

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**VINICIUS LUCIANO AMORIM BORGES LEITE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) EM**  
***Drosophila melanogaster***

**PATOS DE MINAS - MG**  
**SETEMBRO DE 2025**

**VINICIUS LUCIANO AMORIM BORGES LEITE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) EM  
*Drosophila melanogaster***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Profa. Dra. Júlia Ariana S. Gomes Lenzi**

**PATOS DE MINAS - MG**

**SETEMBRO DE 2025**

**VINICIUS LUCIANO AMORIM BORGES LEITE**

**Avaliação da toxicidade do extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) em *Drosophila melanogaster***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Dra. Júlia Ariana de Souza Gomes Lenzi – IBTEC – UFU  
Membro/Presidente

Me. Fabrícia Alves Vieira – IBTEC - UFU  
Membro

Dra. Ana Clara Garcia Guimarães – IBTEC – UFU  
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, 30 de setembro de 2025.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são para minha orientadora Profa. Dra. Júlia Ariana de Souza Gomes Lenzi por ter me dado um excelente direcionamento de como proceder na pesquisa prática e teórica mesmo em período de licença maternidade e por ter me oferecido um período de estágio no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), onde pude aprofundar conhecimentos a respeito de *Drosophila melanogaster*. Para minha coorientadora, Profa. Tamiris Sabrina Rodrigues, também que sempre estava disposta a ensinar, explicar, realizar treinamentos e direcionar conhecimentos necessários para o cultivo, manipulação e uso da mosca da fruta em amplas áreas de estudo científico. Para o Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes que auxiliou na aplicação da metodologia em relação à obtenção do extrato e na parte química do projeto.

Ainda, para meus colegas de bancada Victória Gonçalves Marques e mestre Fabrícia Alves Vieira devido aos momentos de ajuda e discussões sobre o trabalho e de descontração, trazendo leveza ao ambiente. Também para o Gabriel Henrique Matias e Adriana Cristina Dias, cuja disposição e conhecimento no cultivo e manipulação da mosca da fruta foram inestimáveis. Mais uma vez agradecer a todos os citados por me permitir aprender melhor sobre os mecanismos por trás da epilepsia, de grande relevância para mim devido ao fato de conviver com uma paciente na família, minha irmã Thayná Victória Amorim Borges Leite, o que me motivou a participar do projeto.

## RESUMO

A epilepsia é o segundo distúrbio neurológico mais comum no mundo, e aproximadamente um terço dos pacientes não respondem aos tratamentos convencionais. A doença é caracterizada pela hiperexcitabilidade neuronal, que resulta em convulsões. Benzodiazepínicos são usados no tratamento da epilepsia por potencializarem a ação do neurotransmissor GABA, reduzindo a frequência das crises. O *Humulus lupulus Linnaeus* (lúpulo) apresenta efeito hipnótico possivelmente mediado por um mecanismo semelhante ao dos benzodiazepínicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade do extrato hexânico de lúpulo em *Drosophila melanogaster*, visando explorar seu potencial como agente terapêutico experimental. Moscas das linhagens *Canton-S* e *w<sup>1118</sup>* foram submetidas a diferentes concentrações do extrato de lúpulo, 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL e 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL respectivamente. Os resultados, avaliados por meio do teste de sobrevivência, na *Canton-S* não apresentou toxicidade na menor concentração. Já nos ensaios realizados em moscas *w<sup>1118</sup>*, o grupo veículo demonstrou toxicidade significativa, enquanto as concentrações do extrato (6,25 a 100 µg/mL) se mostraram seguras e reduziram a mortalidade induzida pelo veículo. Além disso, o extrato não afetou a taxa de eclosão nem o processo de metamorfose em *w<sup>1118</sup>*. Conclui-se que concentrações acima de 31,25 µg/mL são tóxicas para *Canton S*, mas seguras em *w<sup>1118</sup>*, permitindo o acompanhamento do efeito do extrato em todas as fases do desenvolvimento. O extrato de lúpulo demonstrou efeito protetor frente à toxicidade do veículo, evidenciando seu potencial para investigações terapêuticas futuras em modelos experimentais de epilepsia.

Palavras-chave: Drosófilas epiléticas. *Drosophila melanogaster*. Epilepsia. *Humulus lupulus Linnaeus*.

## **ABSTRACT**

*Epilepsy is the second most common neurological disorder in the world, and approximately one-third of patients do not respond to conventional treatments. The disease is characterized by neuronal hyperexcitability, which results in seizures. Benzodiazepines are used in the treatment of epilepsy because they potentiate the action of the neurotransmitter GABA, reducing the frequency of seizures. Humulus lupulus Linnaeus (hops) has a hypnotic effect possibly mediated by a mechanism similar to that of benzodiazepines. The objective of this study was to evaluate the toxicity of the hexanic extract of hops in Drosophila melanogaster, aiming to explore its potential as an experimental therapeutic agent. Flies from the Canton-S and w<sup>1118</sup> strains were subjected to different concentrations of the hop extract, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL and 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL respectively. The results, evaluated through a survival test, in Canton-S showed no toxicity at the lowest concentration. In the assays performed on w<sup>1118</sup> flies, the vehicle group demonstrated significant toxicity, while the extract concentrations (6.25 to 100 µg/mL) proved to be safe and reduced the vehicle-induced mortality. Furthermore, the extract did not affect the hatching rate or the metamorphosis process in w<sup>1118</sup>. It is concluded that concentrations above 31.25 µg/mL are toxic to Canton-S, but safe in w<sup>1118</sup>, allowing for the monitoring of the extract's effect in all developmental stages. The hop extract demonstrated a protective effect against the toxicity of the vehicle, highlighting its potential for future therapeutic investigations in experimental models of epilepsy.*

*Keywords: Drosophila melanogaster. Epilepsy. Epileptic drosophila. Humulus lupulus Linnaeus.*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha 1\beta 3\gamma 2$  GABA<sub>A</sub>: GABA<sub>A</sub> com subunidade alfa tipo 1, beta tipo 2 e gama tipo 2 (*alpha 1 subunit, beta 3 subunit, gamma 2 subunit* GABA<sub>A</sub>)

BOD: demanda bioquímica de oxigênio (*biochemical oxygen demand*)

BPA: bisfenol A

ERG: eletroretinograma (*electroretinogram*)

FST: teste do nado forçado (*forced swim test*)

GABA: ácido gama-aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid*)

GABA<sub>A</sub>: ácido gama-aminobutírico tipo A (*gamma-aminobutyric acid type A*)

HEK293: rim embrionário humano 293 (*human embryonic kidney 293*)

NF- $\kappa$ B: fator nuclear- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*)

Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NT: não-tratado

ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	9
1.1.	Epilepsia e tratamento farmacológico .....	9
1.2.	<i>Humulus lupulus Linnaeus</i> : características químicas.....	10
1.3.	Evidências da ação do <i>Humulus lupulus Linnaeus</i> no Sistema Nervoso Central .....	11
1.4.	<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal para pesquisas sobre epilepsia .....	11
1.5.	Cuidados essenciais para o manejo de drosófilas .....	13
2.	OBJETIVOS .....	14
2.1.	Objetivo Geral.....	14
2.2.	Objetivos específicos .....	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1.	Características do meio de cultura, repique e manutenção das moscas .....	15
3.2.	Preparo do extrato de lúpulo .....	16
3.3.	Ensaio toxicológico.....	16
3.4.	Avaliação da taxa de eclosão com $w^{1118}$ .....	17
3.5.	Análise estatística.....	18
4.	RESULTADOS .....	18
4.1.	Ensaio de sobrevivência em linhagem <i>Canton-S</i> .....	18
4.2.	Ensaio de sobrevivência em linhagem $w^{1118}$ .....	19
4.3.	Avaliação da taxa de eclosão com $w^{1118}$ .....	19
5.	DISCUSSÃO .....	22
6.	CONCLUSÃO .....	24
	REFERÊNCIAS.....	25



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epilepsia e tratamento farmacológico

A epilepsia é uma doença que afeta cerca de 50 milhões de pessoas, sendo uma das condições neurológicas mais comuns em todo o mundo (Organização Mundial da Saúde, 2024). O cenário torna-se ainda mais preocupante diante do fato de que mais de um terço dos portadores são resistentes aos tratamentos convencionais (Sanz *et al.*, 2023). Os sintomas costumam ser temporários e variam a depender de quais regiões cerebrais a convulsão afeta, mas de forma geral, incluem: perda de consciência, descontrole muscular, distúrbios sensoriais (visão, audição e paladar) e de humor, dentre outros problemas cognitivos (Organização Mundial da Saúde, 2024).

Uma das principais classes farmacológicas dos antiepiléticos são benzodiazepínicos, moduladores alostéricos positivos de receptores de ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>). Tais medicamentos facilitam a abertura de canais cloreto desses receptores, deixando-os mais sensíveis a seu mediador, o neurotransmissor inibitório GABA. Dessa forma, uma mesma quantidade de GABA tem a capacidade de inibir a atividade neuronal com maior eficiência, neutralizando possíveis crises. No entanto, um dos efeitos adversos é a tolerância, ocorrendo em algumas situações a necessidade de aumentar a dose ou introduzir outro fármaco, de forma isolada ou em combinação, para alcançar o mesmo efeito terapêutico previamente obtido (Rang *et al.*, 2016, p. 1286).

Há aproximadamente vinte medicamentos destinados ao tratamento da epilepsia (Sanz *et al.*, 2023), sendo necessária a descoberta de novas moléculas que apresentem maior eficiência terapêutica. Fármacos à base de plantas têm sido uma área bastante explorada nessa busca, sendo economicamente viáveis quando comparados à medicamentos sintéticos. Isso se deve à riqueza de compostos bioativos encontrados na natureza que podem ser isolados e explorados para fins medicinais (Hielscher, [s.d.]).

Um exemplo disso é o *Humulus lupulus Linnaeus* (lúpulo). Apesar de se tratar de uma herbácea muito utilizada na indústria cervejeira (Durello *et al.*, 2019), também é tradicionalmente usada como planta medicinal devido às suas propriedades farmacológicas. Dentre suas ações, pode-se citar o seu efeito hipnótico, conferido pela presença de alfa-ácidos

como a humulona (Benkherouf *et al.*, 2020) presentes em suas flores, principalmente nas flores fêmeas não fecundadas (Durello *et al.*, 2019).

No estudo de Benkherouf *et al.* (2020), foram utilizadas células HEK293 modificadas geneticamente com expressão de  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  GABA<sub>A</sub> para verificar o efeito da humulona no receptor. Por meio de análise eletrofisiológica, observou-se que a administração de humulona potencializou o efeito sedativo do GABA. Os dados sugerem que a humulona funciona como um modulador alostérico positivo do receptor GABA<sub>A</sub>, facilitando a abertura de canais de cloreto e tornando o receptor mais sensível a seu mediador. Assim, notou-se que a administração de humulona induziu uma hiperpolarização de membrana significativamente maior do que provocada apenas pelo GABA, promovendo em uma redução mais efetiva da excitação neuronal.

No mesmo estudo, também foi avaliado o comportamento locomotor espontâneo de camundongos que receberam 10mg/Kg ou 20mg/Kg de humulona em relação a um grupo controle. Verificou-se que apenas a concentração mais alta reduziu a distância e a velocidade média de caminhada dos camundongos, sugerindo o efeito sedativo do alfa-ácido (Benkherouf *et al.*, 2020).

## 1.2. *Humulus lupulus* Linnaeus: características químicas

Dados mostram que o *Humulus lupulus* Linnaeus é uma herbácea que apresenta potencial hipnótico pela inativação neurológica semelhante ao mecanismo dos benzodiazepínicos (Benkherouf *et al.*, 2020). Logo, supõe-se que seu extrato poderia apresentar efeitos anticonvulsivantes. Para validar esse efeito, o extrato deve apresentar elevado teor de alfa-ácidos, especialmente de humulona. Devido à sua natureza apolar (Durello *et al.*, 2019), pode-se empregar solventes orgânicos, como o hexano (Rapinel *et al.*, 2020). Para potencializar a extração, um banho ultrassônico pode ser utilizado, resultando no rompimento de paredes e membranas celulares e liberando componentes presentes na região intracelular. No entanto, há a necessidade de controlar-se o tempo de exposição da mistura às ondas ultrassônicas, pois uma alta intensidade pode promover quebras na estrutura química dos compostos do meio, o que pode levar à perda do seu potencial biológico (Hielscher, [s.d.]).

Além disso, a fim de garantir uma alta concentração de alfa-ácidos no extrato, é necessário adotar medidas para evitar sua oxidação, tais como mantê-lo em recipiente fechado longe da luz e a temperatura ambiente (Rapinel *et al.*, 2020). Por fim, o hexano precisa ser

retirado devido à sua toxicidade (Petrobrás, 2019), podendo-se realizar uma rotoevaporação para tal. Ademais, uma liofilização é necessária para promover a retirada de água por sublimação à baixíssima temperatura e pressão (Vieira *et al.*, 2012 *apud* Faria *et al.*, 2017).

### **1.3. Evidências da ação do *Humulus lupulus* Linnaeus no Sistema Nervoso Central**

Além do efeito do extrato de lúpulo sobre a via gabaérgica, pesquisas pré-clínicas já demonstraram que essa mesma herbácea tem o potencial de ativar diversas vias cerebrais, apresentando efeito terapêutico em outras condições que afetam o Sistema Nervoso Central, como a depressão e a doença de Alzheimer, embora os mecanismos de ativação não estejam totalmente elucidados.

