

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SHELLEN DE CORDOVA KINDERMANN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CERVEJA ARTESANAL TIPO IPA SOBRE
PARÂMETROS ANTIGENOTÓXICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2023.

SHELLEN DE CORDOVA KINDERMANN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CERVEJA ARTESANAL TIPO IPA SOBRE
PARÂMETROS ANTIGENOTÓXICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para a obtenção do título de mestre em ciências da Saúde.

Orientador(a): Profª Drª Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2023.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

K51a Kindermann, Schellen de Cordova.
Avaliação dos efeitos da cerveja artesanal tipo
IPA sobre parâmetros antígenotóxicos,
antimutagênicos e comportamentais em camundongos /
Schellen de Cordova Kindermann. - 2023.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo
Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Cervejas artesanais - Efeitos colaterais. 2.
Cerveja IPA - Aspectos da saúde. 3. Antioxidantes.
4. Genotoxicidade. 5. Testes de mutagenicidade. I.
Título.

CDD 23. ed. 641.23

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 406

Com início às 14h (quatorze horas) do dia 10 (dez) de fevereiro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **SCHELLEN DE CORDOVA KINDERMANN**, sob a orientação da **Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade**, intitulada “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CERVEJA ARTESANAL TIPO IPA SOBRE PARÂMETROS ANTIGENOTÓXICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Fábio Klamt (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 17h (dezessete horas), dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa.

Criciúma, 10 (dez) de fevereiro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho à minha família, que estão presentes em todos os momentos da minha vida e por serem sempre os maiores incentivadores de todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer e dedicar este trabalho primeiramente a minha família e especialmente aos meus pais, pelos valiosos ensinamentos, só posso dizer que amo muito vocês.

À minha avó Erondina (in memoriam), você foi inspiração, porto seguro e o maior exemplo de amor. Obrigada por ensinar à nossa família os valores mais preciosos de um ser humano: a humildade, honestidade e o respeito ao próximo. Meu amor por você é infinito!

Aos meus irmãos, Scheila e Matheus, pelo carinho e companheirismo, pela valiosa visão crítica que sempre tem muito a me acrescentar.

Ao meu esposo Leandro que aguentou minha ansiedade e preocupações extremas com os estudos, pelos ensinamentos, incentivos e críticas, que me fazem, cada dia mais, lutar pelo meu melhor. Obrigada meu amor e parceiro, por estar comigo confiando e apoiando na conquista dos meus sonhos.

Em especial minha orientadora Vanessa por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação. Muito obrigada por tudo!

Agradeço imensamente aos meus colegas do grupo de pesquisa GPTOX, pela parceria no trabalho e na vida. Especialmente à Wanessa que entrou trazendo muitas alegrias.

Aos ICs que sempre me ajudaram e alegam os meus dias. Gratidão por fazerem o dia a dia ser mais divertido. Vocês são maravilhosos!

À Carla e Nicolas que não mediram esforços para me ajudar no experimento.

À Isa Luciano, sempre muito otimista colocando todos para cima. Você é muito especial!

À Luiza, pela forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo estímulo sentido após cada conversa, que me faziam “carregar baterias”. Você fez dos meus dias mais alegres, vou te levar pra vida!

À Adri e Marina, que muitas vezes me ajudaram e me orientaram neste árduo percurso acadêmico, que compartilharam importantes conhecimentos comigo e me ensinaram muitas coisas, estando ao meu lado, prontas para me ajudar sempre que necessário. Especialmente a Marina que sempre foi muito parceira e preocupada para que tudo ocorresse bem. Sou muito grata a vcs!

Meu muito obrigada também vai aos alunos do grupo de pesquisa do Profº Emílio, Carol, Rejane, Micaela e a Bela. Ahh o que falar da Bela... Pessoa admirável e um grande exemplo de dedicação. Realiza seu trabalho de forma brilhante, e ainda ajuda todos à sua volta. Você foi um presente que eu ganhei nesse último ano, obrigada por toda amizade e por tornar meus dias mais cheio de cor.

