, as prováveis proteínas foram identificadas em meio as proteínas preditas da espécie *H. lupulus* variedade Cascade disponíveis no banco HopBase.

Predição dos microRNAs maduros e precursores (Pre-miRNAs)

O genoma *assembly* de *H. lupulus* foi inicialmente obtido do banco de dados HopBase e os prováveis microRNAs foram buscados por meio do algoritmo ajustado descrito por De Souza Gomes (De Souza Gomes *et al.*, 2011). As prováveis sequências de “hairpins” ou sequências similares a precursores de miRNAs foram procuradas no genoma por meio das ferramentas BLAST do NCBI e EMBOSS Einverted com os parâmetros de repetição máxima de 336 nucleotídeos (De Souza Gomes *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015).

Alguns filtros foram aplicados a fim de eliminar sequências que não eram de interesse, mantendo características que representam bem os precursores de miRNA, levando em consideração também regiões que não tem potencial de origem desses precursores. Os filtros usados foram os descritos por De Souza Gomes (De Souza Gomes *et al.*, 2011): conteúdo de Guanina e Citosina (G, C) entre 20% e 65%, mínima energia livre (MFE), homologia com estruturas de miRNAs maduros conservados e homologia com as regiões e não codificantes de RNAs excluindo os miRNAs (De Souza Gomes *et al.*, 2011).

O banco de dados utilizados para a comparação com as possíveis sequências que continham grampos a fim de confirmá-las como sendo sequências representantes de miRNAs no lúpulo foi o miRBase. Foram aceitos no máximo cinco *mismatches* na estrutura final do possível miRNA maduro. Outras sequências representantes de outros grupos de pequenos RNAs foram descartadas por meio do banco de dados RFAM e as sequências repetitivas foram eliminadas por meio da ferramenta RepeatMasker (Gardner *et al.*, 2009). As prováveis sequências resultantes dos precursores e maduros foram obtidas dessa filtragem e utilizadas nas análises posteriores.

As sequências dos pre-miRNAs obtidas foram submetidas a análises termodinâmicas para sua caracterização. Os parâmetros utilizados foram mínima

energia livre (MFE), mínima energia livre ajustada (AMFE), Índice de mínima energia livre (MFEI), tamanho, conteúdo dos nucleotídeos de Adenina (A), Uracila (U), Citosina (C), Guanina (G), conteúdo dos pares Guanina e Citosina (GC), Adenina e Uracila (AU), conjunto mínimo de energia livre (MFEE), conjunto de diversidade, e frequência na estrutura de energia livre mínima no conjunto. Para a determinação da AMFE foi utilizada a MFE de sequências com comprimento de 100 nucleotídeos e para a determinação de MFEI a equação $MFEI = [(AMFE) \times 100] / (G\% + C\%)$ foi empregada como descrito por Zhang (Zhang et al., 2006). A determinação das estruturas secundárias foi feita por meio da ferramenta RNAalifold e os conteúdos de GC juntamente com as outras propriedades estruturais foram determinadas por meio de *scripts* em linguagem *Pearl*.

Análises *in silico* das proteínas da via de síntese dos sRNAs e dos precursores de miRNAs

Os domínios conservados, sítios ativos e estrutura das proteínas da via de síntese dos sRNAs foram acessados e analisados por meio das ferramentas PFAM (versão 35.0) e Conserved Domains Database (CDD) (Finn et al., 2016; Bauer et al., 2015). Para a análise dos sítios ativos das prováveis proteínas e para o nível de conservação e estrutura dos precursores de miRNA foram realizados alinhamentos múltiplos por meio do programa ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007). Os parâmetros adotados para o alinhamento das proteínas foram os *defaults* enquanto para os miRNAs foram ajustados para *gap opening*: 22.50 e *gap extension*: 0.83 (Takane et al., 2010).

Além disso, esses precursores do lúpulo e seus ortólogos também foram alinhados com o auxílio da ferramenta RNAalifold, a fim de analisar suas estruturas primária e secundárias. As análises filogenéticas das prováveis proteínas juntamente

com as ortólogas foram realizadas por meio do programa MEGA 5.2.2 pelo método de “neighbour-joining”. Para o cálculo da distância evolutiva foi utilizado o modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT), obtendo uma árvore consenso com a opção de bootstrap 2000 réplicas, a fim de representar a história evolutiva das proteínas em relação as ortólogas (Tamura *et al.*, 2011; Saitou and Nei, 1987).

Resultados

Análises das proteínas da via de síntese dos sRNAs em *H. lupulus*: Prováveis proteínas encontradas

Com o intuito de obter um melhor entendimento a respeito da síntese de sRNAs em *H. lupulus* buscou-se identificar o máximo possível de componentes da via no lúpulo, por meio do alinhamento local BLASTp, utilizando-se de sequências ortólogas de *A. thaliana* e *C. sativa*. Foram selecionadas proteínas com *e-value* superior a e^{-80} e identidade superior a 30%, entretanto, muitas delas foram descartadas para as análises filogenéticas posteriores, logo foram utilizadas nas análises somente as proteínas que apresentaram esses parâmetros e que se encaixaram na filogenia.

Por meio desse alinhamento e com o auxílio das análises dos domínios conservados foram identificadas 81 prováveis proteínas envolvidas na via de processamento de sRNAs, tais como as proteínas centrais da via DRBs, Argonautas, HEN1, DCLs e SE (Tabela S1) e diversas proteínas acessórias como HASTY 1 (HST1), Exportina 1A (EXPO1A), RACK1A, HSP90, SQN, KETCH1, CPB20 e CPB80 (Tabela S2). Dentre todas essas proteínas, muitas delas foram identificadas como sendo fragmentos de proteínas maiores.

De todas as proteínas centrais encontradas, destacaram-se as Argonautas, DCLs, DRBs e HEN1. Para a família das Argonautas foram obtidas as seguintes prováveis

proteínas: 000648F.g11.t1, 001670F.g16.t1, 001670F.g17.t1, 000121F.g13.t2, 000121F.g13.t1, 000121F.g20.t1, 000055F.g14.t1, 001231F.g8.t1, 004766F.g6.t1, 006768F.g9.t3, 006768F.g9.t1, 005113F.g24.t1, 005113F.g24.t2, 005113F.g21.t1, 000281F.g25.t1, 002333F.g2.t1.

Para a família das DCLs foram obtidas as seguintes prováveis proteínas: 000794F.g20.t3, 000794F.g20.t4, 002774F.g7.t1, 004436F.g1.t1, 002037F.g10.t1, 002037F.g10.t2, 002752F.g24.t2, 002752F.g24.t1, 002752F.g24.t6, 002752F.g24.t3, 002752F.g24.t4, 002752F.g24.t5. Para as DRBs foram obtidas as seguintes prováveis proteínas: 001470F.g12.t1, 001470F.g12.t2, 002012F.g19.t1, 002098F.g15.t1, 000140F.g36.t1, 006183F.g6.t1, 006183F.g6.t2, 006183F.g6.t5, 006183F.g6.t4, 004957F.g14.t2, 001395F.g79.t2, 004957F.g14.t1, 001395F.g79.t1. E para a enzima HEN1 apenas 000029F.g31.t1. Os dados dos alinhamentos das principais proteínas estão dispostos abaixo em comparação com *A. thaliana* (Tabela S3).

Proteínas Argonautas e Dicer no lúpulo: Domínios conservados, sítios ativos e filogenia

As 17 melhores prováveis proteínas Argonautas do lúpulo foram submetidas a análise dos domínios conservados e revelaram a presença dos domínios provenientes dessa família de proteínas: Piwi, ArgoN, ArgoL1, ArgoL2, PAZ e ArgoMID com variações de ocorrência entre elas, devido a muitas delas serem fragmentos de uma Argonauta maior (Tabela 1). A proteína 001670F.g16.t1 apresentou apenas os domínios PAZ e ArgoL1, enquanto as 001670F.g17.t1, 000121F.g13.t2, 000121F.g13.t1, 001231F.g8.t1, 004766F.g6.t1, 006768F.g9.t3, 006768F.g9.t1 evidenciaram apenas o domínio Piwi.

Tabela 1- Análise dos domínios conservados nas 17 prováveis proteínas Argonautas em comparação com ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*. Os Números indicam a posição de início e fim dos domínios. Campos em branco indicam que os domínios estiveram ausentes ou presentes sem significância de acordo com o PFAM.

Nome da proteína	ArgoN	PAZ	ArgoMid	Piwi	ArgoL1	ArgoL2	Gly-rich_Ago1
001231F.g8.t1				177-394			
004766F.g6.t1				205-387			
006768F.g9.t3				137-226			
006768F.g9.t1				68-244			
000121F.g13.t2				171-469			
000121F.g13.t1				171-469			
000121F.g20.t1	146-280	362-469		646-940	291-340		
005113F.g24.t1	133-268				279-328		
005113F.g21.t1	111-250				261-309		
000281F.g25.t1		17-120		284-388		129-175	
002333F.g2.t1		7-112		297-457			
000055F.g14.t1	50-209	276-405	514-592	558-867	221-268	415-461	
000648F.g11.t1	181-327	399-521		685-922	337-386		
001670F.g16.t1		291-400			229-278		
001670F.g17.t1				53-199			
004559F.g23.t1	118-257	341-449	514-592	606-924	268-317	458-504	
005113F.g24.t2	133-268	351-460			279-328	469-512	
AGO1/A. thaliana	190-325	415-518	586-661	679-998	337-387	529-575	75-172
AGO2/A. thaliana	174-306	372-493		668-962	316-366	509-555	
AGO4/A. thaliana	67-228	294-424	488-539	577-885	240-289	434-479	
AGO6/A. thaliana	38-196	261-386		541-851	208- 254	398-444	
AGO7/A. thaliana	164-306	378-499		650-948	316-365		
AGO10/A. thaliana	140-275	363-467	534-611	626-944	285-334	477-523	
AGO1/C. sativa	211-344	410-536	603-678	697-1016	354-404	546-592	85-191
AGO2/C. sativa	189-323	401-51		691-984	333-384		
AGO4/C. sativa	58-214	280-409	472-522	562-868	226-274	418-463	
AGO5/C. sativa	26-152	238-342	408-484		163-212	351-397	
AGO7/C. sativa	184-330	402-524		688-995	340-389		
AGO10/C. sativa	141-275	363-467	534-611	626-944	285-334	477-523	

A fim de investigar o nível de conservação dos resíduos catalíticos das prováveis proteínas Argonautas do lúpulo os domínios PIWI foram alinhados e buscou-se identificar a presença da tríade de aminoácidos conservada que é aspartato-aspartato-histidina (DDH), comparando também a posição do resíduo de histidina na posição 798 presente em *Arabidopsis* (Mallory and Vaucheret, 2010).

Foram encontradas em algumas prováveis proteínas e nos ortólogos a tríade catalítica nas posições Asp 688 -Asp 774 – His 913 na proteína 004559F.g23.t1, Asp 640 – Asp 723- His 856 na proteína 000055F.g14.t1, Asp 769 – Asp 842- His 984 na proteína 000648F.g11.t1, Asp 725 – Asp 798 – His 933 na proteína 000121F.g20.t1, Asp 253 – Asp 327 – His 460 na proteína 000121F.g13.t2, Asp 253 – Asp 327 – His 460 para a proteína 000121F.g13.t1(Figura 1). Nenhuma delas exibiu a Histidina conservada na posição 798.

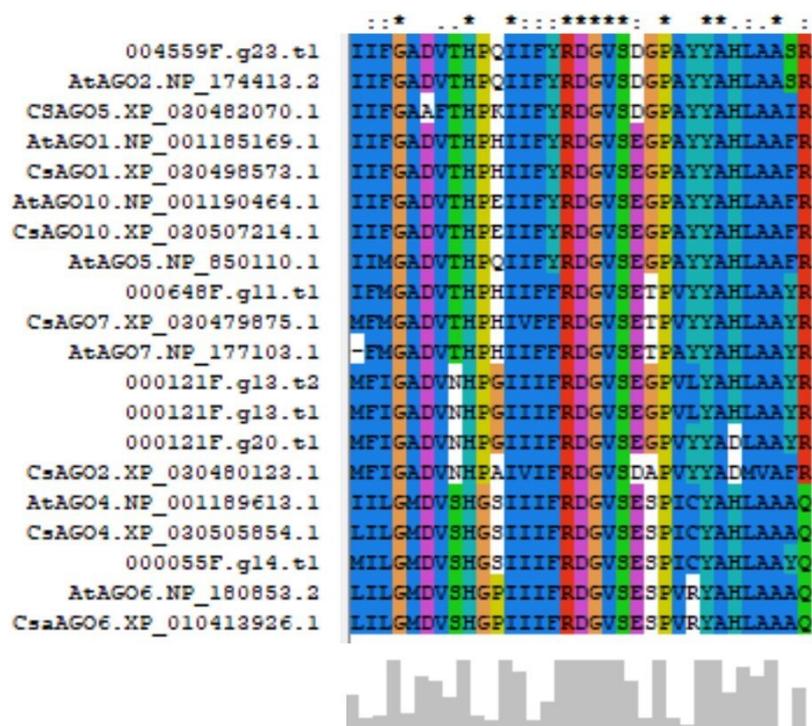


Figura 1 - Análise dos resíduos catalíticos e dos aminoácidos da vizinhança presentes nos domínios PIWI das prováveis proteínas Argonautas em comparação com ortólogos de *C. sativa* e *A. thaliana*. Aminoácidos altamente conservados estão marcados com *. Cs: *Cannabis Sativa*, At: *Arabidopsis Thaliana*.

A fim de visualizar e entender a diversificação das prováveis proteínas Argonautas do lúpulo (*H. lupulus*) uma análise filogenética foi realizada por meio das sequências de aminoácidos dessas proteínas (Figura 2). A filogenia mostrou a divisão

das proteínas próximas de suas ortólogas em grupos diversos como AGO7, AGO2, AGO6, AGO5 e AGO1, os clados AGO 4 e AGO 10 não tiveram representantes encontrados no lúpulo. A espécie que exibiu maior frequência na proximidade foi a *C. sativa* e um maior distanciamento em relação as demais.

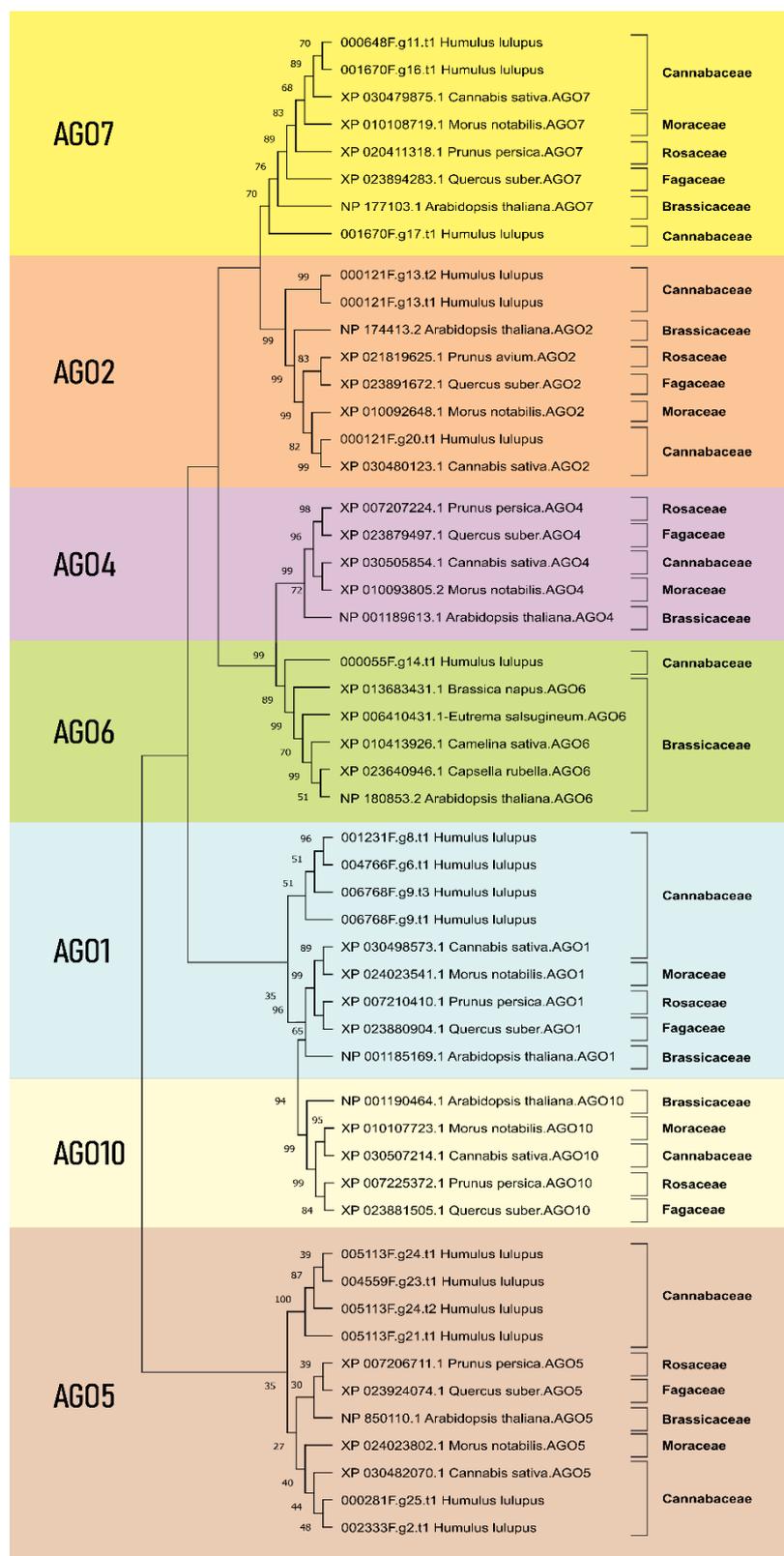


Figura 2- Árvore filogenética, construída pelo método “neighbour-joining”, modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) e bootstrap 2000 réplicas, representando a relação das proteínas ArgonAUTs encontradas em *H. lupulus* com suas ortólogas e parálogas.