No estudo de Zanolli *et al.* (2005), foram utilizados roedores expostos ao bisfenol A (BPA) no Teste do Nado Forçado (FST). Tal teste consiste em quantificar o tempo de imobilidade, que sugere comportamento tipo-depressivo. Quando o extrato de lúpulo foi administrado, houve uma redução do tempo de desespero comportamental dos indivíduos. Ou seja, houve um aumento no período de tentativa de fuga, indicando mitigação dos comportamentos tipo-depressivos induzidos pelo BPA (Zanolli *et al.*, 2005).

Em relação ao Alzheimer, o lúpulo apresentou potencial neuroprotetor. No estudo de Xia *et al.* (2023), foram utilizados camundongos modelo de Alzheimer, que foram expostos ao extrato de lúpulo e colocados no Labirinto Aquático de Morris (MWM). Tal modelo é amplamente utilizado em pesquisas sobre o Alzheimer e consiste em avaliar aprendizado e memória. Após o experimento, observou-se que os animais tratados com o extrato de lúpulo apresentaram uma latência de escape menor e passaram mais tempo no quadrante-alvo do que o grupo controle, indicando melhora significativa nas habilidades de aprendizado e memória. Os resultados também mostraram uma redução da deposição de peptídeos beta-amiloide (A $\beta$ ) no cérebro desses camundongos, o que está correlacionado com redução da perda progressiva de neurônios e melhora cognitiva (Xia *et al.*, 2023).

### **1.4. *Drosophila melanogaster* como modelo animal para pesquisas sobre epilepsia**

A *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) é um modelo animal que vem sendo bastante utilizado em pesquisas por apresentar algumas características, tais como: número reduzido de cromossomos na espécie ( $2n = 8$ ), rápido ciclo de vida (surgimento de novos

indivíduos em 10-12 dias à 25°C), tamanho pequeno (o que facilita sua manutenção em laboratório), viabilidade econômica e fácil preparação de meios, presença de dimorfismo sexual (Aguiar, 2015), baixas restrições éticas de uso, o fato de que cerca de 75% de seus genes possuem ortólogos em humanos (Fischer *et al.*, 2023), entre outras.

Em relação ao seu uso em estudos de epilepsia, muitas linhagens de drosófilas podem ser obtidas no *Bloomington Drosophila Stock Center*, Universidade de Indiana, Estados Unidos. Disponibilizando, ao todo, 127 linhagens, os pesquisadores têm um grande repertório de modelos para serem utilizados em estudos direcionados para a validação de compostos visando a supressão de crises epiléticas. Cada linhagem apresenta mutações específicas que representam os diferentes quadros fisiológicos dentro do espectro epilético.

A linhagem  $w^{1118}$  apresenta um alelo de perda de função no gene *white*, presente no cromossomo X (Lloyd *et al.*, 2002 *apud* Fly Base, 2025). Essa mutação ocorre de forma espontânea (Hazelrigg *et al.*, 1984 *apud* Fly Base, 2025), levando à ausência de expressão de pigmentos omocromo e pteridina, resultando em olhos de cor branca, degeneração retiniana progressiva, estruturas oculares menores e em menor número e desorganização do padrão da retina. Testes de eletroretinograma (ERG) evidenciam que moscas dessa linhagem apresentam anormalidades na sinalização visual. Quando submetidas a um estímulo luminoso seguido de escurecimento, observa-se que a resposta *off potential* é reduzida e atrasada, indicando que a reação ocular é mais fraca e lenta do que o normal (Lloyd *et al.*, 2002 *apud* Fly Base, 2025).

A manifestação destas características só ocorre em fêmeas homozigóticas ( $w^{1118}/w^{1118}$ ) e em machos hemizigóticos ( $w^{1118}/Y$ ) (Fly Base, 2025), mostrando que a herança dessa mutação é do tipo recessiva. Ademais, os indivíduos que têm esses genótipos apresentam níveis cerebrais de aminas abaixo do normal, comprometendo a produção de neurotransmissores, como serotonina, dopamina e histamina (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman *et al.*, 2008 *apud* Ferreira *et al.*, 2018).

A análise de moscas adultas da linhagem  $w^{1118}$  mostraram prejuízo no desempenho em tarefas de condicionamento olfativo e memória de curto prazo (Myers *et al.*, 2021; Sitaraman *et al.*, 2008 *apud* Fly Base, 2025). Além disso, durante a locomoção, os machos exibem redução progressiva da capacidade de escalada e menor resistência a condições de estresse, como privação de alimento ou estresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2018), o que resulta em diminuição da longevidade (Arimoto *et al.*, 2020 *apud* Fly Base, 2025). Quanto ao comportamento social, machos mostram índice de cortejo (comportamento sexual para atrair a fêmea) reduzido à luz

do dia, embora, no escuro, comportem-se como indivíduos normais (Krstic *et al.*, 2013 *apud* Fly Base, 2025).

Apesar do fenótipo anormal, a linhagem  $w^{1118}$  é muito utilizada tanto na geração de organismos transgênicos, quanto em ensaios toxicológicos com extratos. Em primeiro lugar, muitos vetores de transformação clássicos, como em transformações P-element, usam o gene *mini-white* como marcador visual. Quando um plasmídeo contendo *mini-white* (variante compacta e funcional de *white*) e um gene de interesse é inserido em moscas  $w^{1118}$ , os indivíduos transformados recuperam parcialmente a coloração vermelha nos olhos (Bateman *et al.*, 2006), o que facilita a identificação dos indivíduos transformados. Dessa forma, utilizando-se tal linhagem para o ensaio toxicológico, os resultados podem contribuir para o estudo terapêutico do lúpulo em doenças humanas que usam drosófilas transgênicas.

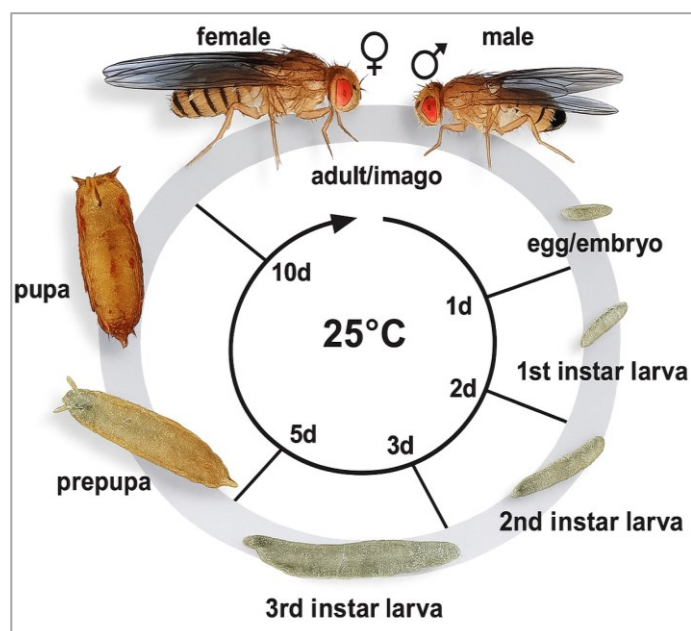
Em segundo lugar, a mutação  $w^{1118}$  afeta principalmente pigmentação ocular e algumas vias neuronais, mas não altera processos metabólicos gerais de desintoxicação. As ferramentas de avaliação de toxicidade tipicamente medem viabilidade, desenvolvimento ou marcadores celulares que não dependem de pigmentos oculares. Assim, a mera ausência de pigmento não torna as moscas mais ou menos sensíveis a compostos tóxicos comparadas a outras linhagens com o mesmo tratamento. Na verdade, trabalhos na literatura indicam que  $w^{1118}$  é uma linhagem válida e útil para testes de toxicidade, sem que seu fenótipo seja citado como fator de confusão (Bernardes, 2022). Ademais, por se tratar de uma linhagem mutante, sua utilização é necessária para permitir o estudo da toxicidade do extrato de lúpulo. Dessa forma, determinando-se as concentrações seguras, é possível testar o efeito anticonvulsivante da herbácea em linhagens modelo de epilepsia, que também são mutantes (Rickle *et al.*, 2025).