À todos os professores do PPGCS, que por meio das aulas e conversas compartilharam não somente conhecimento e pesquisa, mas também contribuíram para minha formação pessoal.

Aos animais que involuntariamente cederam à vida em prol do conhecimento científico.

À Unesc pela oportunidade de realizar minha graduação mestrado.

À banca examinadora pelo tempo, leitura e colaboração para este trabalho que fizeram parte da minha formação.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ, FAPESC e UNESC.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste sonho, o meu muito obrigado!

“Aprenda com o ontem, viva para o hoje, esperança para o amanhã. O importante é não parar de questionar”.

Albert Einstein

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas fermentadas mais consumidas em todo o mundo, sendo fonte de carboidratos, aminoácidos, minerais, vitaminas e polifenóis. O consumo moderado da cerveja pode exercer efeitos benéficos na saúde humana e fornecer proteção contra doenças crônicas como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e cânceres. Cervejas artesanais, como a do tipo IPA, possuem maior variedade de compostos fenólicos quando comparado com os demais tipos, devido sua alta proporção de lúpulo, o qual possui substâncias antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros comportamentais e efeito genotóxico/antigenotóxico e/ou mutagênico/antimutagênico do consumo da cerveja artesanal tipo IPA. Foram utilizados 64 camundongos Swiss machos adultos, divididos em 8 grupos: Grupo 1 e 2- Água; Grupo 3 e 4- IPA; Grupo 5 e 6 - Álcool 7%; Grupo 7 e 8- Lúpulo. Os animais receberam água, cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo disponibilizado *ad libitum* na garrafa de hidratação durante 30 dias. Nos dias 27^o, 28^o e 29^o foram realizados testes comportamentais para avaliação da atividade exploratória, locomotora e comportamento do tipo depressivo nos camundongos. Após esse período os animais passaram por avaliações genéticas através do Ensaio Cometa *ex-vivo* e *in vivo*. Para a avaliação *ex-vivo*, o sangue dos animais dos grupos 2, 4, 6 e 8 foi coletado no 30^o dia de tratamento e exposto ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para a avaliação *in vivo*, o agente alquilante ciclofosfamida (CP) foi administrado na concentração de 50 mg/Kg nos grupos 2, 4, 6 e 8 após a coleta de sangue para o ensaio *ex-vivo*, enquanto uma solução salina 1mL/Kg foi administrada intraperitonealmente nos grupos controle 1, 3, 5 e 7. Após 4 horas, uma nova coleta de sangue foi feita em todos os grupos para realização do Ensaio Cometa. No 31^o dia, 24 horas após administração da CP e solução salina, os animais foram eutanasiados para dissecação do cérebro, fígado e coração para realização do Ensaio Cometa e dissecação dos fêmures para retirada da medula óssea para o Teste de Micronúcleos. Nos parâmetros comportamentais, os resultados demonstram que no Teste Campo Aberto, todos os animais apresentaram atividade exploratória na sessão treino. Na sessão teste o grupo IPA apresentou aumento no número de cruzamentos e levantamentos em relação à sessão treino, no entanto, o grupo lúpulo apresentou diminuição nos números de cruzamentos e levantamentos em relação à sessão treino. No teste suspensão pela cauda, a cerveja

IPA não apresentou efeito antidepressivo. Em relação à genotoxicidade e mutagenicidade, os resultados demonstram que os grupos tratados com cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo não apresentaram ação genotóxica e mutagênica no sangue, cérebro, coração e fígado. A ação antígenotóxica da cerveja IPA e lúpulo foi observada nos modelos *in vivo* e *ex-vivo*, apresentando redução nos danos ao DNA causado pela CP de forma semelhante. Em relação à atividade antimutagênica, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos e a formação de micronúcleos pela CP. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o consumo crônico moderado da cerveja IPA e da infusão de lúpulo apresentaram ação antioxidante e antígenotóxica em camundongos.