As 12 prováveis proteínas Dicer encontradas também foram submetidas a análise dos domínios conservados que revelou a presença dos domínios ResIII, Dicer_Dimer, helicase-C, PAZ, DEAD e Ribonuclease_3, algumas delas não exibiram todos os domínios evidenciando fragmentos de proteínas Dicer maiores (Tabela 2).

Tabela 2: Análise dos domínios conservados nas 12 prováveis proteínas DCLs em comparação com ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*. Números representam a posição de início e fim dos domínios. Campos em branco indicam que os domínios não estiverem presentes ou estiveram presentes, porém classificados como insignificantes segundo as análises do PFAM.

Nome da proteína	DEAD	Helicase-C	RES III	Dicer dimer	PAZ	RIBOC	RIBOC	DSRM
002752F .g24.t2						38-184	260-324	
002752F .g24.t1						36-184	260-373	
002752F .g24.t6				9-64	357-413 439-516	553-701	777-841	
002752F .g24.t3		686-803	290-450	878-966		1428- 1576	1652- 1716	
002752F .g24.t4		686-803	290-450	878-966	1245- 1301			
002752F .g24.t5		686-803	290-450	878-966	1259- 1315			
002774F .g7.t1		386-493	23-190	563-637	818-962	1004- 1124	1194- 1304	
004436F .g1.t1				483-557	738-882	1055- 1161		
002037F .g10.t1					54-187	231-365	443-551	
002037F .g10.t2	99-168	376-475		546-633	865-997	1041- 1175	1253- 1362	
000794F .g20.t3						48-180	256-361	
000794F .g20.t4						48-180	256-361	
DCL1/ <i>A. thaliana</i>		648-765	254-415	840-928	1203- 1338	1375 - 1518	1594- 1707	1832- 1904
DCL2/ <i>A. thaliana</i>		165-277		346-424	598-745	782-900	972-1083	
DCL3/ <i>A. thaliana</i>	55-188	390-497			829-971	1012- 1147	1221- 1329	

DCL4/A. <i>thaliana</i>	127-287	476-590		656-744	955- 1076	1119- 1251	1327- 1436	1621- 1696
DCL1/C. <i>sativa</i>		700-815	301-462	890-978	1257- 1389	1430- 1573	1649- 1762	1876- 1947
DCL2/C. <i>sativa</i>		378-482	21-185	552-626	818-950	992-1108	1180- 1290	
DCL4X1 /C. <i>sativa</i>	60-216	402-520		586-672		1046- 1180	1256- 1357	1561- 1636
DCL4X2 /C. <i>sativa</i>		167-285		351-437		811-945	1021- 1122	1326- 1401

As proteínas 000794F.g20.t3, 000794F.g20.t4, 002752F.g24.t2 e 002752F.g24.t1 apresentaram apenas dois domínios Ribonuclease_3. Já a proteína 004436F.g1.t1 exibiu um domínio Ribonuclease_3, um domínio PAZ e um Dicer_dimer, enquanto a proteína 002037F.g10.t1 exibiu dois domínios Ribonuclease_3 e um domínio PAZ. Todas essas proteínas são fortes candidatas a serem fragmentos de Dicercs do lúpulo.

Foi verificado o nível de conservação dos aminoácidos catalíticos das prováveis proteínas Dicercs do lúpulo, avaliando os aminoácidos presentes nos domínios RNAase III (Ribonuclease_3): são eles glutamato (E), aspartato (D), aspartato (D) e glutamato (E) (Ji., 2008). Na proteína 002752F.g24.t6 as posições foram Glu 556 – Asp 560 – Asp 687 – Glu 690, para as proteínas 002752F.g24.t2 e 002752F.g24.t1 apresentaram os aminoácidos nas mesmas posições que foram Glu 39 – Asp 43 – Asp 170 – Glu 173, na proteína 002752F.g24.t3 as posições foram Glu 1431 – Asp 1435 – Asp 1562 – Glu 1565 (Figura 3)

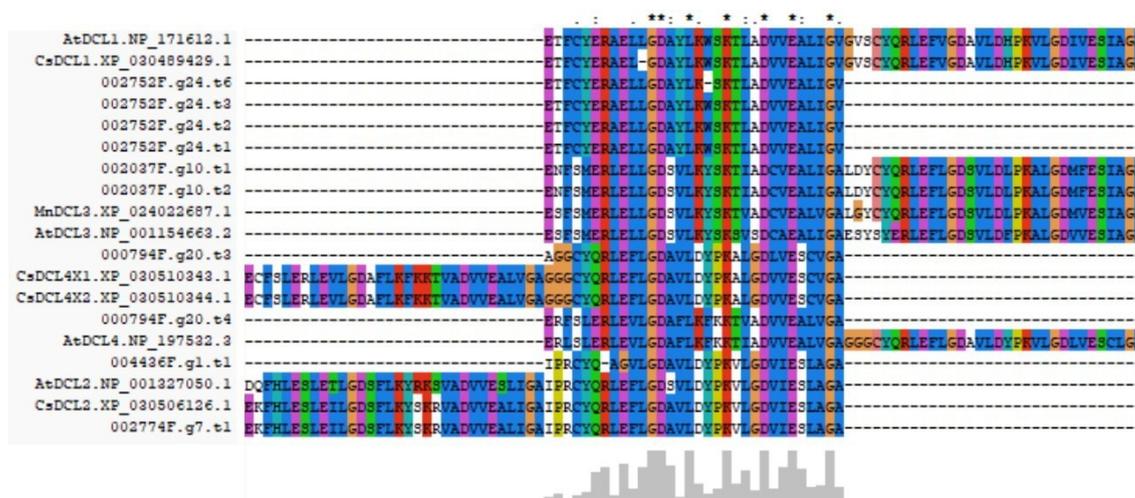


Figura 3- Análise dos resíduos catalíticos e dos aminoácidos da vizinhança presentes nos domínios Ribonuclease III (Riboc I e II) das prováveis proteínas DCLs em comparação com ortólogas de *C. sativa* e *A. thaliana*. Aminoácidos altamente conservados estão marcados com *. Cs: *Cannabis Sativa*, At: *Arabidopsis Thaliana*.

Na proteína 002774F.g7.t1 os aminoácidos ocuparam as posições Glu 1007 – Asp 1011 – Asp 1108 – Glu 1111 – Glu 1197 – Asp 1201 – Asp 1291 – Glu 1294, na proteína 004436F.g1.t1 houve a substituição do primeiro aspartato por uma valina e as posições foram Val 1055 – Asp 1058 – Asp 1148 – Glu 1151. Já para 000794F.g20.t3 e 000794F.g20.t4 as posições foram respectivamente Glu 259 - Asp 278 - Asp 347 - Glu 350, Glu 51 - Asp 55 - Asp 166 – 169.

A fim de verificar e entender a possível variedade das prováveis proteínas Dicers do lúpulo foi construída uma árvore filogenética por meio das sequências de aminoácidos delas com as sequências ortólogas de *A. thaliana* e *C. sativa* (Figura 4). As análises revelaram representantes em quatro grupos, DCL1, DCL2, DCL3 e DCL4 com maior proximidade com a espécie *C. sativa* e maior distância evolutiva em relação aos demais.

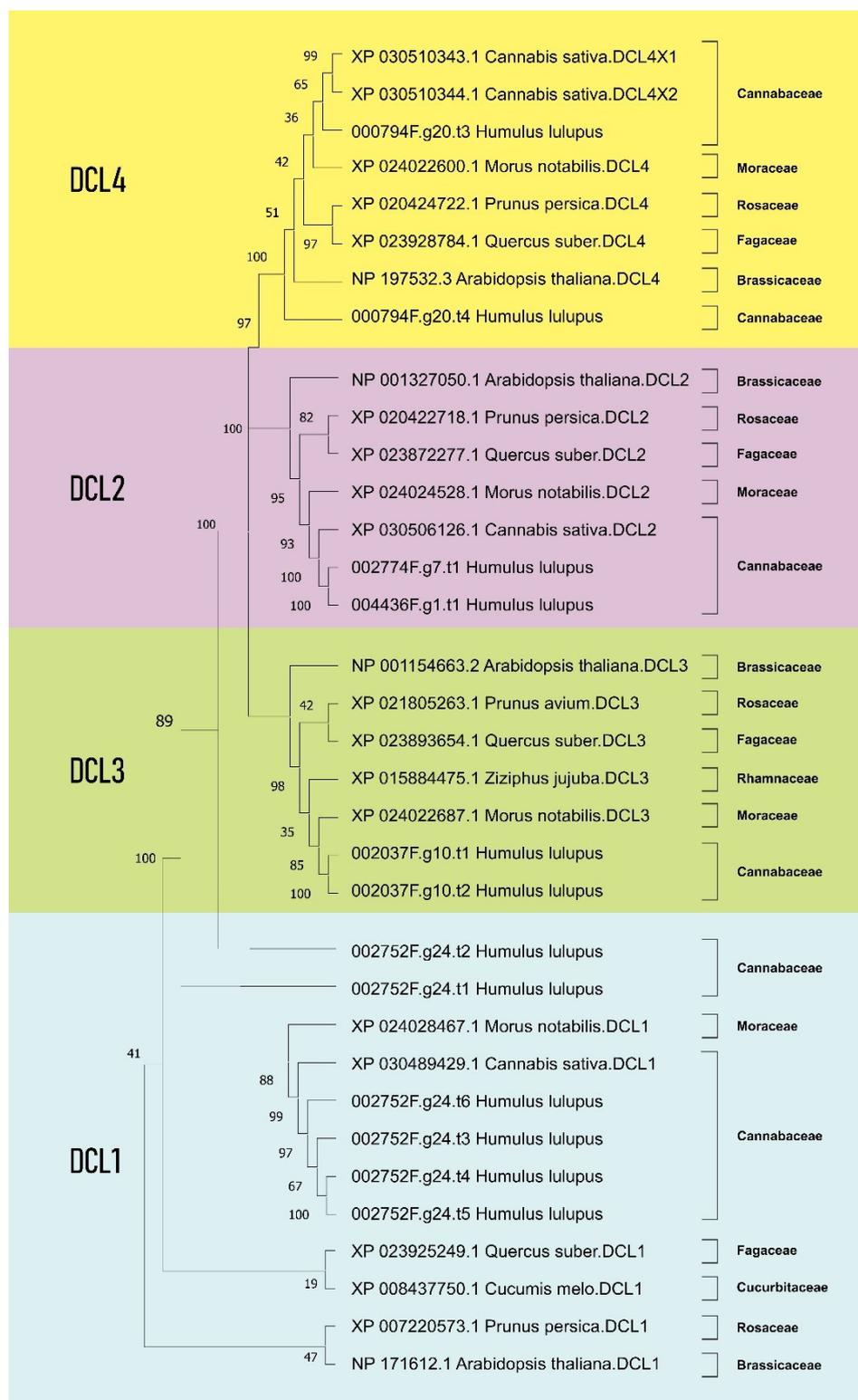


Figura 4- Árvore filogenética, construída pelo método “neighbour-joining”, modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) e bootstrap 2000 réplicas, representando a relação das proteínas Dicer like encontradas em *H. lupulus* com suas ortólogas e parálogas.

Proteínas de ligação ao RNA dupla fita (DRBs) e HEN1: Domínios conservados, sítios ativos e filogenia

As 13 prováveis proteínas de ligação ao RNA dupla fita (DRBs) do lúpulo foram submetidas a análise de domínios conservados. Todas exibiram apenas o domínio DSRM (Motivo de ligação a RNA dupla fita) de ligação ao RNA (Tabela 3). Não foram evidenciados aminoácidos catalíticos, entretanto foram encontrados aminoácidos muito conservados na estrutura dessas proteínas e suas ortólogas, logo provavelmente são importantes para a ligação da proteína com o RNA de dupla fita durante a via de síntese dos sRNAs (Figura 5)

Tabela 3- Análise dos domínios conservados nas 13 prováveis proteínas DRBs em comparação com ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*. Os números representam o intervalo da posição de início e final dos domínios.

Nome da proteína	DSRM	DSRM
004957F.g14.t2	11-76	100-163
001395F.g79.t2	11-76	100-163
004957F.g14.t1	18-83	107-170
001395F.g79.t1	18-83	107-170
000140F.g36.t1	2-68	88-153
001470F.g12.t1	2-68	88-152
001470F.g12.t2	2-68	88-152
002012F.g19.t1	2-68	88-152
006183F.g6.t1	69-135	148-212
006183F.g6.t2	69-135	148-212
006183F.g6.t5	69-135	148-212
006183F.g6.t4	651-717	730-794
002098F.g15.t1	2-68	88-153
DRB1/<i>A. thaliana</i>	17-82	103-165
DRB2/<i>A. thaliana</i>	2-68	88-153
DRB3/<i>A. thaliana</i>	2-68	88-150
DRB4/<i>A. thaliana</i>	5-71	83-145
DRB5/<i>A. thaliana</i>	2-68	88-153
DRB1/<i>C. sativa</i>	18-83	108-171
DRB2/<i>C. sativa</i>	2-68	99-153
DRB3/<i>C. sativa</i>	2-68	88-152
DRB4/<i>C. sativa</i>		92-155

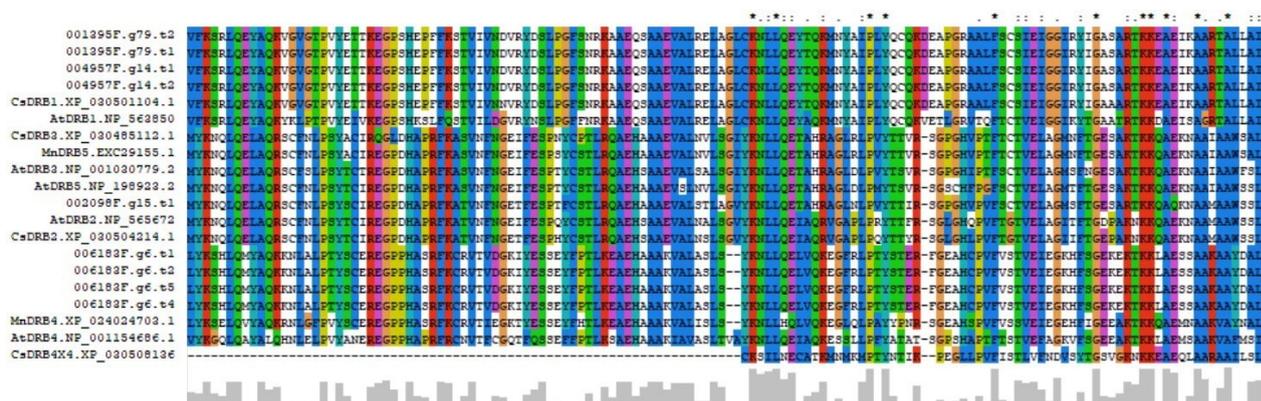


Figura 5- Análise dos resíduos conservados e dos aminoácidos da vizinhança presentes nos domínios de ligação ao RNA (DSRM) das prováveis proteínas DRBs em comparação com ortólogas de *C. sativa* e *A. thaliana*. Aminoácidos altamente conservados estão marcados com *. Cs: *Cannabis Sativa*, At: *Arabidopsis Thaliana*.

O estudo de filogenia foi feito por meio das sequências de aminoácidos das prováveis proteínas DRBs do lúpulo e suas ortólogas (Figura 6). A árvore filogenética resultante dos alinhamentos globais evidenciou proteínas em cinco grupos diferentes: DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5. Não foram encontrados representantes do clado DRB2 no lúpulo. A espécie que exibiu maior proximidade evolutiva foi novamente a *C. sativa* com um maior distanciamento em relação as demais.