## 1.5. Cuidados essenciais para o manejo de drosófilas

As informações de manejo apresentadas a seguir baseiam-se nos dados disponibilizados pela Universidade de Indiana Bloomington (2021). Em relação à manutenção das linhagens de drosófilas, a maioria pode ser cultivada por meio de repiques regulares. É essencial, contudo, evitar a superlotação nos frascos, que pode ser identificada pelo rastejamento de larvas de primeiro e segundo estágios de desenvolvimento para fora do meio. Essa condição resulta em intensa competição entre machos durante o acasalamento sobretudo quando a proporção de machos é superior a de fêmeas), baixas taxas de cruzamento, subnutrição e dificuldades para análise de resultados.

A temperatura do equipamento de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) apresenta um forte impacto no desenvolvimento das moscas, podendo acelerar ou diminuir a duração do seu ciclo de vida. Por exemplo, a 18°C, novas gerações surgem, em média, após 19 dias na maioria das linhagens, enquanto, a 29°C, o tempo é reduzido para sete.

Para evitar contaminações (ácaros, bactérias e/ou fungos), durante qualquer manipulação das moscas, é fundamental a limpeza de bancada, utensílios utilizados e BOD a depender do protocolo de limpeza do próprio laboratório com uma solução de água sanitária 10%, etanol 70% ou sabão e água antes e depois do manuseio. Uma contaminação por ácaros pode levar à redução de moscas por se alimentarem dos ovos e do meio de cultura e fungos podem cobrir o meio de manutenção, impedindo a alimentação de moscas e larvas. Já as bactérias podem produzir muco, comprometendo a locomoção dos indivíduos.



**Figura 1.** Ciclo de vida da drosófila a 25°C. Fonte: Repositório da Universidade Federal de Uberlândia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Preparar um extrato hexânico de lúpulo e avaliar sua toxicidade em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*.

## 2.2. Objetivos específicos

- Realizar extração do *Humulus lupulus* utilizando o solvente hexano;
- Realizar a expansão e manutenção de linhagens *Canton-S* e  $w^{1118}$  de *Drosophila melanogaster*;
- Tratar moscas das linhagens *Canton-S* e  $w^{1118}$  com diferentes concentrações da fração hexânica do extrato de lúpulo;
- Determinar o potencial tóxico do extrato de lúpulo em moscas adultas das linhagens *Canton-S* e  $w^{1118}$  durante 21 dias;
- Avaliar taxa de eclosão de moscas da linhagem  $w^{1118}$ , tratadas com o extrato de lúpulo.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Características do meio de cultura, repique e manutenção das moscas

Para o preparo do meio de manutenção e tratamento das moscas, foi utilizado purê de batata enriquecido (Yoki®), de acordo com parâmetros da Universidade de Indiana Bloomington (2021). Os ingredientes e respectivas proporções podem ser encontradas na tabela 1.

Preparo do meio de manutenção (purê de batata enriquecido)	Preparo do meio de tratamento
Proporção para três frascos com capacidade de 100 mL.	Proporção para um frasco com capacidade de 45 mL.
<b>Componentes utilizados:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 18,75g de purê de batata Yoki®;</li> <li>• 3,7g de extrato de levedura;</li> <li>• 2,33g de glicose em pó;</li> <li>• 0,2g de nipagin (antifúngico).</li> </ul>	<b>Componentes utilizados:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2g de purê de batata enriquecido;</li> <li>• 5mL de água deionizada, uma concentração de lúpulo, 0,01% (p/v) Tween 80.</li> </ul>

**Tabela 1.** Componentes requeridos e suas respectivas proporções para a elaboração do meio de cultura. O protocolo foi adaptado a partir dos parâmetros da Universidade de Indiana Bloomington (2021).

Após a mistura dos ingredientes em um processador, foi obtido o purê de batata enriquecido. Este foi distribuído em frascos de manutenção e tratamento. Para cada frasco de

manutenção, foram adicionados 8g de purê enriquecido e 20 mL de água destilada. Após a solidificação dos meios, as moscas foram transferidas com o auxílio de um funil. Os frascos foram então tampados com tampas de espumas de alta densidade e mantidos em BOD a 25°C, com ciclo claro e escuro de 12 horas. O repique dos frascos de manutenção, visando a expansão dos indivíduos, ocorreu a cada 12 dias.

### 3.2. Preparo do extrato de lúpulo

O extrato de lúpulo foi preparado mediante alterações da metodologia de Rapinel *et. al.* (2020). Para tal, 50g de *pellets* de lúpulo comercial (teor de alfa-ácidos=14,3%) foi macerado e diluído em 500mL de hexano (0,675g/mL). Posteriormente, a mistura foi submetida a um banho ultrassônico a 37°C, aplicado em três pulsos de cinco minutos cada, com o intervalo de um minuto entre eles.

A mistura foi colocada em um béquer tampado com papel alumínio e fita crepe. O conjunto foi mantido em ambiente com privação de luz, evitando a oxidação dos alfa-ácidos. Após seis dias de armazenamento (144 horas) a temperatura ambiente, garantindo a solubilização da maioria dos alfa-ácidos no solvente, uma rotoevaporação foi realizada a 50°C por 10 minutos, para a remoção do hexano. Foi realizada, ainda, a liofilização por três dias para remoção da umidade, obtendo-se o extrato bruto. Este foi solubilizado em Tween 80 0,01% (p/v) e completado com água deionizada, obtendo-se a solução mãe de 1000 µg/mL. Esta foi diluída, obtendo as concentrações finais de 6,25; 12,5; 25; 31,25; 50; 62,5; 100; 125 e 500 µg/mL.

O tween 80 é anfifílico (Sigma Aldrich, 2014), podendo-se utilizá-lo para interagir tanto com as moléculas de interesse do lúpulo quanto com as de água, tornando-se possível a solubilização dos alfa-ácidos em água. Tal processo é necessário para permitir uma melhor solubilização do extrato em meios de cultura (Universidade de Indiana Bloomington, 2021).