Palavras-chaves: Cerveja artesanal IPA; Antioxidante; Genotoxicidade; Mutagenicidade.

ABSTRACT

Beer is one of the most consumed fermented alcoholic beverages worldwide, being a source of carbohydrates, amino acids, minerals, vitamins and polyphenols. Moderate consumption of beer can exert beneficial effects on human health and provide protection against chronic diseases such as cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and cancers. Craft beers, such as the IPA type, have a greater variety of phenolic compounds when compared to other types, due to their high proportion of hops, which have antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial substances. Thus, the objective of this work was to evaluate the behavioral parameters and genotoxic/antigenotoxic and/or mutagenic/antimutagenic effect of the consumption of artisanal IPA beer. 64 adult male Swiss mice were used, divided into 8 groups: Group 1 and 2 - Water; Group 3 and 4- IPA; Group 5 and 6 - Alcohol 7%; Group 7 and 8- Hops. The animals received water, IPA beer, 7% alcohol and hops through the hydration bottle for 30 days. On days 27th, 28th and 29th, behavioral tests were performed to assess exploratory, locomotor and antidepressant activity in mice. After this period, the animals underwent genetic evaluations through the Comet Assay *ex-vivo* and *in vivo*. For the *ex-vivo* evaluation, the blood of animals in groups 2, 4, 6 and 8 was collected on the 30th day of treatment and exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). For the *in vivo* evaluation, the cyclophosphamide (CP) alkylating agent was administered at a concentration of 50 mg/Kg in groups 2, 4, 6 and 8 after blood collection for the *ex-vivo* assay, while a 1mL/Kg saline solution was administered intraperitoneally in control groups 1, 3, 5 and 7. After 4 hours, a new blood collection was performed in all groups to perform the Comet Assay. On the 31st day, 24 hours after CP and saline solution administration, the animals were euthanized for dissection of the brain, liver and heart to perform the Comet Assay and dissection of the femurs to remove the bone marrow for the Micronucleus Test. In the behavioral parameters, the results demonstrate that in the Open Field Test, all the animals presented exploratory activity in the training session. In the test session, the IPA group showed an increase in the number of crossings and lifts in relation to the training session, however, the hops group showed significant decrease in the numbers of crossing and rearing in comparison to the training session. In the tail suspension test, the IPA beer did not have an antidepressant effect. Regarding genotoxicity and mutagenicity, the results demonstrate that the groups treated with IPA beer, 7% alcohol and hops did

not show genotoxic and mutagenic action in the blood, brain, heart and liver. The antigenotoxic action of IPA beer and hops was observed in both *in vivo* and *ex-vivo* models, showing a similar reduction in DNA damage caused by CP. Regarding the antimutagenic activity, it was observed that there was no significant difference between the groups and the formation of micronuclei by CP. In conclusion, our results demonstrated that moderate chronic consumption of IPA beer and hops infusion showed antioxidant and antigenotoxic action in mice.

Keywords: Craft beer IPA; Antioxidant; Genotoxicity; Mutagenicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho experimental dos grupos.	32
Figura 2. Linha do tempo.	33
Figura 3. Teste comportamental de habituação ao campo aberto em camundongos machos que receberam (Cerveja IPA, Álcool 7% e lúpulo)	41
Figura 4. Teste comportamental de suspensão pela cauda em camundongos machos que receberam (Cerveja IPA, Álcool 7% e lúpulo).	42
Figura 5. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico, córtex cerebral, coração e fígado de camundongos que receberam água, IPA, álcool 7% e lúpulo por 30 dias e expostos à solução salina (1mL/kg).....	43
Figura 6. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em (A) sangue total periférico, (B) córtex cerebral, (C) coração e (D) fígado de camundongos durante o consumo crônico de água, IPA, álcool 7%, lúpulo e expostos ao agente CP (50 mg/Kg).	45
Figura 7. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico de camundongos que consumiram água, IPA, álcool 7% e lúpulo e foram expostos ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) ex vivo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão média diária de líquidos por animal (mL/kg) e peso corporal final (g).	39
Tabela 2. Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em medula óssea de camundongos Swiss machos, durante o consumo de cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo e água.	47
Tabela 3. Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em medula óssea de camundongos Swiss machos, durante o consumo de cerveja IPA, álcool, lúpulo e expostos ao agente alquilante ciclofosfamida.	48