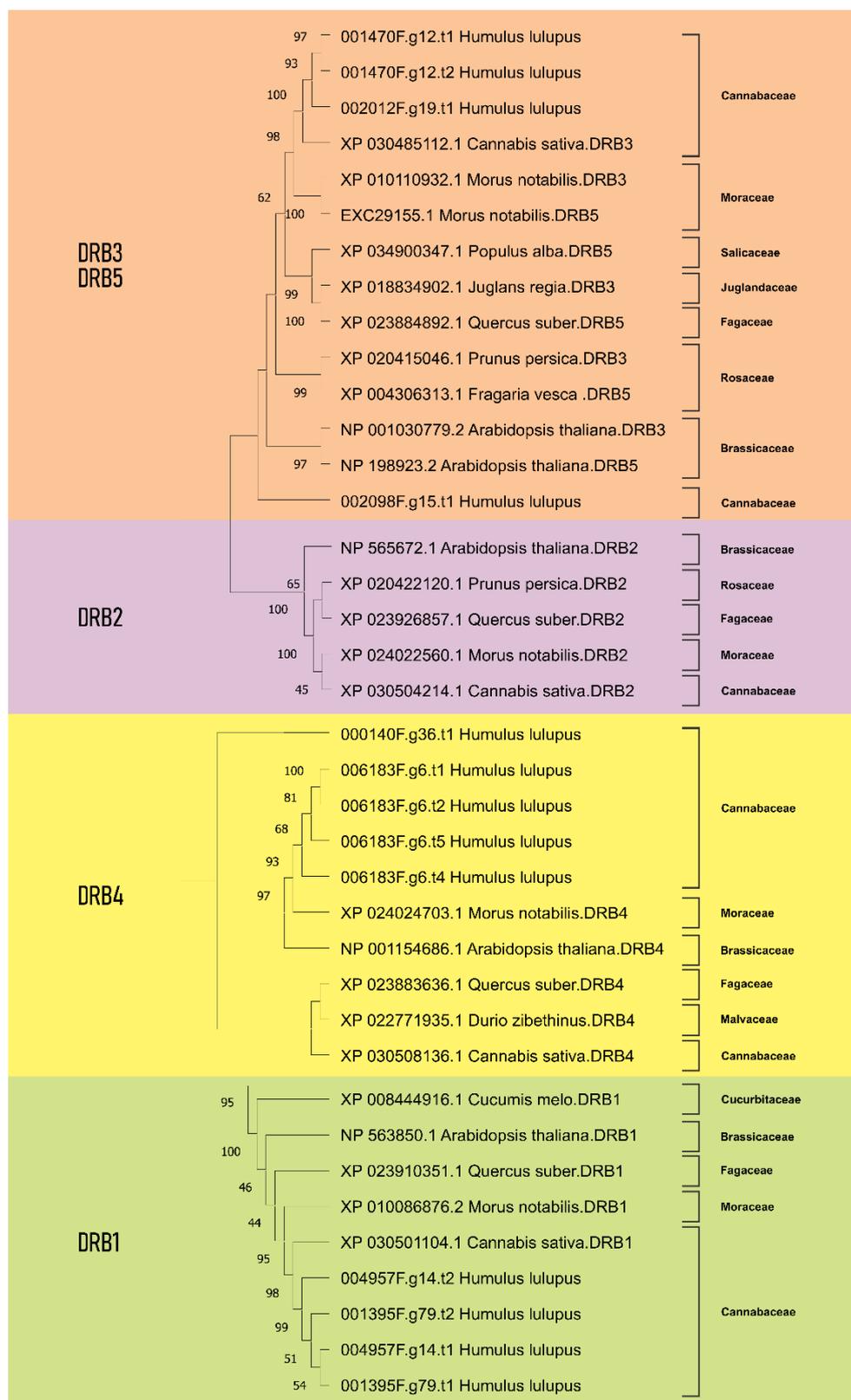


Figura 6- Árvore filogenética, construída pelo método “neighbour-joining”, modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) e bootstrap 2000 réplicas, representando a relação das

proteínas de ligação ao RNA (DRBs) encontradas em *H. lupulus* com suas ortólogas e parálogas.

A provável proteína metil transferase 2'-O- de pequenos RNAs (HEN1) foi submetida a análise dos domínios conservados que revelou a presença de 3 domínios conservados: Hen1_Lam_C, dsRBD2 e Methyltransf_31 (Tabela 4).

Tabela 4- Análise dos domínios conservados na provável proteína HEN1 encontrada em comparação com ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*. Os números indicam a posição de início e fim do domínio.

Nome da proteína	Hen1_Lam_C	dsRBD2	Methyltransf_31
000029F.g31.t1	368-510	226-358	698-818
HEN1/<i>A. thaliana</i>	218-355	357-467	712-835
HEN1/<i>C. sativa</i>	226-360	362-507	712-803

O alinhamento revelou os aminoácidos conservados Glu - 776 – Glu -779 -His 780 – His 843 conhecidos por interagir com o íon magnésio Mg^{2+} , permitindo a atividade catalítica da enzima em *A. thaliana* (Huang *et al.*, 2009). Além da conservação nesses aminoácidos também foi visualizada a conservação de aminoácidos na vizinhança desses aminoácidos da proteína quando comparada com as ortólogas (Figura 7). A análise filogenética demonstrou maior proximidade da proteína do lúpulo com a proteína proveniente da *C. sativa* com um maior distanciamento das demais famílias, resultado esperado visto que o lúpulo pertence a mesma família da *C. sativa* (Figura 8).

```

*****
HlHEN1000029Fg31t1  IGTCLVIEHMEEDQFRNHDHKFEWT
AtHEN1NP0011907821  IGTCLVIEHMEEDQFRNHDHKFEWT
CsHEN1X2XP0304809751  IGTCLVIEHMEEDQFRNHDHKFEWT
CsHEN1X1XP0304809741  IGTCLVIEHMEEDQFRNHDHKFEWT

```

Figura 7- Análise dos resíduos conservados de Glu, Glu, His e His que apresentam função importante para a catálise e dos aminoácidos da vizinhança evidenciando alta conservação da região na proteína do lúpulo das ortólogas de *C. sativa* e *A. thaliana*. Aminoácidos altamente conservados estão marcados com *. Cs: *Cannabis Sativa*, At: *Arabidopsis Thaliana*.

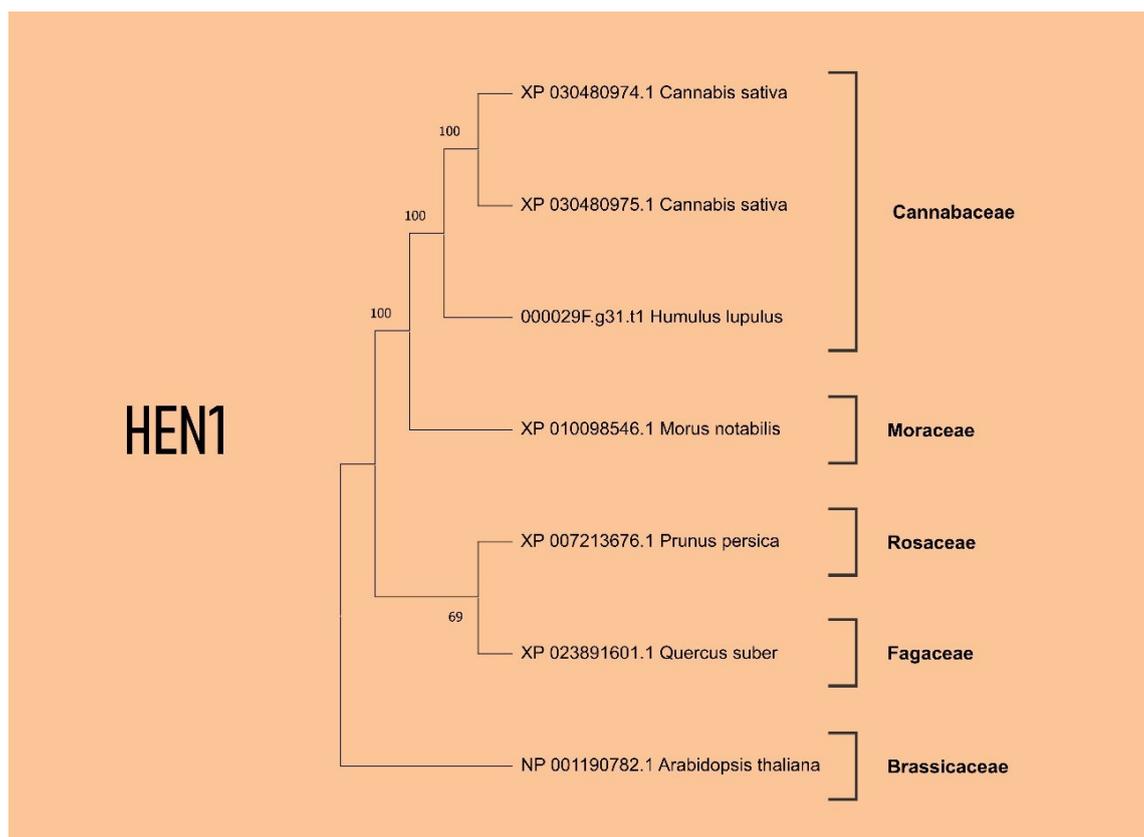


Figura 8- Árvore filogenética, construída pelo método “neighbour-joining”, modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) e bootstrap 2000 réplicas, representando a relação da proteína HEN1 encontrada em *H. lupulus* com suas ortólogas

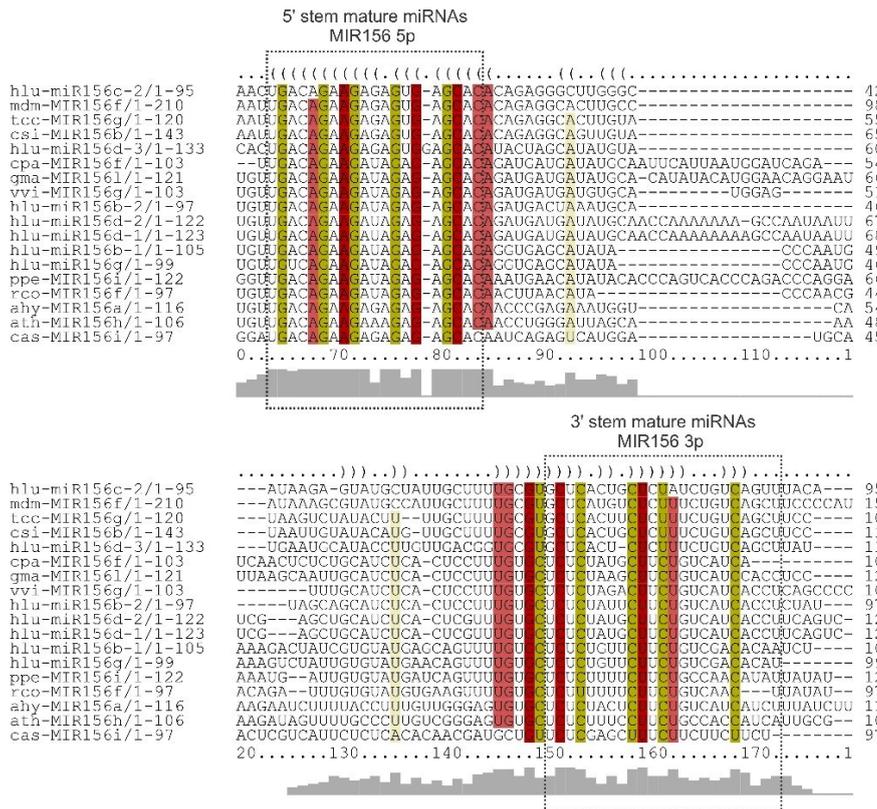
Predição de possíveis microRNAs precursores e maduros no lúpulo (*H. lupulus*)

A fim de entender o perfil dos microRNAs e sua conservação no lúpulo foi buscado a identificação de prováveis precursores e maduros. Após a aplicação do algoritmo, foram identificadas 140 sequências de prováveis precursores e 191

sequências de prováveis maduros, todas elas foram preditas em 3p e 5p e foram dispostas em 73 famílias (Tabela S4).

Foram escolhidas 5 famílias de microRNAs muito conservadas entre as plantas para a caracterização, foram elas MIR- 156, MIR-172, MIR -166, MIR-167 e MIR-390. O nível de conservação das sequências e estruturas dos microRNAs pertencentes a essas famílias em relação a espécies ortólogas revelou um alto nível de conservação, principalmente nas regiões dos maduros em 5p e 3p. Foi possível prever microRNAs maduros nas duas extremidades em todas as famílias (Figura 9 a 13).

a



b

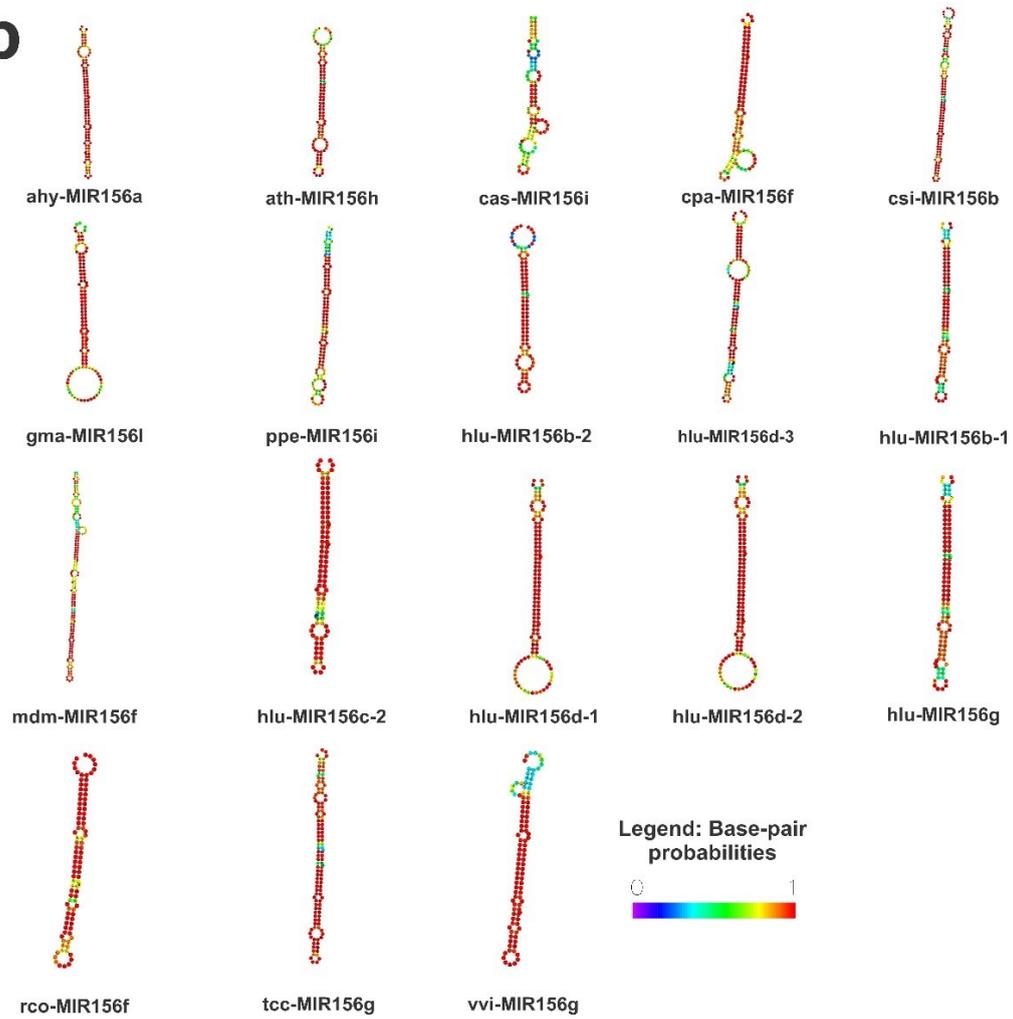
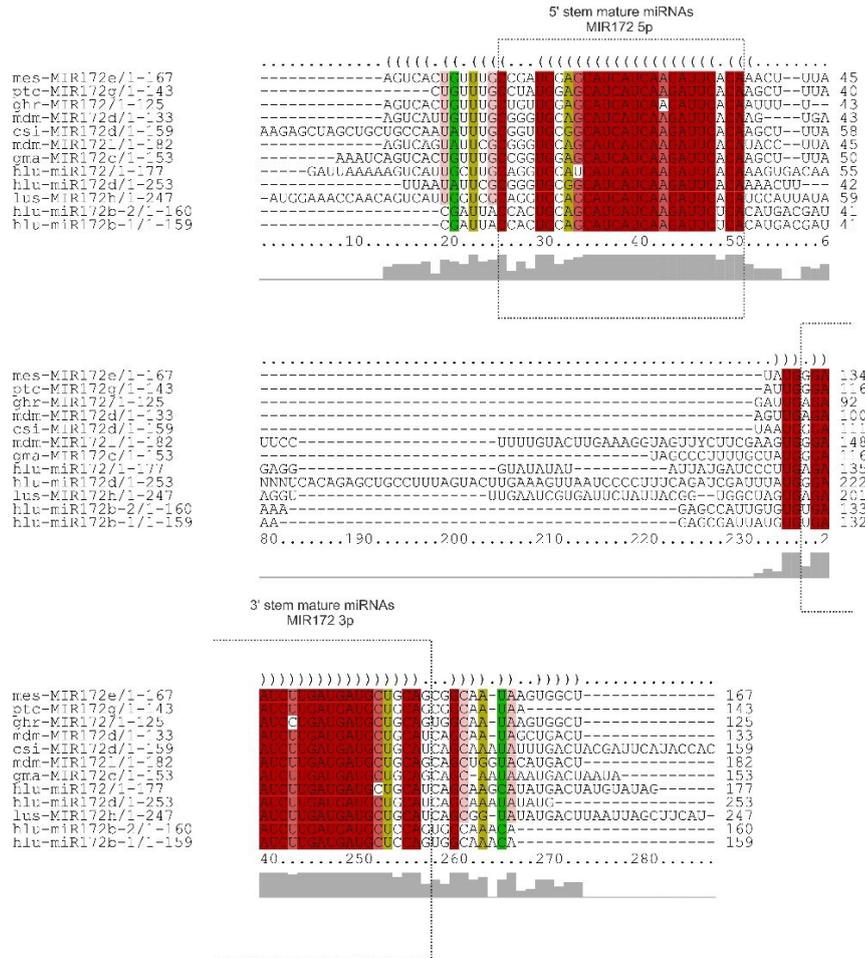


Figura 9- Alinhamento das estruturas primárias dos pre-miRNAs pertencentes a família 156 no lúpulo em comparação com miRNAs ortólogos (a). Comparação das estruturas secundárias dos pre-miRNAs do lúpulo com os ortólogos (b). Regiões conservadas nos maduros estão destacadas nas caixas. Coloração indica match nas regiões 3' e 5' e a probabilidade de pareamento de bases é indicada ao lado das estruturas secundárias. Hlu – *Humulus lupulus*, Mdm - *Malus domestica*, Tcc - *Theobroma cacao*, Csi - *Citrus sinensis*, Cpa - *Carica papaya*, Gma - *Glycine max*, Vvi - *Vitis vinífera*, Ppe - *Prunus pérsica*, Rco - *Ricinus communis*, Ahy - *Arachis hypogaea*, Ath - *Arabidopsis thaliana*, Cas - *Camelina sativa*.