### 3.3. Ensaio toxicológico

Para o ensaio toxicológico, as linhagens *Canton-S* e *w<sup>1118</sup>* (BL#3605) foram utilizadas e empregou-se um protocolo de duração de 21 dias para avaliar o potencial tóxico do extrato nas concentrações 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL, na linhagem selvagem (*Canton-S*), e nas concentrações 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, na linhagem mutante (*w<sup>1118</sup>*). Inicialmente,



avaliou-se o potencial tóxico em *Canton-S* e os resultados obtidos delinearão a experimentação com a linhagem *w<sup>1118</sup>*.

Para auxiliar na análise, foi adotado um controle negativo/não tratado (NT), utilizando água deionizada), além do grupo que recebeu apenas veículo (Tween 80 na concentração de 0,01%). Cada uma das concentrações mencionadas, além do veículo e controle negativo, foi testada em duplicata devido ao baixo número de indivíduos nos frascos de manutenção.

Para garantir que todos os indivíduos tratados tivessem idade semelhante, os seguintes procedimentos foram adotados: 1) As moscas foram transferidas para frascos contendo novos meios de manutenção; 2) Após nove dias realizando oviposição, as moscas adultas foram retiradas desses frascos; 3) Três dias após a etapa 2, todas as moscas recém-eclodidas (0-2 dias pós eclosão) foram coletadas e anestesiadas. Para a anestesia das moscas, removeu-se a tampa dos frascos e colocou-se no lugar um algodão embebido em éter etílico. Após a sedação, as moscas foram transferidas para uma placa de Petri, observadas em lupa/estereomicroscópio e separadas de acordo com o sexo com o auxílio de um pincel.

Para o tratamento, dez casais foram transferidos para cada frasco contendo meio preparado com diferentes concentrações de extrato de lúpulo (dia zero do teste). A cada dois dias, as moscas eram transferidas para frascos contendo novos meios de tratamento e o número de mortes era contabilizado. A curva de toxicidade foi obtida através da contagem do número de indivíduos mortos em cada troca de meio, no período de 21 dias.

### **3.4. Avaliação da taxa de eclosão com *w<sup>1118</sup>***

Ao mesmo tempo em que o ensaio toxicológico com a *w<sup>1118</sup>* foi realizado, uma avaliação da taxa de eclosão foi feita na linhagem. Para tal, um dos frascos de tratamento de cada grupo (NT; veículo; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL de extrato de lúpulo) correspondente ao dia 0 do teste foi armazenado, após a transferência das moscas, para o acompanhamento do processo de metamorfose. A taxa de eclosão foi calculada a partir da contagem de pupas após 7 a 9 dias do início do tratamento e adultos após 12 dias, os quais foram gerados a partir da oviposição dos 20 indivíduos (10 machos e 10 fêmeas) de cada *vial*. Dessa forma, adotou-se o número de pupas como 100% em relação ao número de adultos eclodidos. Esses frascos foram fotografados durante os primeiros 14 dias do ensaio toxicológico a fim de analisar possíveis interferências do extrato no processo de metamorfose.

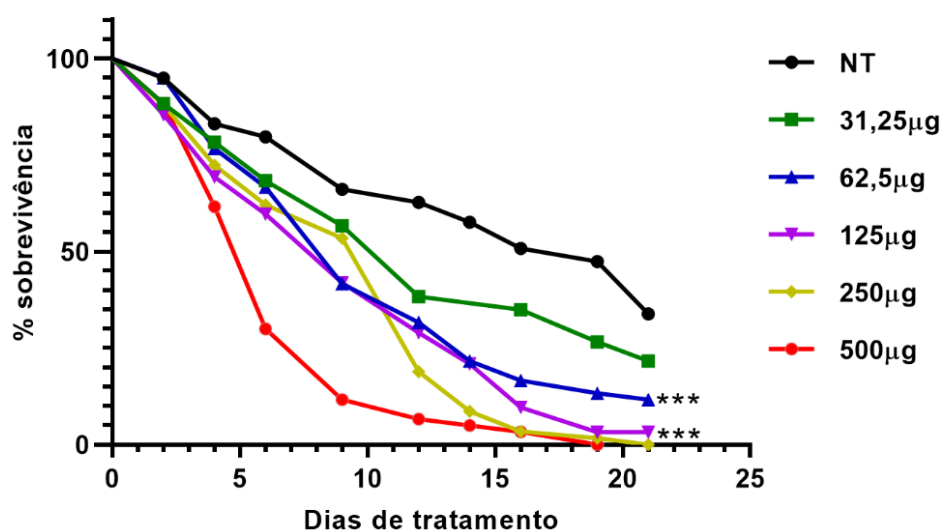
### 3.5. Análise estatística

Para a análise estatística, o aplicativo *GraphPad* versão 8 foi utilizado. Nele, os testes Qui-quadrado (*Log-rank*) e *Gehan-Breslow-Wilcoxon* foram adotados para a análise da taxa de sobrevivência das moscas, adotando  $p < 0,0001$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensaio de sobrevivência em linhagem *Canton-S*

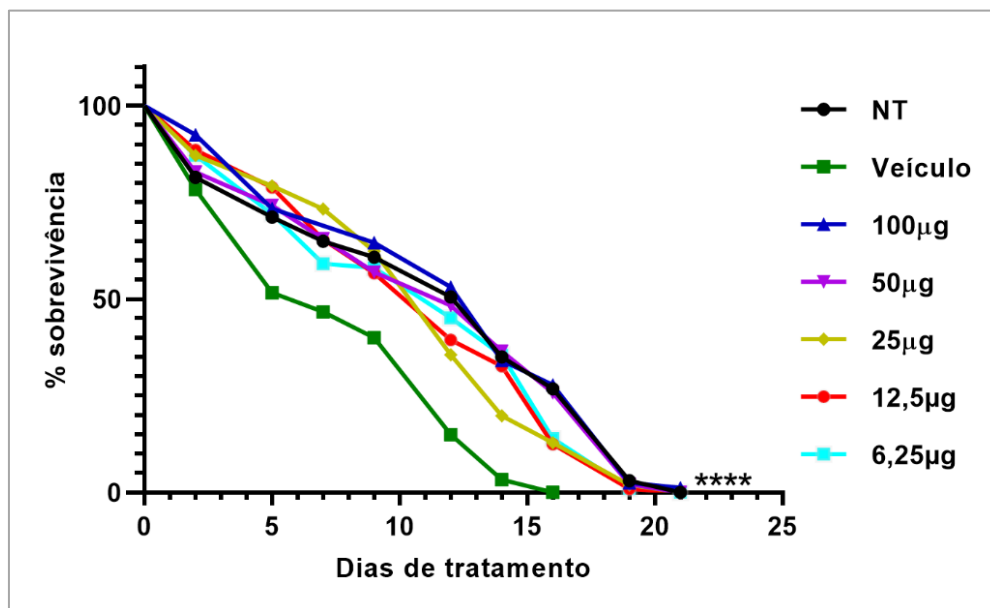
Os resultados do ensaio toxicológico com a linhagem *Canton-S* podem ser encontrados no gráfico 1. Por meio da análise dos dados, verificou-se que o extrato de lúpulo apresentou efeito tóxico nas concentrações 62,5 ( $p=0,0003$ ); 125 ( $p<0,0001$ ); 250 ( $p<0,0001$ ) e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0,0001$ ), quando comparados com o grupo NT. Dessa forma, a única concentração que se mostrou segura para o tratamento das drosófilas foi a de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0547$ ). O teste de tendência *Log-rank* apresentou  $p < 0,0001$ , o que mostra que houve uma relação entre dose e toxicidade nos grupos tratados.