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABV: álcool por volume

IBU: *International Bitterness Units scale*

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

OMS: Organização Mundial de Saúde

BJCP: *Beer Judge Certification Program*

CP: Ciclofosfamida

DMT2: Diabéticas do tipo 2

EPC: Eritrócitos policromáticos

EPCMn: Eritrócitos policromáticos micronucleados

IAAs: Iso- α -ácidos

IQ: 2-amino-3-metilimidazol (4,5-f) quinolina

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

DNA: ácido desoxirribonucleico

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CONCEA: conselho nacional de controle de experimentação animal

ROS: Espécies reativas de oxigênio

IPA: *Indian Pale Ale*

HDL: Lipoproteína de alta densidade

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

XN: Xanthohumol

Caco-2: Células intestinais humanas

8PN-8: 8- prenilnaringenina

CYP: Citocromo P450

L: Litros

mL: Mililitro

MN: Micronúcleo

OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBS: tampão fosfato

RNA: ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Cerveja.....	20
1.2 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante da cerveja	22
1.3 Genotoxicidade e mutagenicidade	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.1.1 Objetivos específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Critérios Éticos.....	30
3.1.1 Comissão de Ética no uso de animais (CEUA).....	30
3.2 TRATAMENTOS	30
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 Eutanásia dos animais	33
3.5 Consumo de líquidos e peso corporal final.....	33
3.6 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	34
3.6.1 Habituação ao Campo aberto (<i>OPEN FIELD</i>).....	34
3.6.2 Teste de Suspensão pela cauda	34
3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE.....	35
3.7.1 Ensaio Cometa <i>ex-vivo</i>	35
3.7.2 Ensaio Cometa alcalino.....	36
3.7.3 Teste de micronúcleos (MN)	37
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Ingestão de líquidos.....	39
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	39
4.2.1 Habituação ao Campo aberto (<i>OPEN FIELD</i>).....	39
4.2.2 Teste de suspensão pela cauda	41

4.3 Análise da genotoxicidade da cerveja IPA e dos seus subprodutos através do EnsaioCometa.....	42
4.4 Análises da antigenotoxicidade da cerveja IPA e seus subprodutos através do EnsaioCometa.....	43
4.5 Análise da antigenotoxicidade da cerveja IPA através do desafio do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	46
4.6 Mutagenicidade da cerveja IPA	47
4.7 Antimutagenicidade da cerveja IPA	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO A – CEUA.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cerveja

A cerveja é uma bebida alcoólica rica em compostos químicos de origem natural com alto valor nutricional e biológico. Em sua composição estão presentes a água, malte (produto resultante da germinação parcial dos grãos da cevada), lúpulo, leveduras e adjuntos cervejeiros (Di Domenico et al., 2020). Os principais nutrientes são os carboidratos, aminoácidos, minerais, vitaminas e outros compostos, como os polifenóis, que são responsáveis pelos muitos benefícios associados à saúde (Molina et al., 2019; Ascensión et al., 2021).

Em 2018, o consumo global de cerveja foi de 188,70 bilhões de litros e a produção global foi de 192,94 bilhões de litros (Kirin Beer University, 2019). O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo (14,1 bilhões de litros/ano), o terceiro maior consumidor (12,7 bilhões de litros/ano) e se encontra na 28ª posição do ranking de consumo per capita mundial, com 60 litros por ano (Kirin Beer University, 2019; Sindicerv, 2021).