a



b

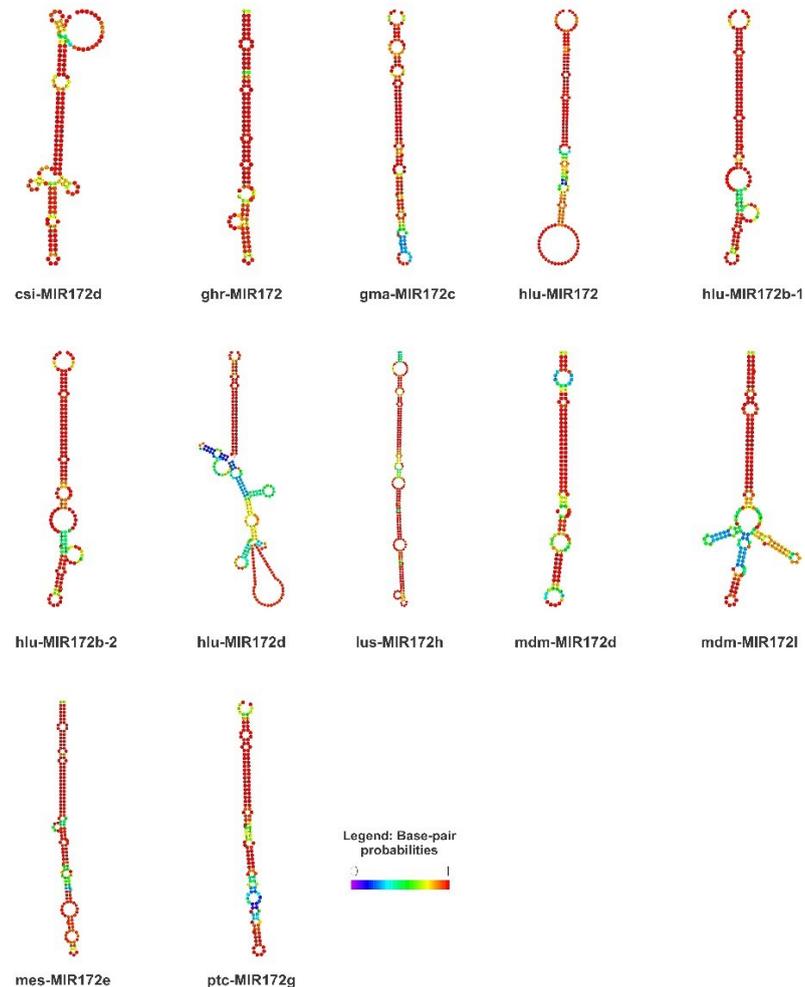


Figura 10- Alinhamento das estruturas primárias dos pre-miRNAs pertencentes a família 172 no lúpulo em comparação com miRNAs ortólogos (a). Comparação das estruturas secundárias dos pre-miRNAs do lúpulo com os ortólogos (b). Regiões conservadas nos maduros estão destacadas nas caixas. Coloração indica match nas regiões 3' e 5' e a probabilidade de pareamento de bases é indicada ao lado das estruturas secundárias. Mes - *Manihot esculenta*, Ptc - *Populus trichocarpa*, Ghr - *Gossypium hirsutum*, Mdm - *Malus domestica*, Gma - *Glycine max*, Hlu - *Humulus lupulus*.

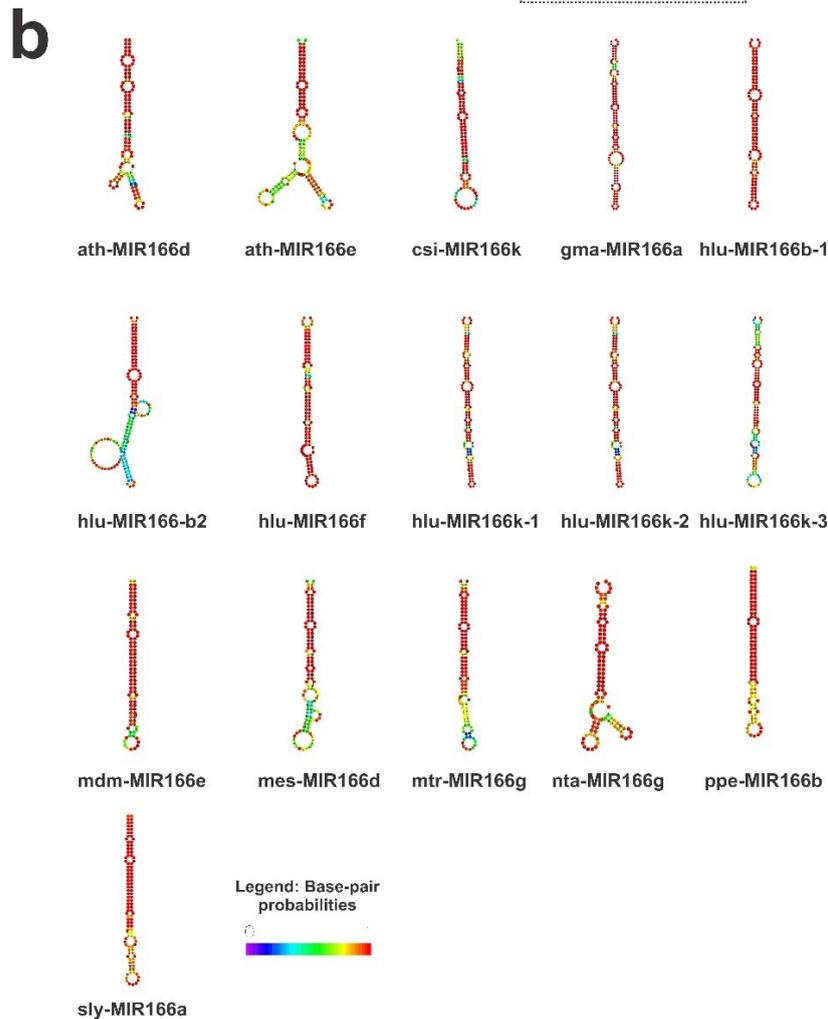
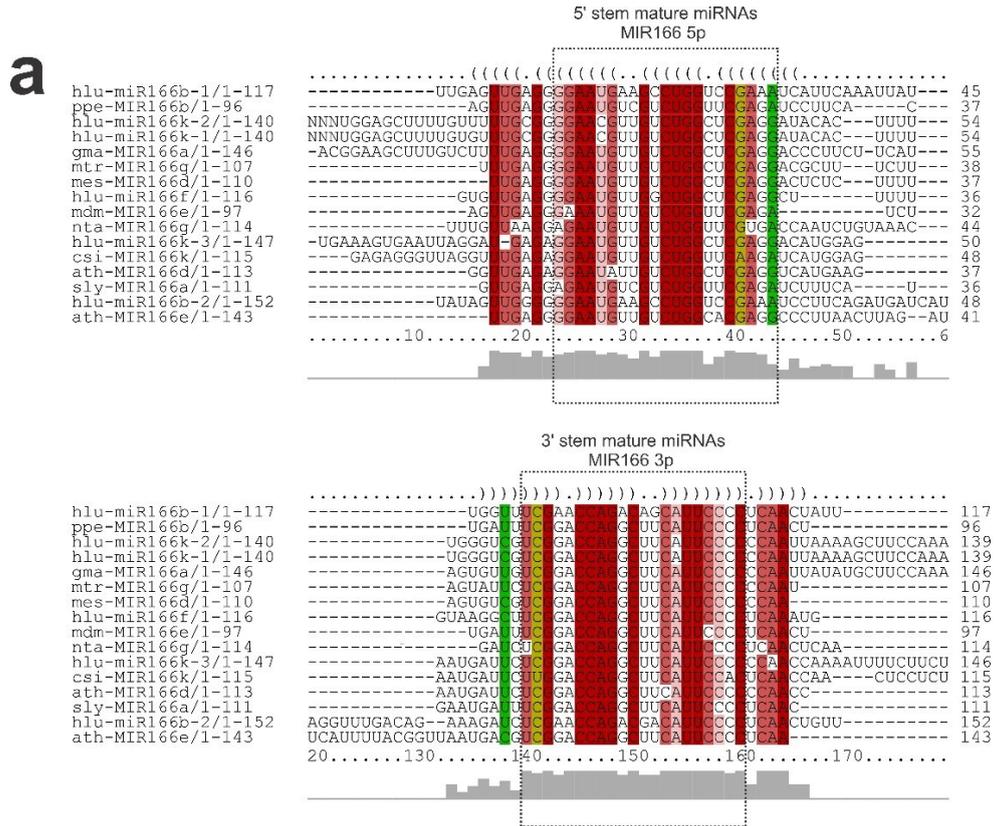
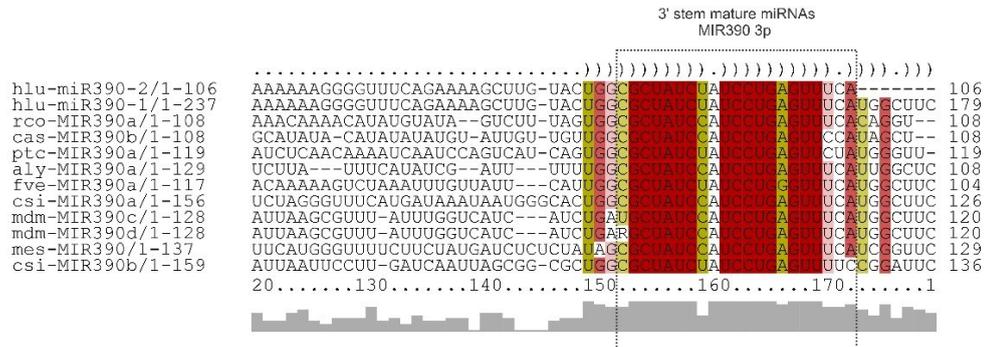
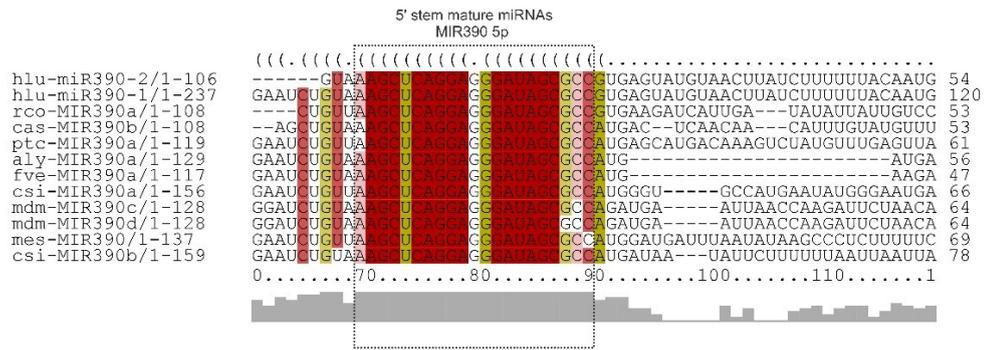


Figura 11- Alinhamento das estruturas primárias dos pre-miRNAs pertencentes a família 165/166 no lúpulo em comparação com miRNAs ortólogos (a). Comparação das estruturas secundárias dos pre-miRNAs do lúpulo com os ortólogos (b). Regiões conservadas nos maduros estão destacadas nas caixas. Coloração indica match nas regiões 3' e 5' e a probabilidade de pareamento de bases é indicada ao lado das estruturas secundárias. Hlu - *Humulus lupulus*, Ppe - *Prunus pérsica*, Gma - *Glycine max*, Mtr - *Medicago truncatula*, Mes - *Manihot esculenta*, Mdm - *Malus domestica*, Nta - *Nicotiana tabacum*, Csi - *Citrus sinensis*, Ath - *Arabidopsis thaliana*, Sly - *Solanum lycopersicum*.

Figura 12- Alinhamento das estruturas primárias dos pre-miRNAs pertencentes a família 167 no lúpulo em comparação com miRNAs ortólogos (a). Comparação das estruturas secundárias dos pre-miRNAs do lúpulo com os ortólogos (b). Regiões conservadas nos maduros estão destacadas nas caixas. Coloração indica match nas regiões 3' e 5' e a probabilidade de pareamento de bases é indicada ao lado das estruturas secundárias. Lja - *Lotus japonicus*, Gma - *Glycine max*, Nta - *Nicotiana tabacum*, Ppe - *Prunus pérsica*, Ptc- *Populus trichocarpa*, Tcc - *Theobroma cacao*, Hlu - *Humulus lupulus*, Zma - *Zea mays*, Cpa - *Carica papaya*, Mes - *Manihot esculenta*.

a



b

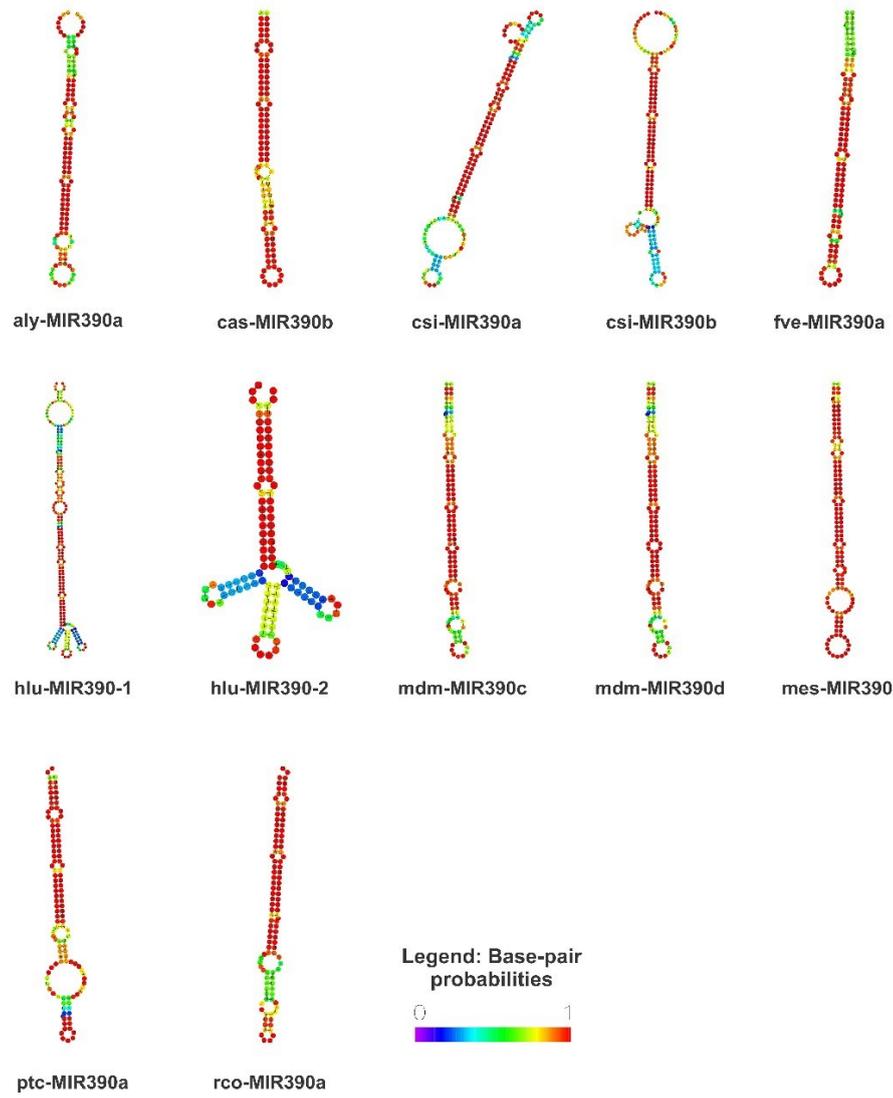


Figura 13- Alinhamento das estruturas primárias dos pre-miRNAs pertencentes a família 390 no lúpulo em comparação com miRNAs ortólogos (a). Comparação das estruturas secundárias dos pre-miRNAs do lúpulo com os ortólogos (b). Regiões conservadas nos maduros estão destacadas nas caixas. Coloração indica match nas regiões 3' e 5' e a probabilidade de pareamento de bases é indicada ao lado das estruturas secundárias. Hlu - *Humulus lupulus*, Rco - *Ricinus communis*, Cas - *Camelina sativa*, Ptc- *Populus trichocarpa*, Aly - *Arabidopsis lyrata*, Fve - *Fragaria vesca*, Csi - *Citrus sinensis*, Mdm - *Malus domestica*, Mes - *Manihot esculenta*.

Discussão

Proteínas Argonautas e Dicer: Conservação de domínios e sítios ativos

Para possibilitar um melhor entendimento a respeito da via de síntese dos sRNAs no lúpulo, bem como a conversação das proteínas e dos microRNAs nesse organismo em relação a espécies ortólogas, estudos a respeito dessas proteínas e dos microRNAs foram feitos neste trabalho. Os resultados sugerem que muitas proteínas da maquinaria celular da biogênese dos sRNAs, bem como muitos microRNAs, se encontram altamente conservadas também no lúpulo.

Todas as prováveis proteínas identificadas já foram apontadas e descritas em plantas, principalmente na espécie modelo *A. thaliana* (Pegler *et al.*, 2019). Baseado nessas proteínas de *A. thaliana* algumas delas já foram identificadas também em outras espécies como soja (*Glycine max*) e sorgo (*Sorghum Bicolor*) (Liu *et al.*, 2014). A ocorrência dessas proteínas em diversas espécies de plantas que muitas vezes são distantes evolutivamente entre si reforça a ideia da conservação dos componentes da

maquinaria de síntese dos sRNAs, bem como a importância dessas moléculas para diferentes organismos.