**Gráfico 1.** Taxa de sobrevivência das moscas *Canton-S* ao longo dos 21 dias de tratamento com extrato de lúpulo. Os grupos testados foram: controle não tratado/negativo (NT) e grupos tratados (31,25; 62,5; 125; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Os asteriscos (\*\*\*) representam as diferenças estatísticas entre grupo NT e a concentração 62,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,0003$ ) e entre NT e 125; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0,0001$ ).

#### 4.2. Ensaio de sobrevivência em linhagem $w^{1118}$

Os resultados do ensaio toxicológico com a linhagem  $w^{1118}$ , demonstrados no gráfico 2, ilustra que houve uma diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os grupos veículo e NT ( $p < 0,0001$ ), sendo que a morte de todos os indivíduos no grupo veículo ocorreu mais precocemente, no dia 16 do tratamento.

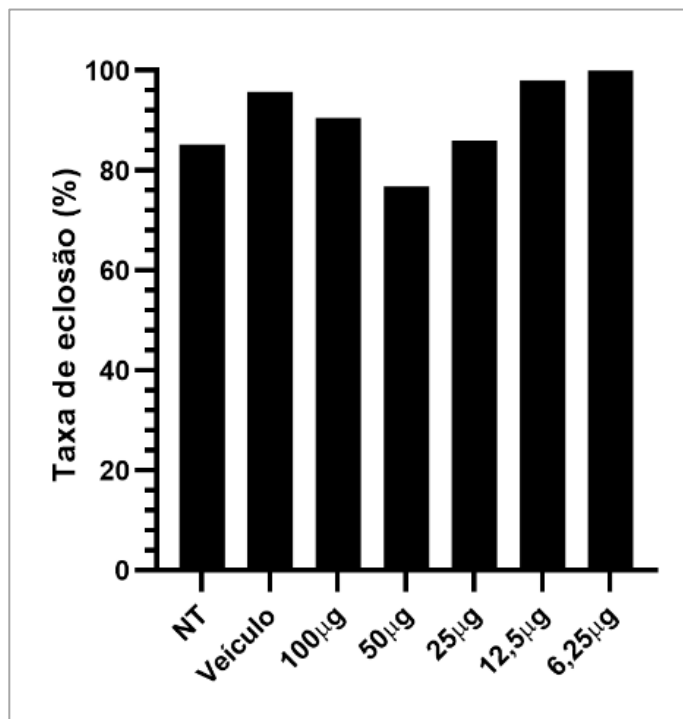


**Gráfico 2.** Taxa de sobrevivência das moscas  $w^{1118}$  ao longo dos 21 dias do ensaio toxicológico. Os grupos testados foram controle não tratado/negativo (NT), controle veículo (Tween 80 0,01%) e grupos tratados (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). Os asteriscos (\*\*\*\*) representam as diferenças estatísticas entre veículo e grupos tratados ( $p < 0,0001$ ).

Além disso, observa-se diferença significativa quando se compara a curva do grupo veículo com todas as concentrações do extrato de lúpulo ( $p < 0,0001$  em todas as concentrações). O que também pode ser visto é que o grupo NT apresentou resultados semelhantes significativamente em relação aos grupos tratados (em 6,25 µg/mL,  $p = 0,2100$ ; em 12,5 µg/mL,  $p = 0,1188$ ; em 25 µg/mL,  $p = 0,0744$ ; 50 µg/mL,  $p = 0,8543$ ; em 100 µg/mL,  $p = 0,6309$ ). Ademais, comparando-se as curvas correspondentes à concentração de 100 µg/mL com as de 12,5 e 25 µg/mL do extrato (100 e 12,5 µg/mL; 100 e 25 µg/mL), observou-se, respectivamente, diferença próxima da significância ( $p = 0,0516$ ) e significativa ( $p = 0,0263$ ). O teste de tendência *Log-rank*, por apresentar  $p = 0,6186$ , mostra que não há uma relação linear dose-toxicidade nos grupos tratados.


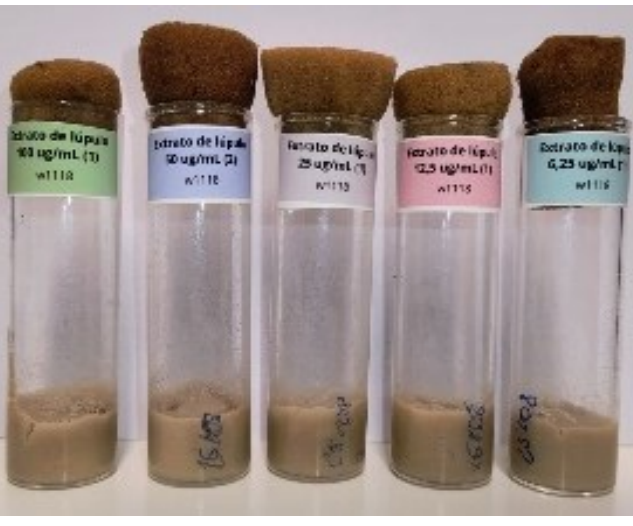



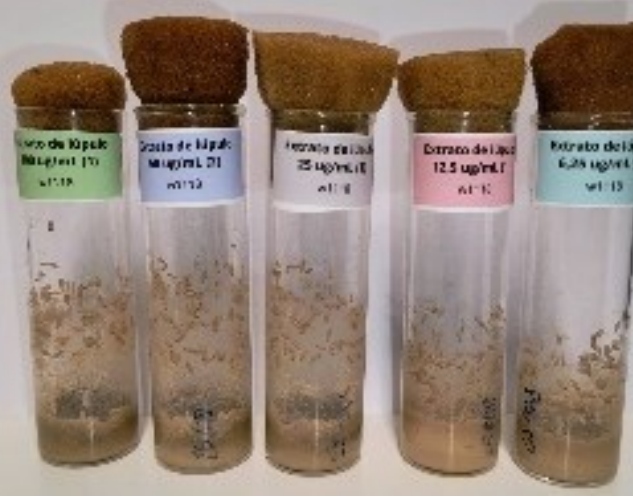
#### 4.3. Avaliação da taxa de eclosão com $w^{1118}$

A taxa de eclosão mostrou-se semelhante, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos (gráfico 3). Nos grupos NT; veículo; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL foram respectivamente 85,18; 95,83; 90,56; 76,85; 85,95; 98,01 e 100%.