Atualmente, existe uma grande variedade de estilos de cervejas categorizadas de acordo com etapas do processo de fabricação: fermentação; coloração; teor de alcoólico; aditivos adicionados; conteúdo do extrato ou origem (Wunderlich e Back, 2009; Donadini et al., 2014; Strong and England, 2015). Cada estilo de cerveja possui propriedades organolépticas específicas que abrangem as percepções gustativas, visuais e aromáticas (Vera et al., 2011; Humia et al., 2019; Koller e Perkins, 2022).

De forma mais ampla, pode-se citar três grandes tipos/famílias de cervejas classificadas de acordo com seu processo de fermentação: Lagers (baixa fermentação), Ales (alta fermentação) e Lambics (fermentação espontânea). Durante o processo de fabricação da cerveja, a levedura é utilizada para a fermentação, onde seu principal papel é converter carboidratos em etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos metabólicos que contribuem para a composição química e propriedades sensoriais da cerveja (Gorter et al., 2019; Guido, 2016).

As cervejas do tipo Lager, entre elas as mais populares Pilsener e Pilsen, apresentam aroma e sabor mais suaves e porcentagem alcoólica entre 4% e 5%. Seu processo de fabricação ocorre por um processo lento através de leveduras de baixa

fermentação (*Saccharomyces carlsbergensis*, *S. pastorianus* ou *S. uvarum*), com temperaturas entre 7 a 15°C, levando geralmente em média de 3-5 dias. Em contraponto, cervejas do tipo Ale com destaque para o estilo India Pale Ale (IPA) são elaboradas por meio de leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*), também denominadas como fermentação de “topo”. Esse processo ocorre entre 16°C e 25°C de temperatura, com duração de 3 a 5 dias, sendo o armazenamento realizado entre 4,5°C e 8°C (Giovenzana et al., 2014).

De acordo com o *Beer Judge Certification Program* - BJCP (2015), o termo “IPA” é usado para descrever uma cerveja com índice de amargor elevado devido sua alta concentração de lúpulo e porcentagem alcoólica variando entre 4% a 8%.

Nas últimas décadas, a indústria cervejeira foi acometida pelo ressurgimento da cervejaria artesanal, a qual está em constante transformação devido à preocupação dos produtores em apresentar produtos únicos, autênticos e de alta qualidade, com características sensoriais particulares diferentes daquelas oferecidas ao mercado consumidor por grandes corporações. Além das características sensoriais, muitos consumidores têm buscado produtos que possam trazer possíveis benefícios à saúde (Gómez-Corona et al., 2016; Donadini e Porretta, 2017).

Segundo Wunderlich et al. (2005) a cerveja artesanal (*craft beer*) é produzida com ingredientes diferenciados, com matérias primas de melhor qualidade, com nenhum ou poucos aditivos químicos e adjuntos. Um dos grandes diferenciais nestes tipos de cervejas é a maior concentração de lúpulo em sua composição em relação às cervejas comerciais, sendo este responsável pela segunda maior fonte de polifenóis presentes na cerveja, encontrado-se atrás apenas do malte (Gerhards et al., 2020). Brányik et al. (2012) e Gaetano et al. (2016), sugerem que os compostos fenólicos presentes na cerveja podem induzir efeitos positivos à saúde se o consumo for moderado.

Em relação ao consumo de álcool, estudos relatam seu efeito tóxico ao organismo quando consumido em excesso, ou “*binge drinking*”, padrão de consumo caracterizado pela ingestão de grandes quantidades de álcool em um curto período de tempo (IARC, 1988; Loconte et al., 2018; Martín et al., 2020). O consumo de álcool, particularmente o consumo pesado, é um importante fator de risco para muitos problemas de saúde e fatores socioeconômicos (Rehm, 2011; Collins, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que 3 milhões de mortes em todo o mundo são atribuídas ao consumo de álcool (Who, 2018). O abuso de álcool

está associado à doenças não transmissíveis, incluindo câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas ocasionadas pelo álcool. Em 2020, estimou-se que 4,1% de todos os novos casos de cânceres foram atribuídos ao consumo de álcool (Rehm, 2011). Em 2012, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou formalmente as bebidas alcoólicas e o acetaldeído, o principal metabólito do etanol, como carcinógenos tipo I para humanos.