Os resultados obtidos pelas análises deste trabalho indicam que as prováveis proteínas componentes da via de biossíntese dos sRNAs no lúpulo estão bem conservadas em relação a sítios ativos e domínios apresentados e até mesmo em suas filogenias. Esse cenário foi mais evidente nas análises das classes proteicas escolhidas para a caracterização de Argonautas, Dicers, DRBs e HEN1, proteínas muito importantes para o funcionamento adequado da maquinaria celular de síntese dos sRNAs (Wang *et al.*, 2019). A identificação e caracterização dessas proteínas sugere que o mecanismo de síntese dos sRNAs no lúpulo é semelhante ao encontrado na espécie *A. thaliana*.

Foram identificadas 17 melhores prováveis proteínas pertencentes a família das Argonautas no lúpulo (*H. lupulus*). Dentre essas estiveram presentes proteínas menores que provavelmente são componentes de proteínas Argonautas maiores. A análise dos domínios conservados revelou a presença dos domínios PIWI, PAZ, ArgoN, ArgoL1, AegoL2 e ArgoMid o que está de acordo com a estrutura dessas proteínas que geralmente contam com a presença de quatro domínios principais (PIWI, PAZ, ArgoN e ArgoMid) (Müller *et al.*, 2020). Isso reforça a hipótese de que essas prováveis proteínas realmente fazem parte da família das Argonautas.

Kunej (Kunej *et al.*, 2021a) identificaram proteínas da via de síntese dos sRNAs em lúpulo em comparação com *C. sativa* e *M. notabilis*. Foram identificadas e depositadas as proteínas AGO1, AGO2 e AGO7, e entre os domínios conservados encontrados, todos foram observados neste trabalho, com exceção do domínio rico em glicina (Gly-rich-Argo1) na Argonauta um, que não foi encontrado neste estudo.

Já é de conhecimento que proteínas Argonautas apresentam em seu domínio PIWI, uma estruturação catalítica semelhante a proteínas que apresentam o domínio RNAase H, e nessa estruturação está presente a tríade de aminoácidos (aspartato-aspartato-histidina) DDH ou DDD (aspartato-aspartato-aspartato) (Mallory and Vaucheret, 2010). As prováveis proteínas 004559F.g23.t1, 000055F.g14.t1, 000648F.g11.t1, 000121F.g20.t1, 000121F.g13.t2, 000121F.g13.t1 exibiram a tríade de aminoácidos catalíticos DDH conservados em comparação com proteínas Argonautas de *A. thaliana* e *C. sativa* e aminoácidos vizinhos também estiveram altamente conservados.

As análises filogenéticas e alinhamentos globais sugerem que as proteínas previamente citadas que exibiram conservação dos sítios ativos, provavelmente são pertencentes aos grupos AGO2, AGO6, AGO7 e nenhuma das prováveis proteínas pertencentes ao clado AGO1 e AGO4 exibiu sítio ativo, possivelmente por serem fragmentos de uma proteína maior. Foi possível observar correlação entre os grupos AGO1 e AGO10, AGO4 e AGO6, AGO2 e AGO7, sendo todos esses grupos correlatos pertencentes aos mesmos cladogramas de Argonautas (Mallory and Vaucheret, 2010).

O alto nível de conservação dos domínios e sítios ativos observado nas prováveis proteínas Argonautas do lúpulo em comparação com *A. thaliana* e *C. sativa* indica a importância dessas proteínas também para o lúpulo e possível similaridade na catálise delas na síntese dos sRNAs, necessitando de uma melhor investigação principalmente naquelas que se encontram fragmentadas.

Outra família importante de proteínas envolvidas na via de biossíntese dos sRNAs foi identificada e caracterizada no lúpulo, as proteínas Dicer (Fukudome and Fukuhara, 2017). Neste trabalho foram identificadas 12 prováveis proteínas pertencentes a essa família. Sabe-se que as proteínas pertencentes a essa família

participam do processamento dos sRNAs por meio de clivagens que elas são capazes de fazer oriundas de domínios catalíticos. São conhecidos seis principais domínios que ocorrem nessas proteínas em plantas, animais e fungos, embora nem todas elas apresentem todos eles, são eles os domínios DExD- helicase, Helicase-c, Dicer-dimer, Paz, RNAaseIII e domínio de ligação ao RNA dupla fita (dsRB) (Margis *et al.*, 2006).

Quase todos esses domínios foram visualizados nas 12 proteínas de maneira semelhante as proteínas ortólogas encontradas em *A. thaliana* e *C. sativa*, sugerindo que elas realmente pertencem a família das Dicers e que suas funções estão conservadas no lúpulo. Kunej (Kunej *et al.*, 2021a) identificaram e depositaram as proteínas DCL1 e DCL4 de lúpulo, que apresentaram os domínios DEXHC, Helicase-c, Dicer-dimer, PAZ, dois domínios Ribonuclease III e um domínio DSRM, muitos desses estiveram presentes nas proteínas do lúpulo identificadas no presente trabalho. Esses resultados corroboram com a hipótese de as proteínas serem de fato pertencentes a família das Dicer.

Sabe-se que o domínio Ribonuclease_3 apresenta uma téttrade de aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica da proteína que é a EDDE (glutamato-aspartato-apartato-glutamato) e essa estruturação já foi evidenciada em proteínas da família Dicer pertencentes a outras espécies (Ji., 2008). No presente trabalho foi possível identificar a presença desse conjunto de aminoácidos catalíticos conservados em algumas das prováveis proteínas que foram as 002752F.g24.t6, 002752F.g24.t2, 002752F.g24.t1, 002752F.g24.t3, 002774F.g7.t1, 004436F.g1.t1, 000794F.g20.t3, 000794F.g20.t4, 002037F.g10.t1, 002037F.g10.t2. Entretanto as proteínas 002752F.g24.t6, 002752F.g24.t2, 002752F.g24.t1, 002752F.g24.t3, 004436F.g1.t1, 000794F.g20.t3, 000794F.g20.t4 exibiram apenas um domínio Ribonuclease_3 que teve a presença de uma téttrade apenas, sendo que em 004436F.g1.t1 o primeiro aminoácido (E) não esteve

presente, o que pode afetar a atividade catalítica da provável proteína. A presença de apenas um domínio com os aminoácidos nas proteínas citadas acima, evidencia que elas realmente podem ser fragmentos de uma Dicer maior, logo a outra tétrede de aminoácidos estaria representada em outro fragmento. Há a necessidade de reunir esses prováveis fragmentos em proteínas completas em trabalhos futuros.

A conservação dos domínios e aminoácidos catalíticos nas prováveis proteínas do lúpulo em relação a ortólogas de *A. thaliana* e *C. sativa* indica a importância dessas proteínas para o lúpulo e sugere que a catálise delas ocorrem de maneira semelhante nos diferentes organismos. As análises filogenéticas realizadas por meio das sequências dos aminoácidos das prováveis proteínas DCLs do lúpulo e das espécies ortólogas revelaram que as proteínas foram distribuídas em grupos distintos de proteínas Dicer que foram DCL1, DCL2, DCL3 e DCL4.

Os grupos de DCL2 e DCL4 foram mais próximos entre si em relação aos grupos de DCL3 e DCL4. Sabe-se que as DCL1 são majoritariamente responsáveis pela síntese dos miRNAs, enquanto as DCL2, DCL3 e DCL4 estão prioritariamente envolvidas com a síntese de outros sRNAs e que as DCL2 e DCL4 possuem funções redundantes no processamento dos sRNAs já evidenciadas em *A. thaliana* (Qin et al., 2017). Isso pode explicar a maior correlação entre as DCL2 e 4 em relação aos demais grupos.

Proteínas DRBs e HEN1

Treze potenciais proteínas de ligação ao RNA dupla fita (DRBs) de lúpulo foram identificadas e analisadas quanto a conservação de seus domínios. Os resultados sugeriram conservação de vários aminoácidos nos domínios de ligação ao RNA dessas

proteínas em relação as espécies ortólogas *A. thaliana* e *C. sativa*. As proteínas DRBs são muito importantes para a síntese de sRNAs em plantas e animais e elas possuem a função de trabalhar coordenadamente com as DCLs para selecionar os alvos de RNAs duplas fitas, que serão processados para o complexo RISC. Elas se encontram bastante conservadas em animais e plantas (Dias *et al.*, 2017).

Essa família de proteínas conta com dois ou três motivos de ligação ao RNA (dsrm) que possibilitam a ligação ao RNA ou a interação do tipo proteína – proteína (Dias *et al.*, 2017). Todas as prováveis proteínas identificadas no lúpulo exibiram dois motivos de ligação os quais apresentaram diversos aminoácidos conservados em relação as DRBs das espécies ortólogas *A. thaliana* e *C. sativa*.

Esse estado conservado evidenciado sugere a importância dessas proteínas para as plantas, que as proteínas identificadas realmente são pertencentes da família das DRBs e que o mecanismo de ação dessas proteínas é semelhante entre os diferentes organismos. Os aminoácidos mais conservados entre as estruturas das DRBs evidenciados pelo alinhamento global possivelmente são importantes para as interações com o RNA ou do tipo proteína-proteína previamente citadas.

Clavel (Clavel *et al.*, 2016) realizaram análises filogenéticas de história evolutiva de proteínas DRBs em *A. thaliana* que possibilitaram a divisão dessas proteínas em clados diferentes. O primeiro deles foi o clado das DRBs1, o segundo foi composto por proteínas DRBs 2/3 e 5, o terceiro é composto por proteínas DRBs 4 e o quarto por proteínas DRB6. Todas elas exibiram pequenas diferenças estruturais que possibilitaram essa divisão.

As análises filogenéticas feitas, por meio das sequências dos aminoácidos das prováveis proteínas DRBs do lúpulo, em relação as ortólogas, corroboram em parte com esses resultados. Os resultados evidenciaram maior correlação entre as proteínas DRBs

2, 3 e 5 em relação as DRBs 4 e 1, as quais foram mais distantes por serem pertencentes a clados distintos. Os clados DRBs 4 e 1 aparentemente estão mais próximos entre si em relação ao outro clado. Futuras análises podem ser necessárias para confirmação da proximidade evolutiva dessas proteínas.

Foi identificado uma provável proteína HEN1 pertencente ao lúpulo, a qual foi analisada quanto aos domínios conservados e aminoácidos importantes para a catálise. A proteína metiltransferase 2-O-de pequenos RNAs (HEN1) é responsável por catalisar a transferência de um radical metil do substrato S- adenosil- L- metionina para a hidroxila 2' (2' OH) da extremidade 3' terminal de duplexes de miRNA/miRNA* e de siRNA/siRNA* (Baranauskė et al., 2015). Já são conhecidos domínios conservados que estão presentes na proteína HEN1 de *A. thaliana*: dsRBD1, dsRBD1, domínio metil transferase (MTase) e domínio C- terminal (Tkaczuk *et al.*, 2006; Vilkaitis *et al.*, 2010).

A proteína 000029F.g31.t1 exibiu os domínios C-terminal (Hen1_Lam_C), dsRBD2 e domínio metiltransferase (Methyltransferase domain), os mesmos presentes nas espécies ortólogas *A. thaliana* e *C. sativa*. Os resultados sugerem que a proteína identificada no lúpulo é uma provável proteína HEN1 e que a conservação dos domínios nessa proteína é muito importante para a catálise e transferência do radical ao longo das diferentes espécies.

É conhecido que a tríade de aminoácidos nas posições Glu - 776 – Glu -779 -His 780 é responsável por interagir com o íon Mg^{2+} . Essa interação é de vital importância para a catálise da enzima e êxito na transferência do radical (Huang *et al.*, 2009). Nesse trabalho esses aminoácidos foram encontrados conservados em posições diferentes entre as proteínas ortólogas e a possível proteína HEN1 do lúpulo. Os aminoácidos próximos também estiveram altamente conservados, o que reforça a importância dessa sequência

para a enzima e sugere alta conservação dela ao longo das espécies vegetais, sendo esses possivelmente componentes do sítio ativo da proteína.

Análises filogenéticas foram feitas com as sequências de aminoácidos da provável proteína e das proteínas das espécies ortólogas. Elas revelaram maior proximidade evolutiva com a espécie *C. sativa* e maior distanciamento com as demais, principalmente com a espécie *A. thaliana*. Esse cenário é coerente pelo fato de a espécie *C. sativa* pertencer a mesma família que o lúpulo e a *Arabidopsis* pertencer a uma família, mas distante em relação as demais (Vergara *et al.*, 2015).

Muitos microRNAs do lúpulo se encontram conservados

Por meio da aplicação do algoritmo proposto de Souza Gomes *et al.* (2011) foi possível identificar 140 sequências de possíveis miRNAs precursores e 191 possíveis sequências de miRNAs maduros dispostos em 77 famílias. Trabalhos prévios identificaram microRNAs em lúpulo como Mirsha *et al.* (2016) que identificou 116 sequências de miRNAs, sendo 67 conservadas e 49 novas a época pertencente a 40 e 49 famílias respectivamente (Mishra *et al.*, 2016). Foram encontrados mais miRNAs, representando um número maior de famílias, neste trabalho do que nos trabalhos prévios, evidenciando a eficácia do algoritmo adotado.

Já Kunej *et al.* (2021b) encontraram 56 miRNAs conhecidos e 43 inéditos, dentre esses 56 maduros pertenciam a 30 famílias conhecidas e 35 inéditas. Comparados aos trabalhos anteriores, a metodologia utilizada neste trabalho foi capaz de identificar um número maior de sequências de prováveis miRNAs. Entre as famílias identificadas estiveram presentes muitas que são conservadas no reino das plantas como: MIR156,

MIR171, MIR172, MIR166, MIR164, MIR167, MIR390 entre outras (Zhang *et al.*, 2006).

Também estiveram presentes miRNAs pertencentes a famílias que possuíam apenas um depósito no miRBase (v22.1) correspondente a uma única espécie, como é o caso da MIR10188, que possuía apenas gma-MIR10188 como correspondente e MIR10420 com gma-MIR10420 (Arikiti *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). As famílias MIR156, MIR172, MIR166, MIR167 e MIR390 são conhecidas por serem conservadas e já foram identificadas em diversas espécies de plantas (Zhang *et al.*, 2006).

A família 156 é uma das mais conhecidas e estudadas entre as plantas e já se sabe que ela tem papel importante na regulação de importantes processos biológicos como desenvolvimento, respostas imunes contra patógenos, regulação metabólica e estresse abiótico (Jeyakumar *et al.*, 2020). Já a família 172 esteve ligada a funções importantes como regulação do tamanho do meristema, iniciação de tricomas, alongamento de caule, ramificação de rebentos e capacidade floral (Lian *et al.*, 2021).

A família MIR165/166 teve sua importância ligada a processos regulatórios importantes para o desenvolvimento das plantas, como desenvolvimento de tecidos vasculares, formação dos meristemas e polaridade foliar (Jung and Park, 2007). A família MIR167 esteve associada a processos de regulações importantes, como a homeostase e sinalização de auxinas em *A. thaliana* e regulação da expressão de IAR3. Esse processo regulatório tem influência na codificação da enzima auxina-aminohidrolase, que afeta a conjugação desse hormônio a proteínas. Os processos de regulação de auxina mediados por MIR167 são muito conservados entre as plantas (Yao *et al.*, 2019).

A família MIR390 foi ligada a produção de siRNAs de ação trans 3 (TAS3), que tem função importante na regulação de genes codificantes de fator responsivo a auxina

(ARF), o qual tem papel crítico na sinalização mediada por auxina (Xia *et al.*, 2017). TAS3 é conhecido por ser altamente conservado em vários vegetais, o que evidencia a importância da família MIR390 para as plantas (Lu *et al.*, 2018). Além disso MIR390 teve sua função ligada a regulação de vários fatores de transcrição que regulam outras funções como diferenciação celular, outras vias de sinalização e desenvolvimento de meristemas (Pashkovskiy and Ryazansky, 2013).

Os alinhamentos globais mostraram que as estruturas primárias dos representantes das famílias MIR156, MIR172, MIR166, MIR167 e MIR390 estiveram bem conservadas no lúpulo em relação as espécies ortólogas respectivas. A conservação foi evidente na região dos maduros 5p e 3p, sendo possível prever os maduros nas duas regiões em todas as famílias. Isso pode não ocorrer, pois em muitos casos, nas espécies, apenas o maduro de uma das pontas é mantido e o outro é degradado, embora já tenha sido descrita a ocorrência das duas estruturas em algumas espécies (Choo *et al.*, 2014). As estruturas secundárias previstas para os membros dessas famílias também se mostraram bem conservadas em relação as ortólogas. Essa validação futura será necessária para confirmar as previsões e prever possíveis alvos.

Conclusão

É notória a importância do lúpulo (*H. lupulus*) para a sociedade e principalmente para a indústria cervejeira. As proteínas do presente trabalho apresentaram conservação em nível de sítio ativo e de domínios bem como os microRNAs em nível de estrutura primária e secundária. Sendo assim, os resultados do trabalho possibilitam um melhor entendimento acerca da via dos sRNAs no lúpulo e a conservação dos miRNAs nesse

organismo. Os resultados podem ser utilizados para o desenvolvimento de aplicações futuras que auxiliem a indústria cervejeira potencializando esse mercado.

Referências

Allison M and Hervé V (2010). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell* 22:3879-3889.

Almager C, Schönberger C, Martina G, Elke KA and Becker T (2014). *Humulus lupulus*—a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* 120:289-314.

Akihito F and Toshiyuki F (2017). Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research* 130:33-44.

Aron MB, Myra KD, Noreen RG, Shennan L, Farideh C, Lewis YG, Renata CG, Jane H, Marc G, David IH et al (2015). CDD: ncbi's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* 43:222-226.

Baohong Z, Xiaoping P, Charles HC, George PC, Todd AA (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal Wiley* 46:243-269.