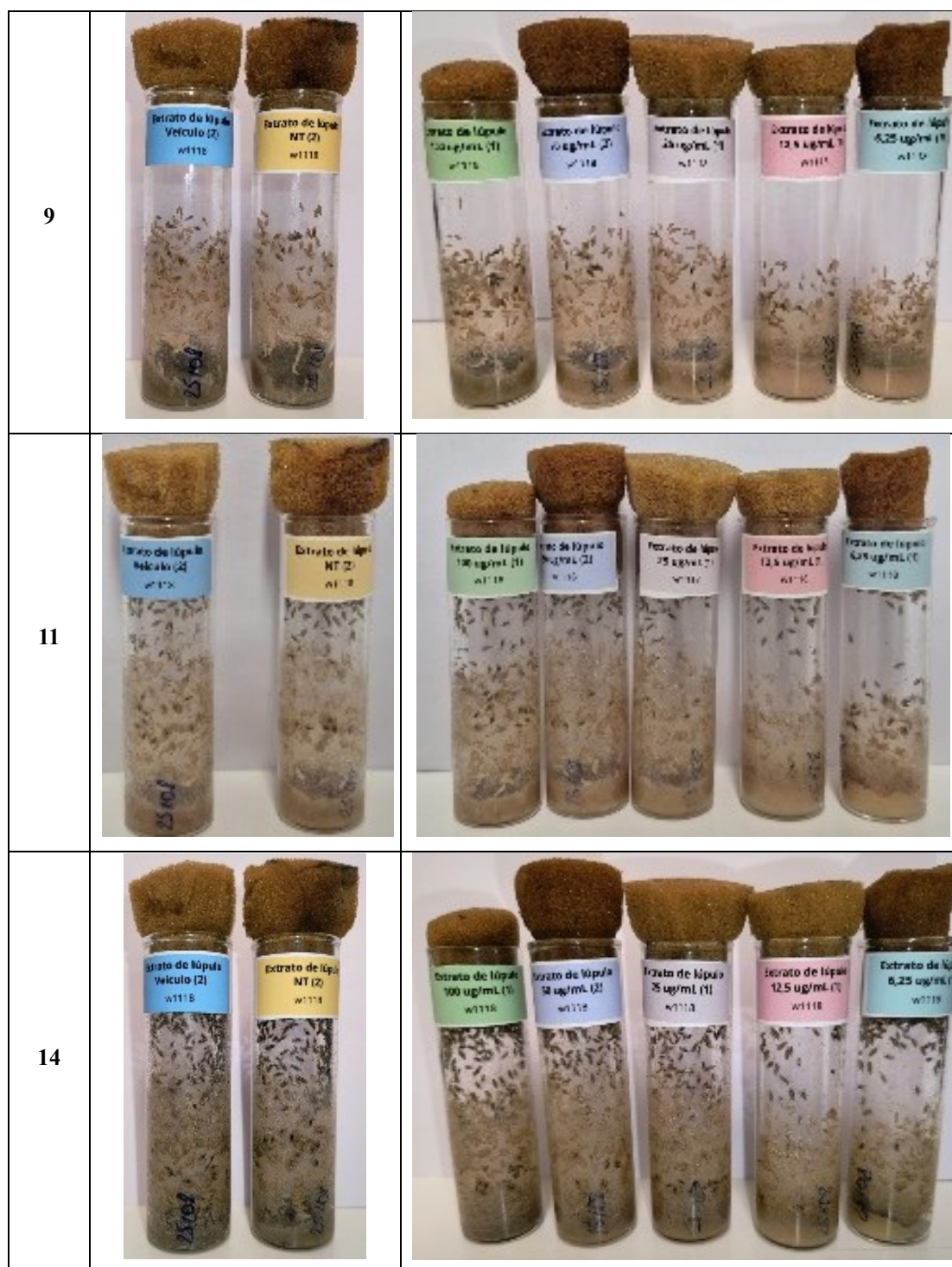


**Gráfico 3.** Taxa de eclosão das moscas *w<sup>1118</sup>* de cada um dos grupos avaliados. Nos grupos NT; veículo; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL foram respectivamente 85,18; 95,83; 90,56; 76,85; 85,95; 98,01 e 100%.

Para auxiliar essa avaliação, fotografias dos frascos da primeira troca (dia zero) que foram mantidos para essa análise, foram capturadas durante 14 dias (tabela 2) e analisadas conforme o ciclo de vida normal das drosófilas a 25°C (figura 1). Analisando-se a tabela 2, percebe-se que é possível identificar a presença de larvas do estágio L3 no quarto dia, pupas no sétimo e nono dia e adultos no 11º e 14º dia.

Dias	Grupos controle	Grupos tratados
2		
4		
7		





**Tabela 2.** Fotografias dos frascos ao longo de 14 dias. Da esquerda à direita: controle veículo (Tween 80 0,01%), controle não tratado/negativo (NT) e grupos tratados (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo mostram o potencial tóxico do extrato de lúpulo, quando avaliado na linhagem *Canton-S*, além de efeito tóxico do veículo Tween 80, observado em  $w^{1118}$ . Além disso, ao se analisar a taxa de eclosão, verifica-se que o veículo e as diferentes concentrações de extrato de lúpulo não interferiram no processo de metamorfose na linhagem mutante  $w^{1118}$ .

Em relação ao teste de sobrevivência realizado em moscas *Canton-S*, utilizou-se apenas o controle NT. Após os 21 dias do teste, pôde ser identificado que o extrato mostrou efeito seguro apenas na concentração mais baixa ( $p=0,0547$  em relação ao grupo NT). Assim, devido à toxicidade observada em 80% das concentrações do extrato na linhagem *Canton-S*, à ausência do controle veículo e à não realização do teste de eclosão, os ensaios subsequentes foram realizados com a linhagem  $w^{1118}$ .

Os dados obtidos nos testes com a linhagem  $w^{1118}$  sugerem que o veículo, quando administrado sozinho nas drosófilas, apresenta efeito tóxico na concentração 0,01% (p/v) Tween 80, mas, quando presente na formulação do extrato de lúpulo, essa toxicidade não ocorre. Ao contrário, todos os grupos tratados apresentaram uma curva de taxa de sobrevivência semelhante ao controle NT.

Dessa forma, os compostos presentes no extrato de lúpulo reduziram a toxicidade do veículo apresentando um efeito protetor, sendo essa ação mais significativa na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0,0001$ ). O Tween 80 é rico em ácido oleico insaturado (Schwartzberg; Navari, 2018), sensível à oxidação, gerando subprodutos, como peróxidos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tatsuishi *et al.*, 2005). Esses compostos podem induzir estresse oxidativo em altas concentrações, possivelmente levando à lesão celular e desencadeando processos inflamatórios (Zhang *et al.*, 2024).