O acetaldeído pode danificar diretamente o DNA pela formação de adutos mutagênicos de DNA e ligações cruzadas entre cadeias. Além disso, sabe-se que o etanol afeta os padrões epigenéticos de metilação e acetilação, que são importantes reguladores da expressão gênica. A hipometilação induzida pelo etanol pode ativar a expressão de oncogenes que subsequentemente podem resultar em transformação maligna nas células (Brooks et al., 2005; Hoes et al., 2021).

No entanto evidências atuais sustentam que doses baixas e moderadas são consideradas seguras devido a alguns efeitos benéficos, demonstrando efeitos tais como cardioprotetores, neuroprotetores e com redução de risco de demência, inclusive do tipo Alzheimer (Arnett et al., 2019; Piepoli et al., 2020; Muñoz et al., 2015).

1.2 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante da cerveja

O estresse oxidativo tem sido reconhecido como envolvido na patologia de várias doenças humanas. Compostos bioativos com atividades antioxidantes presentes na dieta podem ajudar a neutralizar os efeitos negativos promovidos pelo estresse oxidativo (Liguori et al., 2018). Estudos têm demonstrado evidências de que compostos bioativos como os compostos fenólico, também conhecidos por polifenóis, apresentam atividade antioxidante tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Maietti et al., 2017; Câmara et al., 2021). A atividade antioxidante destes compostos ocorre devido a capacidade de doar elétrons, hidrogênio ou formar adutos com espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) e de nitrogênio (Gaetano et al., 2016; Kumar e Goel, 2019).

Segundo Truzzi et al. (2021) os polifenóis são metabólitos secundários de plantas, caracterizados por um anel aromático e vários grupos hidroxila ligados. Esses compostos oferecem proteção à planta contra patógenos, radicais livres de oxigênio, raios UV e parasitas. Atualmente, são reconhecidas cerca de 8.000 variantes de

compostos fenólicos encontrados em frutas, vegetais e bebidas e, de acordo com o número de anéis fenólicos que contêm, podem ser classificados em quatro subclasses principais: flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos (como o resveratrol) e lignanas (Truzzi et al., 2021)

Os polifenóis são de longe os antioxidantes dietéticos mais abundantes nos alimentos. Dependendo da composição da dieta a ingestão de polifenóis podem variar entre 2600 à 3000 mg/dia, particularmente em consumidores de vinho, café, cerveja, chocolate e chá, superando largamente a de outros antioxidantes como vitamina E, vitamina C, β -caroteno (Ovaskainen et al., 2008; Cyunczyk et al., 2022). Cerca de 20-30% dos polifenóis da cerveja são originados do lúpulo, enquanto os 70-80% restantes vêm do malte (Gomez et al., 2020). Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que o consumo prolongado de alimentos ricos em polifenóis oferece proteção contra o desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças degenerativas (Grosso et al., 2017; Rienks et al., 2017; Micek et al., 2021).

A atividade antioxidante e o teor de polifenóis presentes na cerveja associados ao seu baixo teor alcoólico são fatores relevantes na avaliação da qualidade nutricional da mesma. A ingestão moderada de cerveja foi associada a efeitos favoráveis na função do HDL, aumentando sua capacidade de proteger contra a oxidação do LDL e aumentar o efluxo de colesterol, o que pode prevenir a deposição de lipídios na parede do vaso e ter efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular (Padro et al., 2018; Nardini e Foddai, 2020).