Cheng Q, Bin L, Yaya F, Xian Z, Zhiming Y, Eugene R, Mei Z, Hui W, Nongnong S, Pengcheng Z et al (2017). Roles of Dicer-Like Proteins 2 and 4 in Intra- and Intercellular Antiviral Silencing. *Plant Physiology* 174:1067-1081.

Daniela V, Krisin HW, Kyle GK and Nolan CK (2015). The complete chloroplast genomes of *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *Mitochondrial Dna Part A* 27:3793-3794.

Elisabetta G, Luca F, Francesco F, Anita H, Mara L, Silvia L, Sauro S, Claudia B, Silvia G, Stefania S et al (2017). A survey on pests and diseases of Italian Hop crops. *Italus Hortus* 24:1-17.

Francesco R, Giuseppe V, Paolo L, Nicolò J, Roberto R and Maria EP (2021). Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the Mediterranean region of Europe: Challenges and opportunities of their cultivation. *Agriculture* 11:484.

Giedrius V, Alexandra P and Saulius K (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: the catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA* 16:1935-1942.

Heng L, Long W, Ning M, Chuan MZ, Lian H, Tian QZ, Jia WW (2021) Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLoS Biol* 19: e3001044

Helena K and Maria P (2021). Hop (*Humulus lupulus* L.): traditional and present use, and future potential. *Economic Botany* 75:302-322.

Jae HJ and Chun MP (2007). MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. *Planta* 225:1327-1338.

Jonh MJJ, Asif A, Wen MW and Muthu T (2020). Characterizing the role of the miR156-SPL Network in Plant Development and Stress Response. *Plants* 9:1206

Joseph LP, Christopher PLG and Andrew LE (2019). The plant microRNA pathway: The production and action stages. *Methods in molecular biology* 1932:15-39.

Kahori T, Kosuke F, Yuka W, Asako S, Nobuto S, Masaru T and Akio K (2010). Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals. *BMC genomics* 11:1-13.

Karolina LT, Agnieszka O and Janusz MB (2006). Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis. *BMC evolutionary biology* 6:1-16.

Koichiro T, Daniel P, Nicholas P, Glen S, Masatoshi N and Sudhir K (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology And Evolution* 28:2731-2739.

Kong BC, Yuen LS, Phang NNN, Michele SYH and Chi JH (2014). MicroRNA-5p and-3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *Journal of biomedical Science* 21:1-14.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

Madlen M, Francesco F and Constance C (2020). Argonaute proteins: from structure to function in development and pathological cell fate determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*: 360.

Marion C, Thierry P, Thomas M, Marie AT, Marie NPP, Julie D, Viviane J, Patrice D, Cécile BA and Jean MD (2016). Evolutionary history of double-stranded RNA binding proteins in plants: identification of new cofactors involved in easirna biogenesis. *Plant Molecular Biology* 91:131-147.

Matheus SG, Mohan KM, Sávio GC, Renata GS and Charles S (2011). Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics* 98:96-111.

Meixia Z, Blake CM, Chunmei C, Wei X and Jianxin M (2015). Evolutionary Patterns and Coevolutionary Consequences of MIRNA Genes and MicroRNA Targets Triggered by Multiple Mechanisms of Genomic Duplications in Soybean. *The Plant Cell* 27:546-562.

- Naruya S and Masatoshi N (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and Evolution* 4:406-425.
- Pashkovskiy PP and Ryazansky SS (2013). Biogenesis, evolution, and functions of plant microRNAs. *Biochemistry (Moscow)* 78:627-637.
- Paul PG, Jennifer D, Jonh GT, Eric PN, Diana LK, Stinus L, Adam CK, Robert DF, Sam GJ, Sean RE and Alex B (2009). Rfam: updates to the rna families database. *Nucleic Acids Research* 37:136-140.
- Raquel D, Austin M, Oralia K and Bryan K (2017). *Molecular biology and Evolution* 34:1429-1444.
- Renato SD, Lucas MS, Stanislau BJ (2019). Química do lúpulo. *Química Nova* 42:900-919.
- Robert DF, Penelope C, Ruth YE, Sean RE, Jaina M, Alex LM, Simon CP, Marco P, Matloob Q, Amaia SV et al (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44:279-285.
- Roberto M, Alessandra C, Mauro S (2020). Cultivation trials of hop (*Humulus lupulus* L.) in semi-arid environments. *Heliyon* 6: e05114.
- Rogério M, Adriana FF, Neil AS, Shaun JC, John MW, Jean EF and Peter MW (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *Febs Letters* 580:2442-2450.
- Rui X, Jing X, Blake CM (2017). The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *The Plant Cell* 29:1232-1247.
- Siwaret A, Rui X, Atul K, Kun H, Jixian Z, Zhe Y, Oswaldo VP, Silvas P, Theresa AM, Henry TN et al (2014). An Atlas of Soybean Small RNAs Identifies Phased siRNAs from Hundreds of Coding Genes. *The Plant Cell* 26:4584-4601.
- Suzi T (2018). Hops. *Journal Of Agricultural & Food Information* 19:9-20.
- Urban K, Jernej J, Sebastian R and Nataša S (2021). Identification and Characterization of *Verticillium nonalfalfae*-Responsive MicroRNAs in the Roots of Resistant and Susceptible Hop Cultivars. *Plants* 10:1883.
- Urban K, Jernej J, Sebastian R and Nataša S (2021). Core RNA Interference Genes Involved in miRNA and Ta-siRNA Biogenesis in Hops and Their Expression Analysis after Challenging with *Verticillium nonalfalfae*. *International Journal Of Molecular Sciences* 22:4224.
- Xiang L, Yongchao DBY and Chi Z (2014). Identification of RNA silencing components in soybean and sorghum. *BMC bioinformatics* 15:1-13.
- Xiaozhen Y, Jilin C, Jie Z, Hanchuanzhi Y, Chennan G, Min Z, Xiuhua G, Xinhua D, Zhong NY, Yunde Z (2019). An Essential Role for miRNA167 in Maternal Control of Embryonic and Seed Development. *Plant Physiology* 180:453-464.
- Xinhua Ji (2008). The Mechanism of RNase III Action: how dicer dices. *Rna Interference* 99-116.

Ying H, Lijuan J, Quichen H, Dimitri GV, Xuemei C and Jin BM (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461:823-827.

Yuzhu L, Zhen F, Xuanyu L, Liying B, Hong X, Changlun Z, Kirankumar SM and Jiansheng L (2018). MiR393 and miR390 synergistically regulate lateral root growth in rice under different conditions. *BMC plant biology* 18:1-12.

Weizhong L, Andrew C, Mahmut U, Tamer G, Hamish M, Silvano S, Young MP, Nicola B and Rodrigo L (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research* 43:580-584.

Recursos de Internet

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST+), <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/execuTables/blast+/LATEST> (Acesso em 1 de fevereiro 2022).

CDD, Conserved Domains and Protein Classification, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Acesso em 17 de março 2022)

HopBase, A resource for hop genomics. Search HopBase for annotations and alignments., <http://hopbase.cgrb.oregonstate.edu/> (Acesso em 20 de janeiro 2022).

MirBase, the microRNA database, <https://www.mirbase.org/> (Acesso em 1 de março 2022).

PFAM, <https://pfam.xfam.org/> (Acesso em 20 de março 2022).

RepeatMasker, <http://www.repeatmasker.org> (Acesso em 9 de março 2022).

RNAalifold, WebServer, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (Acesso em 15 de março 2022).

Material suplementar

Tabela S1: Nomes das proteínas chaves, IDs e tamanho das proteínas encontradas no lúpulo e suas ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*

Nome da proteína	ID Arabidopsis	Tamanho (aa)	ID Cannabis Sativa	Tamanho (aa)	ID Humulus lupulus	Tamanho (aa)
AGO1	NP_001185169.1	1050	XP_030498573.1	1072	001231F.g8.t1	394
					004766F.g6.t1	469
					006768F.g9.t3	250
					006768F.g9.t1	248
AGO2	NP_174413.2	1014	XP_030480123	1021	000121F.g13.t2	503
					000121F.g13.t1	490
					000121F.g20.t1	992
AGO5	NP_850110.1	997	XP_030482070	851	005113F.g24.t1	369
					004559F.g23.t1	964
					005113F.g24.t2	533
					005113F.g21.t1	373
					000281F.g25.t1	396
AGO6	NP_180853.2	878			002333F.g2.t1	468
					000055F.g14.t1	906
AGO7	NP_177103.1	990	XP_030479875.1	1034	000648F.g11.t1	1031
					001670F.g16.t1	420
					001670F.g17.t1	211
DCL1	NP_171612.1	1909	XP_030489429	1952	002752F.g24.t2	333
					002752F.g24.t1	384

					002752F.g24.t6	850
					002752F.g24.t3	1725
					002752F.g24.t4	1335
					002752F.g24.t5	1349
DCL2	NP_001327050.1	1175	XP_030506126	1389	002774F.g7.t1	1403
					004436F.g1.t1	1260
DCL3	NP_001154663.2	1570			002037F.g10.t1	834
					002037F.g10.t2	1644
DCL4	NP_197532.3	1702	XP_030510343.1	1641	000794F.g20.t3	570
			XP_030510344.1	1406	000794F.g20.t4	346
DRB1	NP_563850.1	419	XP_030501104.1	355		
					004957F.g14.t2	347
					001395F.g79.t2	347
					004957F.g14.t1	354
					001395F.g79.t1	354
DRB2	NP_565672.1	434	XP_030504214.1	417	000140F.g36.t1	159
DRB3	NP_001030779.2	359	XP_030485112.1	422	001470F.g12.t1	422
					001470F.g12.t2	432
					002012F.g19.t1	423
DRB4	NP_001154686.1	329	XP_030508136.1	318	006183F.g6.t1	392
					006183F.g6.t2	418
					006183F.g6.t5	250
					006183F.g6.t4	832
DRB5	NP_198923.2	393			002098F.g15.t1	547
HEN1	NP_001190782.1	942	XP_030480975.1	939	000029F.g31.t1	923
SERRATE	NP_565635.1	720	XP_030489561.1	699	001213F.g17.t2	381
					001213F.g17.t1	510
					001213F.g17.t3	320
					000616F.g36.t1	314

Tabela S2: Nomes das proteínas acessórias, IDs e tamanho das proteínas encontradas no lúpulo e suas ortólogas pertencentes a *A. thaliana* e *C. sativa*

Nome da proteína	ID Arabidopsis	Tamanho (aa)	ID Cannabis Sativa	Tamanho(a a)	ID Humulus lupulus	Tamanho (aa)
HST1	NP_187155.2	1202	XP_030504610.1	1194	004843F.g4.t1	1194
EXPO1A	NP_001190324.1	1060	XP_030502036.1	1076	002098F.g18.t1	1190
					010104F.g1.t1	791
					002066F.g12.t1	280
					004603F.g18.t1	576
					005225F.g4.t1	251
RACK1A	NP_173248.1	327			001673F.g12.t1	275
					000218F.g73.t1	328
					003864F.g6.t1	328
HSP90-1	NP_200076.2	700			000817F.g17.t1	699
					003317F.g12.t1	497
					006012F.g9.t1	463
					002189F.g3.t1	820
					002563F.g3.t1	650
					006012F.g7.t1	294
					006012F.g6.t1	246
CYP40 (SQN)	NP_565381.1	361	XP_030486621.1	361	003317F.g8.t1	237
					003139F.g4.t1	361
					002929F.g2.t1	361
					000115F.g62.t1	174
KETCH1(emb2734)	NP_197483.1	1116			008126F.g5.t1	174
					002405F.g20.t1	1129
					002405F.g20.t2	1150
					005166F.g9.t1	875
CBP20	NP_001078705.1	257	XP_030484301.1	251	005166F.g9.t2	896
					000005F.g113.t2	169

			000005F.g113.t1	136
			000005F.g113.t3	133
			000005F.g114.t1	162
CBP80	NP_565356.1	848	005879F.g2.t3	371
			005879F.g2.t5	346
			005879F.g2.t6	277
			005879F.g1.t1	779
			005879F.g1.t2	837

Tabela S3- Nomes das proteínas, ID, valor de *e-value* e identidade resultante do Blast das proteínas de *H. lupulus* contra *A. thaliana*, ID da proteína do lúpulo no banco de dados HopBase, coordenadas das proteínas no banco de dados HopBase, campos em branco correspondem a proteínas cuja coordenadas não são fornecidas pelo banco de dados.

Nome da proteína	ID arabidopsis	Blast (e-value) vs <i>A. thaliana</i>	Identidade/ cobertura	<i>H. lupulus</i> ortólogo	Coordenadas de localização
AGO1	NP_001185169.1	1 ^{e-87}	145/239 (61%) /60.66%	001231F.g8.t1	001231F:446945.45 0330
		2 ^{e-79}	127/185 (69%) /39.44%	004766F.g6.t1	004766F:209033.21 6555
		3 ^{e-102}	160/224 (71%) /89.6%	006768F.g9.t3	006768F:183763.18 5671
		1 ^{e-118}	180/239 (75%) /96.37%	006768F.g9.t1	
AGO2	NP_174413.2	2 ^{e-135}	222/494 (45%) /98.21%	000121F.g13.t2	000121F:840117.84 2461
		4 ^{e-133}	211/446 (47%) /91.02%	000121F.g13.t1	
		0.0	483/996 (48%) /100%	000121F.g20.t1	000121F:1099842.1 104985
AGO5	NP_850110.1	4 ^{e-94}	153/251 (61%) /68%	005113F.g24.t1	
		0.0	535/920 (58%) /95.43%	004559F.g23.t1	004559F:295866.30 1918
		2 ^{e-154}	232/407 (57%) /76.36%	005113F.g24.t2	005113F:208934.21 2364
		3 ^{e-92}	156/302 (52%) /80.96%	005113F.g21.t1	005113F:187224.19 0067

		3 ^{e-126}	190/366 (52%) /92.42%	000281F.g25.t1	000281F:676479.67 8916
		6 ^{e-129}	215/454 (47%) /97%	002333F.g2.t1	002333F:168852.17 1669
AGO6	NP_1808 53.2	0.0	551/884 (62%) /97.57%	000055F.g14.t1	000055F:468418.47 5622
AGO7	NP_1771 03.1	0.0	633/906 (70%) /87.87%	000648F.g11.t1	000648F:314047.31 8022
		2 ^{e-126}	186/268 (69%) /63.81%	001670F.g16.t1	001670F:488004.49 0152
		3 ^{e-95}	140/193 (73%) /91.47%	001670F.g17.t1	001670F:490214.49 1926
DCL1	NP_1716 12.1	4 ^{e-174}	260/327 (80%) /98.20	002752F.g24.t2	
		0.0	305/382 (80%) /99.48%	002752F.g24.t1	
		0.0	635/845 (75%) /99.41%	002752F.g24.t6	
		0.0	1263/1727(73 %) /100%	002752F.g24.t3	002752F:350749.36 0693
		0.0	941/1309 (72%) / 98.05%	002752F.g24.t4	
		0.0	941/1323 (71%) /98.07%	002752F.g24.t5	
DCL2	NP_0013 27050.1	0.0	663/1193 (56%) /85.03%	002774F.g7.t1	002774F:64195.728 91
		0.0	556/1191 (47%) /94.52%	004436F.g1.t1	004436F:64306.729 51
DCL3	NP_0011 54663.2	0.0	456/835 (55%) /100%	002037F.g10.t1	
		0.0	801/1636 (49%) /99.51%	002037F.g10.t2	002037F:88061.968 21
DCL4	NP_1975 32.3	0.0	309/539 (57%) /94.56%	000794F.g20.t3	000794F:479535.48 5242
		3 ^{e-150}	221/348 (64%) /100%	000794F.g20.t4	
DRB1	NP_5638 50.1	7 ^{e-94}	141/209 (67%) /60.23%	004957F.g14.t2	
		8 ^{e-94}	141/209 (67%) /60.23%	001395F.g79.t2	
		5 ^{e-93}	140/208 (67%) /58.76%	004957F.g14.t1	004957F:245091.24 7984
		6 ^{e-93}	140/208 (67%) /58.76%	001395F.g79.t1	001395F:572866.57 5623
DRB2	NP_5656	2 ^{e-106}	146/155 (94%)	000140F.g36.t1	000140F:1370266.1

		72.1	/97.48%	372384	
DRB3	NP_0010 30779.2	4 ^{e-104}	150/197 (76%) /46.68%	001470F.g12.t1	
		6 ^{e-100}	149/207 (72%) /47.92%	001470F.g12.t2	001470F:228333.23 0116
	4 ^{e-104}	150/197 (76%) /46.57%	002012F.g19.t1	002012F:249920.25 1851	
DRB4	NP_0011 54686.1	7 ^{e-53}	121/276 (44%) /70.41%	006183F.g6.t1	
		2 ^{e-52}	89/157 (57%) /37.56%	006183F.g6.t2	
		2 ^{e-52}	87/150 (58%) /60%	006183F.g6.t5	
		9 ^{e-49}	87/150 (58%) /60%	006183F.g6.t4	006183F:76126.826 90
DRB5	NP_1989 23.2	5 ^{e-94}	137/191 (72%) /60%	002098F.g15.t1	002098F:335391.33 8840
HEN1	NP_0011 90782.1	0.0	464/965 (48%) /100%	000029F.g31.t1	000029F:814785.82 2073

Tabela S4: Família dos microRNAs encontradas no lúpulo, nomes e tamanhos dos Pre-miRNAs, nomes, tamanhos, sequências e localizações dos maduros nos precursores. Identificação dos ortólogos, números de mismatches e gaps encontrados em relação a eles. LMNP: Localização do Maduro no precursor, NMO: Número de mismatches com o ortólogo, NGM: Número de gaps com o ortólogo.