Em contrapartida, o lúpulo é uma fonte rica de antioxidantes com propriedades neuroprotetoras. Um exemplo é a atividade do xantohumol, que foi validada em modelos de isquemia cerebral e envelhecimento. Sua administração levou à diminuição do dano neuronal, inflamação e apoptose por meio do sequestro de radicais livres, ativação da via Nrf2 e efeito anti-inflamatório ao inibir a via de NF- $\kappa$ B (Yen *et al.*, 2012; Rancán *et al.*, 2017), o que sustenta a hipótese de que a herbácea possa oferecer efeito terapêutico na epilepsia.

Diante dos resultados apresentados, torna-se necessária a realização de novos experimentos com o objetivo de aperfeiçoar a metodologia de solubilização do extrato, sendo importante reavaliar a concentração ideal de Tween 80 ou investigar solventes alternativos para

esse veículo. Esses ajustes viabilizariam a realização de testes para avaliar a ação terapêutica do extrato de lúpulo em linhagens modelo de epilepsia.

Além disso, como os resultados dos grupos tratados e do NT foram semelhantes estatisticamente na linhagem  $w^{1118}$ , as concentrações avaliadas podem ser consideradas seguras para a administração em drosófilas na linhagem de epilepsia para a validação do efeito anticonvulsivante do extrato de lúpulo.

## 6. CONCLUSÃO

As concentrações avaliadas na linhagem mutante  $w^{1118}$  mostraram-se seguras para a administração em drosófilas, não afetando o seu processo de metamorfose. Além disso, o extrato mostrou efeito protetor ao diminuir a toxicidade induzida pelo veículo. Tais resultados obtidos na linhagem  $w^{1118}$  podem auxiliar na avaliação do efeito terapêutico do lúpulo em linhagens modelo de epilepsia. Novos experimentos devem ser realizados na linhagem *Canton-S* para esclarecer a ação do extrato de lúpulo nessas moscas.



## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. A. **Hereditariedade e evolução: guia de trabalhos práticos**. Repositório da Universidade do Minho, Braga, 2015. Disponível em: <https://repositorium.uminho.pt/server/api/core/bitstreams/17c4cb0e-b289-410d-9596-7efe7c2211ac/content>. Acesso em 14 set. 2024.
- BATEMAN, J. R. *et al.* Site-specific transformation of drosophila via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 769-777, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056945>.
- BENKHEROUF, A. Y. *et al.* Humulone modulation of GABA<sub>A</sub> receptors and its role in hops sleep-promoting activity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 14 out. 2020. DOI: [10.3389/fnins.2020.594708](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.594708).
- BERNARDES, L. M. M. **Validação de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos relacionados à ingestão de óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), gengibre (*Zingiber officinale*) e copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea e langsdorffii*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 52. 2022. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8053>.
- DURELLO, R. S. *et al.* Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>.
- FARIA, A. G. V. *et al.* **Liofilização na produção de sólido em pó de plantas não comestíveis, para uso como base em aulas contextualizadas de química**. Disponível em: <https://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/6/1850-16523.html#:~:...de%20liofiliza%C3%A7%C3%A3o%20ou,solidifica%C3%A7%C3%A3o%20e%20a%20baixa%20press%C3%A3o>. Acesso em: 14 set. 2024.

FERREIRO, M. J. *et al.* *Drosophila melanogaster* white mutant w<sup>1118</sup> undergo retinal degeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 732, 04 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732>.

FISCHER, F. P. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism to study genetic epilepsies: an overview. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, n. 16, 2023. DOI: [10.3389/fnmol.2023.1116000](https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1116000).

FLY BASE. **Allele report: *Dmel\w[1118]***. Disponível em: <https://flybase.org/reports/FBaI0018186.html>. Acesso em: 26 jul. 2025.

HIELSCHER. **Extração ultrassônica e seu princípio de funcionamento**. Disponível em: <https://www.hielscher.com/pt/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>. Acesso em: 14 set. 2024.

INDIANA UNIVERSITY BLOOMINGTON. **Fly care working with drosophila stock**. Disponível em: <https://bdsc.indiana.edu/information/fly-culture.html>. Acesso em: 13 set. 2024.

INDIANA UNIVERSITY BLOOMINGTON. **Fly food recipes**. Disponível em: <https://bdsc.indiana.edu/information/recipes/index.html>. Acesso em: 6 set. 2024.

INDIANA UNIVERSITY BLOOMINGTON. **Seizure disorders/epilepsy**. Disponível em: <https://bdsc.indiana.edu/stocks/hd/seizures.html>. Acesso em: 13 set. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epilepsy**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy/?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAjwxY-3BhAuEiwAu7Y6sySTliUrLTHkkTWgKodG2gnUyUJ8K\\_\\_pP2btcTRu7Q8-zl8TRjVEqhoCyoMQAvD\\_BwE](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwxY-3BhAuEiwAu7Y6sySTliUrLTHkkTWgKodG2gnUyUJ8K__pP2btcTRu7Q8-zl8TRjVEqhoCyoMQAvD_BwE). Acesso em: 6 set. 2024.

PETROBRÁS. Hexano: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Rio de Janeiro: [s.n.].

RANCÁN, L. *et al.* Protective effect of xanthohumol against age-related brain damage.

**Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 49, p. 133-140, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.011>.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: farmacologia**. [s.l.] Milano Edra, 2016.

RAPINEL, V. *et al.* 2-methyloxolane as a bio-based solvent for green extraction of aromas from hops (*Humulus lupulus L.*). **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020. DOI:

10.3390/molecules25071727.

RICKLE, A. *et al.* More than meets the eye: mutation of the white gene in *Drosophila* has broad phenotypic and transcriptomic effects. **Genetics**, v. 230, n. 3, jul. 2025. DOI:

<https://doi.org/10.1093/genetics/iyaf097>.

SANZ, M. C. *et al.* Toward the use of novel alternative methods in epilepsy modeling and drug discovery. **Frontiers in Neurology**, v. 14, 31 ago. 2023. DOI:

10.3389/fneur.2023.1213969.

SCHWARTZBERG, L. S.; NAVARI, R. M. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting.

**Advances in Therapy**, v. 35, n. 6, p. 754-767, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>.

SIGMA ALDRICH. Polissorbato 80 (Tween 80): Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Cotia: [s.n.].

TATSUISHI, T. *et al.* Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes. **Toxicology**, v. 207, n. 1, p. 7-14, 2005. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.07.020>.

YEN, T. L. *et al.* Neuroprotective effects of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), in ischemic stroke of rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 8, p. 1937-1944, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf204909p>.

ZANOLI, P. *et al.* New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 102-106, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.040>.

ZHANG, L. *et al.* Dietary emulsifier polysorbate 80 exposure accelerates age-related cognitive decline. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 119, p. 171-187, jul. 2024. DOI: [10.1016/j.bbi.2024.03.052](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.03.052).