Em um estudo comparando alguns tipos de cervejas artesanais foi identificado que a cerveja do tipo IPA, originalmente composta com uma alta proporção de lúpulo possui uma maior variedade de compostos fenólicos quando comparado com os demais tipos. Portanto, mudanças na proporção ou no tipo de composto utilizado na fabricação da cerveja têm impacto nos compostos fenólicos e por sua vez, influencia os parâmetros de qualidade no resultado final da cerveja (CHEIRAN et al., 2019). Dentre os compostos fenólicos derivados do lúpulo destacam-se o ácido gálico, ácido ferúlico, os flavonóides (quercetina), as chalconas (xanthohumol e isoxanthohumol) e as flavanonas (prenilnaringenina). Alguns compostos mais complexos também podem estar presentes na cerveja, como catequinas e taninos (Gribkova et al., 2022)

Shafreen et al. (2020) investigaram a interação entre as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos de cervejas com diferentes tipos de proteínas

séricas responsáveis por benefícios à saúde, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*. O estudo revelou que os componentes da cerveja enriquecidos com flavonóides e ácidos fenólicos interagem com as principais regiões das proteínas séricas para aumentar suas propriedades antioxidantes e de ligação. Ainda, ele relata que o consumo da cerveja aumenta significativamente o teor de flavonóides e ácido fenólico no plasma, promovendo benefícios para a saúde cardiovascular.

Estudo conduzido por Miranda et. al. (2016) avaliou os efeitos do xanthohumol (XN), um flavonóide encontrado no lúpulo e na cerveja, sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios em um modelo pré-clínico de síndrome metabólica. Quarenta e oito camundongos, foram divididos aleatoriamente em três grupos com 16 animais cada (2 doses de XN e grupo controle). Os camundongos foram alimentados com uma dieta rica em gordura (60% kcal como gordura) suplementada com XN em doses de 0, 30 ou 60 mg/kg de peso corporal/dia por 12 semanas. O XN melhorou a hiperglicemia, dislipidemia, resistência à insulina e resistência a leptina em camundongos. Além disso, o XN reduziu o colesterol total e o LDL-C e diminuiu os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias que podem ter contribuído para promoção da obesidade em camundongos.

Di Domenico et al. (2020), avaliaram o efeito dos polifenóis da cerveja e sua biodisponibilidade em células-tronco dentais e células intestinais humanas (Caco-2). Os resultados registraram bons valores de biodisponibilidade e ação anti-senescente para todas as frações de cerveja analisada, sugerindo que o uso de polifenóis pode ser capaz de neutralizar o estresse oxidativo e a senescência celular, sendo esta uma importante ferramenta terapêutica para doenças relacionadas ao envelhecimento.

Em um estudo, Costa et al. (2017), buscaram analisar os efeitos do xanthohumol e da 8-prenilnaringenina (8PN), dois polifenóis derivados da cerveja no metabolismo lipídico e glicolítico do fígado e do músculo esquelético em modelo de DM2 em camundongos. Os compostos foram ofertados durante 20 semanas aos camundongos. Testes de glicemia de jejum e tolerância à insulina foram realizados. Ao final do estudo, sangue, fígado e músculo esquelético foram coletados. Ambos os tratamentos XN e 8PN preveniram o ganho de peso corporal; diminuíram os níveis de glicemia, triglicerídeos, colesterol e fosfatase alcalina; e melhoraram a sensibilidade à insulina. Os polifenóis promoveram a ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) hepática e muscular esquelética, suprimindo assim a

lipogênese. Assim, foi sugerido que a dieta enriquecida com XN ou 8PN pode melhorar os distúrbios metabólicos no diabetes, regulando as vias da glicose e lipídios.

Caon e colaboradores (2021) investigaram o efeito do consumo moderado de cerveja sobre parâmetros redox e integridade hepática em ratos Wistar submetidos a tetracloreto de carbono (CCl₄). Foi analisado o potencial antioxidante de oito cervejas de cinco estilos diferentes (quatro marcas diferentes, globais, do tipo Lager e quatro obtidas de uma cervejaria artesanal, local, de Porto Alegre, no sul do Brasil). As cervejas artesanais apresentaram maiores propriedades antioxidantes quando comparadas com as do tipo Lager comerciais, bem como demonstraram efeito protetor nas gorduras abdominais e no estado redox do soro e fígado, sugerindo que o consumo diário moderado da cerveja não é prejudicial e pode aumentar o estado redox enzimático e não enzimático após a lesão hepática induzida por CCl₄. Ainda, os compostos fenólicos presentes na cerveja são capazes de ativar vias horméticas de proteção antioxidante.