Familia	Pre-miRNA	Tamanho	Maduro	Sequência do maduro	Tamanho do maduro	LMNP	Ortólogo do do maduro	NMO	NGO
Hlu-MIR8691	hlu-miR8691	121	hlu-miR8691-3p	AGAGCA UAAAGA AAGAAA GUCAAG	24	78-94	gra-miR8691	6	0
Hlu-MIR7752	hlu-miR7752	149	hlu-miR7752-3p	AAAAUG AUAGUU UGCAAA AACACG	24	109-132	bdi-miR7752-3p	3	0

HluMI R166	hlu- miR166b -2	152	hlu- miR166b -2-5p	GGGAAU GAAGCC UGGUCC GAAA	22	11-32	ata- miR16 6b-5p	2	0
	hlu- miR166f	116	hlu- miR166f -3p	UCGGAC CAGGCU UCAUUC CCCC	22	89-110	cas- miR16 6f-3p	0	0
			hlu- miR166f -5p	GGAAUG UUGGCU GGCUCG AGG	21	10-30	cas- miR16 6f-5p	2	0
	hlu- miR166k -3	147	hlu- miR166k -3-3p	UCGGAC CAGGCU UCAUUC CCCC	22	107-128	lus- miR16 6k	0	0
			hlu- miR166k -3-5p	GGAAUG UUGUCU GGCUCG AGG	21	22-42	osa- miR16 6k-5p	2	0
	hlu- miR166k -2	140	hlu- miR166k -2-3p	UCGGAC CAGGCU UCAUUC CCCC	22	100-121	lus- miR16 6k	0	0
	hlu- miR166k -1	140	hlu- miR166k -1-3p	UCGGAC CAGGCU UCAUUC CCCC	22	100-121	lus- miR16 6k	0	0
	hlu- miR166b -1	117	hlu- miR166b -1-5p	GGGAAU GAAGCC UGGUCC GAAA	21	11-32	ata- miR16 6b-5p	2	0
			hlu- miR166b -1-3p	UCGAAC CAGACA GCAUUC CCC	21	88-108	fve- miR16 6b	4	0
HluMI R393	hlu- miR393b	145	hlu- miR393b -3p	AUCAAU GCGAUC CCUUUG GA	20	101-120	zma- miR39 3b-3p	1	0
			hlu- miR393b -5p	UCCAAA GGGAUA GCAUGA UC	20	25-44	ath- miR39 3b-5p	5	0
	hlu- miR393	145	hlu- miR393- 5p	UCCAAA GGGAUC GCAUUG AUCC	22	26-47	cas- miR39 3-5p	0	0
			hlu- miR393- 3p	AUCAUG CUAUCC CUUUGG AUU	21	103-123	csi- miR39 3c-3p	0	0
HluMI R6170	hlu- miR6170	165	hlu- miR6170 -5p	CAAGAA ACAAAA GAGAGG GA	20	15-34	hbr- miR61 70	1	0
HluMI R172	hlu- miR172	177	hlu- miR172-	UGAGAA UCUUGA	23	131-153		0	0

			3p	UGAUGC UGCAU					
			hlu- miR172- 5p	GCAUCA UCAUCA AGAUGC A	19	26-44	bra- miR17 2c-5p	0	0
	hlu- miR172b -2	160	hlu- miR172b -2-5p	GCAGCA UCAUCA AGAUGC UCA	21	12-32	csi- miR17 2b-5p	1	0
			hlu- miR172b -2-3p	UGAAUC UUGAUG AUGCUC CA	20	131-150	vvi- miR17 2b	1	0
	hlu- miR172d	253	hlu- miR172d -5p	GCGGCA UCAUCA AGAUGC ACA	21	16-36		0	0
			hlu- miR172d -3p	GGAUUC UUGAUG AUGCUG CAU	21	220-240	csi- miR17 2d-5p bra- miR17 2d-3p	0	0
	hlu- miR172b -1	159	hlu- miR172b -1-5p	GCAGCA UCAUCA AGAUGC UCA	21	12-32	csi- miR17 2b-5p	1	0
			hlu- miR172b -1-3p	UGAAUC UUGAUG AUGCUC CA	20	130-149	vvi- miR17 2b	1	0
HluMI R1018 8	hlu- miR1018 8	162	hlu- miR1018 8-3p	UCUCUG AUUUUG CAGGUA UGGA	22	110-131	gma- miR10 188	2	0
HluMI R535	hlu- miR535- 2	104	hlu- miR535- 2-3p	GUGCUC UCUCUC GUUGUC A	19	77-95	vca- miR53 5-3p	0	0
HluMI R171	hlu- miR171a -1	113	hlu- miR171a -1-3p	UGAUUG AGCCGU GCCAAU AUC	21	76-96	aof- miR17 1a	0	0
			hlu- miR171a -1-5p	GGAUUAU UGGUCC GGUUCA AU	20	17-36	ptc- miR17 1a-5p	0	0
	hlu- miR171a -5	94	hlu- miR171a -5-3p	UGAUUG AGCCGC GCCAAU AUC	21	66-86	cas- miR17 1a-3p	0	0
			hlu- miR171a -5-5p	CAUUGG UGCGGU UUAACC	18	11-28	nta- miR17 1a	4	0
	hlu- miR171d -2	165	hlu- miR171d -2-3p	CGAGCC GAAUCA AUAUCA CUC	21	115-135	ppe- miR17 1d-3p	0	0
			hlu-	GUGAUA	21	36-56	ppe-	3	0

			miR171d -2-5p	UUGAUU UGGCUC AUA			miR17 1d-5p		
	hlu- miR171a -4	102	hlu- miR171a -4-3p	UUGAGC CGUGCC AAUAUC ACU	21	76-96	smo- miR17 1a	0	0
			hlu- miR171a -4-5p	UUGGCA AGGUUC AAUCUG A	19	14-32	zma- miR17 1a-5p	2	0
	hlu- miR171d -1	185	hlu- miR171d -1-3p	CGAGCC GAAUCA AUAUCA CUC	21	135-155		0	0
			hlu- miR171d -1-5p	GUGAUA UUGAUU UGGCUC AUA	21	36-56	ppe- miR17 1d-3p ppe- miR17 1d-5p	3	0
	hlu- miR171a -3	130	hlu- miR171a -3-3p	UGAUUG AGCCGU GCCAAU AUC	21	93-113	aof- miR17 1a	0	0
			hlu- miR171a -3-5p	UUGGCU CUGUUC ACUCAG A	19	23-41	cas- miR17 1a-5p	3	0
	hlu- miR171a -2	94	hlu- miR171a -2-3p	UGAUUG AGCCGC GCCAAU AUC	21	66-86	cas- miR17 1a-3p	0	0
	hlu- miR171b	110	hlu- miR171b -5p	GAUAUU GGCGCG GCUCAA UC	20	13-32	zma- miR17 1b-5p	1	0
HluMI R395	hlu- miR395a -3	131	hlu- miR395a -3-3p	UGAAGU GUUUGG GGGAAC UCU	21	94-114	aof- miR39 5a	0	0
			hlu- miR395a -3-5p	GUUUC UCGAAC ACUUCA	18	21-38	ppe- miR39 5a-5p	2	0
	hlu- miR395k	131	hlu- miR395k -3p	GUGAAG UGUUCG AGGAAA CUC	21	93-113	zma- miR39 5k-3p	1	0
			hlu- miR395k -5p	GUUCCC CCAAAC ACUUCA	18	21-38	mdm- miR39 5k	2	0
	hlu- miR395a -2	131	hlu- miR395a -2-3p	UGAAGU GUUUGG GGGAAC UCU	21	94-114	aof- miR39 5a	0	0
			hlu- miR395a -2-5p	GUUUC UCGAAC ACUUCA	18	21-38	mdm- miR39 5k	2	0
	hlu- miR395a -1	310	hlu- miR395a -1-5p	UUGAAG UGUUUG GGAGGA CU	20	61-80	cca- miR39 5a	1	0

	hlu-miR395c	123	hlu-miR395c-3p	UUGAAG UGUUUG GGGGAA CUC	21	83-103	cme-miR395c	0	0
			hlu-miR395c-5p	GUUCCU CUGAAG ACUUCA	18	23-40	bra-miR395c-5p	2	0
HluMI R399	hlu-miR399	208	hlu-miR399e-5p	GGGCUU CUCUUU CUUGGC A	19	60-78	zma-miR399e-5p	1	0
			hlu-miR399e-3p	UGCCAA AGGGGA GUUGCC CU	20	129-148	cme-miR399e	0	0
	hlu-miR399i-2	122	hlu-miR399i-2-3p	UGCCAA AGGAGA GUUGCC CUA	21	75-95	stu-miR399i-3p	0	0
	hlu-miR399i-1	150	hlu-miR399i-1-3p	UGCCAA AGGAGA GUUGCC CUA	21	103-123	stu-miR399i-3p	0	0
	hlu-miR399k	149	hlu-miR399k-3p	UGCCGA AGUAAU UUUGCG CC	20	120-139	osa-miR399k	4	0
	hlu-miR399b	164	hlu-miR399b-3p	UCUGCC AAAGGA GAAUUG CCC	21	125-145	ppe-miR399b	0	0
			hlu-miR399b-5p	GUGCAA UUCUCC UUUGGC A	19	20-38	aof-miR399b	1	0
HluMI R3637	hlu-miR3637	208	hlu-miR3637-3p	UUGAUG AAUUGU GUUUGU UCGG	22	94-115	vvi-miR3637-5p	4	0
HluMI R529	hlu-miR529b	172	hlu-miR529b-5p	AGAAGA GAGAGA GUACAG CUU	21	24-44	osa-miR529b	0	0
HluMI R8781	hlu-miR8781b	294	hlu-miR8781b-5p	UUUUAU UUGGAA GAUUGA GG	20	84-103	gra-miR8781b	3	0
HluMI R162	hlu-miR162	120	hlu-miR162-5p	UGGAGG CAGCGG UUCAUC GAUC	22	17-38	csi-miR162-5p	0	0
			hlu-miR162-3p	UCGAUA AACCUC UGCAUC CAG	21	87-107	fve-miR162-3p	0	0
HluMI R168	hlu-miR168	116	hlu-miR168-5p	AUUCAG UUGAUG CAAGGC GGGA	22	17-38	aau-miR168	0	0
			hlu-	UCCCGA	22	78-99	hvu-	3	0

			miR168-3p	CCUGCA CCAAGC GAAU			miR16 8-3p		
HluMI R169	hlu- miR169j- 2	260	hlu- miR169j- 2-5p	UAGCCA AGGAUG ACUUGC CUGC	22	47-68	ppe- miR16 9j	0	0
			hlu- miR169j- 2-3p	GGCAGU CUCCUU GGCUAU C	19	202-220	aly- miR16 9j-3p	0	0
	hlu- miR169c	260	hlu- miR169c -5p	UAGCCA AGGAUG ACUUGC CUA	21	64-84	ata- miR16 9c-5p	0	0
	hlu- miR169j- 1	234	hlu- miR169j- 1-5p	UAGCCA AGGAUG ACUUGC CUGC	22	43-64	ppe- miR16 9j	0	0
	hlu- miR169e -3	157	hlu- miR169e -3-5p	UGAGCC AAGGAU GACUUG CC	20	22-41	fve- miR16 9e	0	0
	hlu- miR169e -2	157	hlu- miR169e -2-5p	UGAGCC AAGGAU GACUUG CC	20	22-41	fve- miR16 9e	0	0
	hlu- miR169r	210	hlu- miR169r -5p	CAGCCA AGGAUG ACUUGC CGG	21	49-69	csi- miR16 9r-5p	0	0
	hlu- miR169a	112	hlu- miR169a -5p	CAGCCA AGGAUG ACUUGC CGA	21	9-29	cas- miR16 9a	0	0
			hlu- miR169a -3p	GGCAAG UUGGCC UUGGCU ACA	21	88-108	aly- miR16 9a-3p	1	0
	hlu- miR169i	196	hlu- miR169i- 5p	UGAGCC AAAAAU GACUUG CCG	21	52-72	mtr- miR16 9i	1	0
	hlu- miR169e -1	168	hlu- miR169e -1-5p	UAGCCA AGGAGA CUGCCU	18	30-47	zma- miR16 9e	0	0
HluMI R9560	hlu- miR9560 -3	89	hlu- miR9560 -3-3p	UCAUAU UUGAUC CACCGC CUGU	22	54-75	csi- miR95 60-3p	2	0
			hlu- miR9560 -3-5p	ACAGGC AGCGCA ACAAAU AUGAA	23	15-37	csi- miR95 60-5p	4	0
	hlu- miR9560 -2	196	hlu- miR9560 -2-3p	ACAGGU GGUCGA AAAAAU AUGA	22	123-144	cas- miR95 60	2	0
	hlu-	67	hlu-	UCAUAU	22	43-64	csi-	2	0

	miR9560 -1		miR9560 -1-3p	UUGAUC CACCGC CUGU			miR95 60-3p		
			hlu- miR9560 -1-5p	ACAGGC AGCGCA ACAAAU AUGAA	23	4-26	csi- miR95 60-5p	4	0
HluMI R5185	hlu- miR5185 a-1	279	hlu- miR5185 a-1-5p	UUUUUG UUCAUU UUUCCU	18	5-22	bdi- miR51 85a-5p	3	0
	hlu- miR5185 a-2	279	hlu- miR5185 a-2-5p	UUUUUG UUCAUU UUUCCU	18	5-22	bdi- miR51 85a-5p	3	0
HluMI R482	hlu- miR482e	161	hlu- miR482e -3p	UUGCCU AUUCCU CCCAUG CCAA	22	102-123	ppe- miR48 2e	0	0
HluMI R1151 3	hlu- miR1151 3	237	hlu- miR1151 3-3p	UUAAAU UCCUAG CGGGUC GGGG	22	72-93	pab- miR11 513	5	0
HluMI R1438	hlu- miR1438	208	hlu- miR1438 -3p	AGGGUA AUCUUA ACAUUU UUA	22	124-145	osa- miR14 38	2	0
HluMI R167	hlu- miR167h	87	hlu- miR167h -3p	AUCAUG CUGGCA GCUUCA ACU	21	60-80	gma- miR16 7h	0	0
	hlu- miR167j	172	hlu- miR167j- 5p	GAUCAU GUGGCA GUUUCA UU	20	43-62	zma- miR16 7j-3p	0	0
	hlu- miR167f	92	hlu- miR167f -5p	UGAAGC UGCCAG CAUGAU CUGC	22	11-32	ata- miR16 7f-5p	0	0
			hlu- miR167f -3p	AGAUCA UGUGGC AGUUUC A	19	64-82	ptc- miR16 7f-3p	0	0
	hlu- miR167a	92	hlu- miR167a -5p	UGAAGC UGCCAG CAUGAU CUA	20	11-31	aof- miR16 7a	0	0
			hlu- miR167a -3p	AGAUCA UGUGGC AGUUUC AU	21		vca- miR16 7a-3p	0	0
	hlu- miR167b	123	hlu- miR167b -3p	GGUCAU GCUGUG ACAGCC UCACU	23	86-108	cas- miR16 7b	0	0
			hlu- miR167b -5p	UGAAGC UGCCAG CAUGAU CUA	21	17-37	cpa- miR16 7b	0	0
HluMI R160	hlu- miR160g	88	hlu- miR160g -5p	UGCCUG GCUCCC UGUAUG	23	5-27	mes- miR16 0g	0	0

			hlu-miR160g-3p	CCAUC GCGUGC GAGGAG CCAUGC AUG	21	66-86	zma-miR160g-3p	2	0
HluMI R1877	hlu-miR1877-2	171	hlu-miR1877-2-5p	AGAUGA CAUGUC AAUGAU GUGG	22	32-53	osa-miR1877	2	0
			hlu-miR1877-2-3p	GAUGAC AUGUCA AUGAUG UGG	21	79-99	osa-miR1877	2	0
	hlu-miR1877-1	150	hlu-miR1877-1-5p	AGAUGA CAUGUC AAUGAU GUGG	22	44-65	osa-miR1877	2	0
HluMI R156	hlu-miR156d-3	133	hlu-miR156d-3-3p	GCUCAC UCUCUU UCUGUC A	19	88-106	cas-miR156d-3p	0	0
			hlu-miR156d-3-5p	UGACAG AAGAGA GUGGAG	18	25-42	pab-miR156d	2	0
	hlu-miR156b-2	97	hlu-miR156b-2-5p	UUGACA GAAGAU AGAGAG CAC	21	11-31	aof-miR156b	0	0
			hlu-miR156b-2-3p	GCUCUC UAUUCU UCUGUC AUC	21	69-89	vca-miR156b-3p	1	0
	hlu-miR156a	263	hlu-miR156a-3p	UGACAG AAGAGA GAGAGC ACA	21	183-203	tcc-miR156a	0	0
	hlu-miR156b-1	105	hlu-miR156b-1-5p	UUGACA GAAGAU AGAGAG CAC	21	9-29	aof-miR156b	0	0
			hlu-miR156b-1-3p	GCUCUC UGUUCU UCUGUC	18	78-95	vca-miR156b-3p	2	0
	hlu-miR156g	99	hlu-miR156g-5p	CAGAAG AUAGAG AGCACA G	19	10-28	gma-miR156g	0	0
			hlu-miR156g-3p	GCUCUC UGUUCU UCUGUC	18	75-92	csi-miR156g-3p	1	0
	hlu-miR156d-2	122	hlu-miR156d-2-3p	GCUCUC UAUGCU UCUGUC AUCA	22	92-113	stu-miR156d-3p	0	0
			hlu-miR156d-2-5p	UUGACA GAAGAU AGAGAG CAC	21	12-32	stu-miR156d-5p	0	0
	hlu-miR156d	123	hlu-miR156d	GCUCUC UAUGCU	22	93-114	stu-miR156d	0	0

	-1		-1-3p	UCUGUC AUCA			6d-3p		
			hlu- miR156d -1-5p	UUGACA GAAGAU AGAGAG CAC	21	12-32	stu- miR15 6d-5p	0	0
	hlu- miR156c	95	hlu- miR156c -3p	GCUCAC UGCUCU AUCUGU CAG	21	69-89	cas- miR15 6c-3p	0	0
			hlu- miR156c -5p	UGACAG AAGAGA GUGAGC ACA	21	8-28	rco- miR15 6c	0	0
HluMI R1054 1	hlu- miR1054 1	231	hlu- miR1054 1-5p	GCCACU UGGAUG AUAGGC AAA	21	58-78	sly- miR10 541	4	0
HluMI R9563	hlu- miR9563 a	292	hlu- miR9563 a-5p	UAAAAA UUUAGA GAAAAG UU	20	22-41	bra- miR95 63a-3p	3	0
HluMI R408	hlu- miR408	138	hlu- miR408- 5p	GAGCCA GGGAAG AGGCAG U	19	25-43	bra- miR40 8-5p	0	0
HluMI R6281	hlu- miR6281 -3p	280	hlu- miR6281 -3p	GAUAUA UAUAGA GAGAGU G	19	153-171	ppe- miR62 81	3	0
HluMI R8736	hlu- miR8736	297	hlu- miR8736 -5p	GUGAAA UGUGCU AAGAGA AAAA	22	127-148	gra- miR87 36	5	0
HluMI R1103 6	hlu- miR1103 6	239	hlu- miR1103 6-5p	UUUGGA GGCAUU UGAGGA UG	20	22-41	seu- miR11 036	3	0
HluMI R1516	hlu- miR1516 a-2	189	hlu- miR1516 a-2-3p	CAAGUU AUAAGC UUUUUU G	20	100-119	gma- miR15 16a-5p	1	0
	hlu- miR1516 a-1	332	hlu- miR1516 a-1-3p	CAAGUU AUGAGC UCUUUU GUGA	22	177-198	gma- miR15 16a-5p	2	0
HluMI R5752	hlu- miR5752 a	126	hlu- miR5752 a-3p	CAUUGU UGGGUU GAGUAG AA	20	65-84	mtr- miR57 52a	3	0
HluMI R1005 6	hlu-miR- 10056	305	hlu-miR- 10056-3p	UUUCCA AACAUU UUACCA UA	20	201-220	hpo- miR- 10056- 3p	1	0
HluMI R477	hlu- miR477e	165	hlu- miR477e -5p	ACUCUC CCUCAA GGGCUU CU	20	21-40	csi- miR47 7e-5p	0	0
HluMI R6287	hlu- miR6287	276	hlu- miR6287	AAAAAG UGAAAG	18	231-248	ppe- miR62	2	0

			-3p	UUUUGG			87		
HluMI R5049	hlu- miR5049 a	248	hlu- miR5049 a-3p	UCCUAA AUACUC GUAGUC U	19	163-181	hvu- miR50 49a	4	0
HluMI R2592	hlu- miR2592 b	392	hlu- miR2592 b-5p	AAAUGC UUGAGU GCUCUU GUU	21	126-146	mtr- miR25 92b-3p	2	0
HluMI R828	hlu- miR828b -2	144	hlu- miR828b -2-3p	UCUUGC UCAAAU GAGUAU UCCA	22	78-99	mes- miR82 8b	0	0
	hlu- miR828b -1	141	hlu- miR828b -1-5p	UCUUGC UCAAAU GAGUAU UCCA	22	19-40	mes- miR82 8b	0	0
			hlu- miR828b -1-3p	UCAUUU GAACAA GAA AUG UUA	21	109-129	ptc- miR82 8b-3p	3	0
HluMI R397	hlu- miR397b -3	146	hlu- miR397b -3-3p	AUCAAC GCUGCA CUCAAC G	19	113-131	hvu- miR39 7b-3p	0	0
			hlu- miR397b -3-5p	AUUGAG UGCAGC GUAAAU GAA	21	18-38	bdi- miR39 7b-5p	2	0
	hlu- miR397b -2	138	hlu- miR397b -2-5p	UUGAGU GCAGCG UUGAUG AA	20	18-37	bdi- miR39 7b-5p	0	0
			hlu- miR397b -2-3p	ACGCUG CACUCA AUUAUG	18	108-125	eun- miR39 7b-3p	1	0
	hlu- miR397b -1	122	hlu- miR397b -1-5p	UCAUUG AGUGCA GCGUUG AUG	21	10-30	mes- miR39 7b	0	0
			hlu- miR397b -1-3p	AUUGAC GCUGCA CUCAAU	18	94-111	gma- miR39 7b-3p	0	0
HluMI R9743	hlu- miR9743	247	hlu- miR9743 -5p	AGAAAU UUUUUG GAAGAA AAUG	22	126-147	gma- miR97 43	5	0
HluMI R6151	hlu- miR6151 a	140	hlu- miR6151 a-3p	UUAAUA UUAACC AUUGGA UUGA	22	117-138	nta- miR61 51a	5	0
HluMI R7982	hlu- miR7982 a	145	hlu- miR7982 a-5p	AACAUG GACGAU AAUGAU AUCU	22	4-25	stu- miR79 82a	5	0
HluMI R8655	hlu- miR8655	228	hlu- miR8655 -3p	UAUCUU UUUAUU AUAUCU GU	20	199-218	gra- miR86 55	3	0

HluMI R7952	hlu-miR- 7952	117	hlu-miR- 7952-3p	UUAUA AAAAGU GCAUGA CU	20	56-75	prd- miR- 7952- 3p	1	0
HluMI R319	hlu- miR319i	330	hlu- miR319i- 5p	UGGGGU GAUGGG AGCACC C	19	143-161	ptc- miR31 9i	3	0
	hlu- miR319b	116	hlu- miR319b -3p	UUUGGA CUGAAG GGAGCU CCU	21	78-98	aof- miR31 9b	0	0
HluMI R8037	hlu- miR8037	198	hlu- miR8037 -5p	AUAAUU UGGAGG AAUAGG A	19	80-98	stu- miR80 37	0	0
HluMI R390	hlu- miR390- 2	106	hlu- miR390- 2-5p	AAGCUC AGGAGG GAUAGC GCC	21	4-24	aof- miR39 0	0	0
			hlu- miR390- 2-3p	CGCUAU CUAUCC UGAGUU UCA	21	86-106	cas- miR39 0a-3p	1	0
	hlu- miR390- 1	237	hlu- miR390- 1-5p	AAGCUC AGGAGG GAUAGC GCC	21	70-90	aof- miR39 0	0	0
			hlu- miR390- 1-3p	CGCUAU CUAUCC UGAGUU UCA	21	152-172	cas- miR39 0a-3p	1	0
HluMI R7502	hlu- miR7502	103	hlu- miR7502 -3p	UUUUUC AGAGAA GAAAAA AAUG	22	60-81	ghr- miR75 02	5	0
HluMI R1042 0	hlu- miR1042 0	235	hlu- miR1042 0-5p	CUGAAC CACCAU UAUUUU	18	73-90	gma- miR10 420	2	0
HluMI R1112 3	hlu- miR1112 3	320	hlu- miR1112 3-5p	UAUUUG GCACCA UUAUUU GAUG	22	19-40	lja- miR11 123-3p	5	0
HluMI R398	hlu- miR398	126	hlu- miR398- 3p	UGUGUU CUCAGG UCGCC CUG	21	86-106	aof- miR39 8	0	0
HluMI R1044 0	hlu- miR1044 0	214	hlu- miR1044 0-5p	UAGUGA CGAUAC UUUAGA U	19	11-29	gma- miR10 440	3	0
HluMI R1043 7	hlu- miR1043 7-3	159	hlu- miR1043 7-3-5p	UAUUGU UCAAAC AUAUAA UUUU	22	55-76	gma- miR10 437	2	0
	hlu- miR1043 7-2	208	hlu- miR1043 7-2-5p	UAUUGU UCAAAC AUAUAA UUUU	22	55-71	gma- miR10 437	2	0
	hlu-	223	hlu-	UAUUGU	22	55-76	gma-	2	0

	miR1043 7-1		miR1043 7-1-5p	UCAAAC AUAUAG UUUU			miR10 437		
HluMI R394	hlu- miR394c	142	hlu- miR394c -5p	UUGGCA UUCUGU CCGCCU CCAU	22	34-55	mes- miR39 4c	1	0
	hlu- miR3946	221	hlu- miR3946 -3p	UUGUAG AGAAUG AGAUGA GAGCA	23	127-149	csi- miR39 46	2	0
HluMI R4244	hlu- miR4244	180	hlu- miR4244 -5p	UUGUUG AUUCCU UGGAGA U	19	32-50	aly- miR42 44	0	0
HluMI R8721	hlu- miR8721 a	170	hlu- miR8721 a-3p	AUCGAU AGGUUA AAUAUG UA	20	87-106	gra- miR87 21a	4	0
HluMI R9773	hlu- miR9773 -1	92	hlu- miR9773 -1-5p	UUCAUU UUUGUG UUGUUU UGUG	22	38-59	tae- miR97 73	4	0
	hlu- miR9773 -2	321	hlu- miR9773 -2-3p	UAUUUA UUUAAA UUAUUU UGUGAA	24	163-186	tae- miR97 73	5	0
	hlu- miR9773 -3	203	hlu- miR9773 -3-3p	UUUUGU UUAUUU UGUUUU GUGA	22	144-165	tae- miR97 73	4	0
	hlu- miR9773	182	hlu- miR9773 -5p	UUUGUU UUUAUG UAUUUU GGUGAA	24	3-26	tae- miR97 73	3	0
HluMI R396	hlu- miR396e	139	hlu- miR396e -5p	UUCCAC AGCUUU CUUGAA CUGU	22	17-38	gma- miR39 6e	0	0
HluMI R164	hlu- miR164e -1	88	hlu- miR164e -1-5p	UGGAGA AGGGGA GCACGU GCA	21	1-21	cpa- miR16 4e	0	0
	hlu- miR164e -2	152	hlu- miR164e -2-5p	UGGAGA AGGGGA GCGCGU GCA	21	20-40	cpa- miR16 4e	1	0
HluMI R1090	hlu- miR1090	219	hlu- miR1090 -5p	UAAAAG CUAUUC CCCACA AA	20	163-182	smo- miR10 90	4	0
HluMI R1023	hlu- miR1023 a	170	hlu- miR1023 a-5p	CUCUCU UUCCCU UUCUCU	18	5-22	ppt- miR10 23a-5p	3	0
HluMI R158	hlu- miR158a	113	hlu- miR158a -5p	UGUGCU UGUGUG UGUACA	18	40-57	cas- miR15 8a	3	0
HluMI R827	hlu- miR827- 2	108	hlu- miR827- 2-3p	UUAGAU GACCAU CAACAA	21	78-98	aof- miR82 7	0	0

				ACA					
			hlu-miR827-2-5p	UUUGUU GAUGGU CAUGUA	18	13-30	stu-miR827-5p	1	0
	hlu-miR827-1	128	hlu-miR827-1-3p	UUAGAU GACCAU CAACAA ACA	21	96-106	aof-miR827	0	0
			hlu-miR827-1-5p	UUUGUU GAUGGU CAUGUA	18	21-38	stu-miR827-5p	1	0
HluMI R12338	hlu-miR-12338-3p	160	hlu-miR-12338-3p	GUUGCU ACCUCU UCUUUA	18	101-118	mdo-miR-12338-5p	0	0
HluMI R3513	hlu-miR3513	326	hlu-miR3513-5p	UGAUAG GAUAGA AGUUCU AU	20	122-141	ahy-miR3513-3p	3	0
HluMI R7493	hlu-miR7493b	236	hlu-miR7493b-5p	UUGGAU UUUUAU UUGGUU UAUU	21	103-124	gra-miR7493b	5	0
HluMI R11079	hlu-miR11079	331	hlu-miR11079-3p	UUGUGU CCAACA UGUCCU U	19	272-290	lja-miR11079-3p	3	0
HluMI R6019	hlu-miR6019a	273	hlu-miR6019a-5p	UGCAGA UGACUU GCUAAU GUUU	22	18-39	nta-miR6019a	5	0
HluMI R5532	hlu-miR5532	159	hlu-miR5532-3p	AUGGAA UAUAUG ACAAAG G	19	124-142	osa-miR5532	0	0
HluMI R2111	hlu-miR2111d	152	hlu-miR2111d-5p	UAAUCU GCAUCC UGAGGU UUA	21	38-58	ppe-miR2111d	0	0
			hlu-miR2111d-3p	GACCUU GAGAUG CAGAUU A	19	96-114	gma-miR2111d	2	0
HluMI R838	miR838	190	hlu-miR838-3p	GCAGCU AUGAGA AGCAAC GC	20	127-146	aly-miR838-5p	4	0
HluMI R8175	hlu-miR8175	340	hlu-miR8175-3p	GAUCCC CGGCAA CGGCGC CA	20	223-242	ath-miR8175	0	0

ANEXOS

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA BJD (Brazilian Journal of Development)

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".

The contribution is original and unpublished, and is not being evaluated for publication by another journal; Otherwise, it should be justified in "Comments to the editor".

- O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.

The submission file is in Microsoft Word, OpenOffice or RTF format.

- URLs para as referências foram informadas quando possível.

URLs for referrals were informed when possible.

- O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.

The text is in simple space; Uses a 12-point font; Uses italic instead of underlining (except URL addresses); The figures and tables are inserted in the text, not at the end of the document in the form of attachments.

- O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

The text follows the style standards and bibliographic requirements described in Guidelines for Authors, on the About Journal page.

- Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

In case of submission to a peer-reviewed section (eg articles), the instructions available under Ensuring blind peer evaluation were followed.

Author Guidelines

O BJD aceita apenas artigos originais, não publicados em outros periódicos. Aceitamos artigos apresentados em eventos, desde que essas informações sejam disponibilizadas pelos autores.

As normas para formatação e preparação de originais são:

- Máximo de 20 páginas;
- Maximum 8 autores;
- Fonte Times New Roman tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- Figuras, Tabelas e Tabelas devem aparecer junto ao texto, editáveis, em fonte 10, tanto para o conteúdo quanto para o título (que deve vir logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve vir logo abaixo do elemento gráfico).
- Título em português e inglês, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo e resumo, juntamente com palavras-chave e palavras-chave, com espaçamento simples, logo abaixo do título;
- O arquivo submetido não deve conter a identificação dos autores.

Esta revista adota como política editorial as diretrizes de boas práticas de publicação científica da Associação Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Administração (ANPAD), disponíveis em: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados abaixo. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outro periódico; Caso contrário, deverá ser justificado em "Comentários ao editor".
- O arquivo de submissão está no formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
- Os URLs para referências foram informados quando possível.
- O texto está em espaço simples; Usa uma fonte de 12 pontos; Usa itálico em vez de sublinhado (exceto endereços de URL); As figuras e tabelas são inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
- O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
- No caso de submissão a uma seção revisada por pares (por exemplo, artigos), as instruções disponíveis em Assegurar avaliação cega por pares foram seguidas.

Taxa de publicação:

- Esta revista não cobra taxa de submissão;

- Esta revista cobra a publicação de artigos, no valor de:

R\$ 590,00 por artigo a ser publicado - Brasileiros.

\$ 150,00 (dólares americanos) por artigo a ser publicado - Outras nacionalidades.

Privacy Statement

- The content of the articles is the sole responsibility of the authors.
- The total or partial reproduction of the content of the articles is allowed, provided the source is mentioned.
- Articles with plagiarism will be refused, and the author of the plagiarism will lose the right to publish in this magazine.
- The names and addresses informed in this journal will be used exclusively for the services provided by this publication and are not available for other purposes or to third parties.
- Once you submit the articles, the authors give the copyright of their articles to the BJD. If you regret the submission, the author has the right to ask the BJD not to publish his article. However, this request must occur within two months before the release of the number that the article will be published.
- The BJD uses the Creative Commons CC BY license. Information about this license can be found at: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/br/>

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA GMB (Genetics and Molecular Biology)

Instructions to authors

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform

hosted at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

The cover letter should be addressed to:

Carlos C. F. Menck and Márcia Pinheiro Margis,
Editors-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

a) The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process. The submitting author must provide an ORCID ID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>), with public information available, at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. **Multiple submissions from the same computer of manuscripts from different institutions will not be accepted.**

b) Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.

c) Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).

d) The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office. We strongly encourage co-authors to also provide their ORCID iDs at the time of submission.

e) In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).

f) Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, postal, email address and ORCID ID.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study.

Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values

should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **Conflict of Interest:** Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

f) **Authors Contributions:** The contributions of each author must be specified here; identify authors by their initials. The style of this section may be as follows: author initials> conceived and the study, <author initials> conducted the experiments (detail if necessary), <author initials> analyzed the data, <author initials> wrote the manuscript, <author initials> (other contributions if applicable), all authors read and approved the final version.

In case of doubts concerning contribution definitions, we suggest to consult the CRediT taxonomy at <https://casrai.org/credit>.

g) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the

karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

h) Internet Resources Section: this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)
LEM

Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

i) Tables: must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

j) Figures must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

k) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

l) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

m) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

n) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission. In any case, a letter (in English) indicating the approval by the respective Ethics Committee must be included in the submission. The letter should be preferentially Institutional and should confirm the protocol number of the approval.

o) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

Table S1 – < short title >

Figure S1 – < short title >

This material is available as part of the online article from

<http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Genome Insight For GMB

A new section of articles devoted to genome data (Genome Insight) will be considered for publication in Genetics and Molecular Biology. Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance. Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript. Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the Editor is necessary. Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.m. in our Instructions to Authors.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author. The latter will have to sign this form, also on behalf of any co-authors, and submit it through ScholarOne website.

5. Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.