1.3 Genotoxicidade e mutagenicidade

O desequilíbrio celular pró-oxidativo/antioxidativo entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade dos mecanismos de defesa dos sistemas biológicos em eliminar os distúrbios do estresse celular leva à um círculo vicioso, uma vez que o estresse oxidativo agrava mutuamente a produção de ROS (Dumanovic et al., 2021). A produção excessiva de ROS é capaz de modificar a estrutura de macromoléculas, como lipídios, proteínas e DNA, ocasionando neste último caso, genotoxicidade e mutagenicidade (Bhatti et al., 2017; Basu e Nohmi, 2018).

A Genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucleico), processo este classificado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Erdtmann, 2003).

A mutagenicidade se refere às variações transmissíveis permanentes na quantidade e estrutura de materiais genéticos de células ou organismos que podem

aumentar a frequência de mutações. Portanto, a genotoxicidade engloba a mutagenicidade, mas nem todas as substâncias genotóxicas são mutagênicas. Assim, efeitos genotóxicos podem ser definidos como efeitos potencialmente prejudiciais ao material genético que ocorrem como consequência de um dano induzido ao DNA (Ren et al., 2017). Esses danos podem ser endógenos, devido à produção excessiva de ROS e radicais livres, gerados a partir de processos metabólicos fisiológicos ou exógenos, ocasionados por agentes químicos, físicos e biológicos (Juan et al., 2021). Uma vez que a integridade e estabilidade do DNA são essenciais para a vida e para a manutenção das funções celulares normais, quando não reparados adequadamente, os danos podem aumentar o risco de mutagênese (Mahat et al., 2018; Del Bo et al., 2019).

Alterações mutagênicas que ocorrem nas células germinativas são hereditárias e transmitidas à progênie. Nas células somáticas as mutações podem não se manifestar e afetar um indivíduo devido aos processos reparadores e compensatórios do organismo. No entanto, uma mutação somática que altera os padrões de divisão celular pode eventualmente resultar no aparecimento de processos fisiopatológicos complexos, incluindo o câncer (Miles e Tadi, 2021). Na maioria dos casos, a parte danificada ou alterada do DNA é removida pela DNA polimerase durante o processo de reparo celular. Porém, as mutações causadas por agentes mutagênicos podem escapar desse processo de reparo celular e, assim, adquirir um status de mudança “*permanente*” no DNA (Tiwari e Wilson, 2019). As modificações hereditárias que ocorrem num locus gênico específico são chamadas mutações gênicas ou pontuais, que podem envolver substituição, adição ou perda de uma única base, alterando geralmente apenas o funcionamento do gene. Se as modificações forem maiores, alterando os cromossomos, elas são denominadas mutações cromossômicas, sendo mutações que modificam a estrutura dos cromossomos e mutações numéricas as que alteram o seu número (Bossa et al., 2018; Jackson et al.2018).

Eventualmente a mutação gênica e cromossômica podem se sobrepor, como por exemplo, uma translocação pode destruir a estrutura de um gene. Pode também alterar a regulação de genes sem alterar a composição das sub-unidades do DNA, por efeito de posição. Das mutações pode decorrer uma série de problemas, que incluem malformações, câncer, envelhecimento e morte. No entanto, mutações são essenciais para a variabilidade dos seres vivos (Erdtmann, 2003).

Já se tem relatos, hoje em dia, de compostos bioativos e químicos que reduzem ou previnem as mutações, sendo chamados de agentes antimutagênicos ou antigenotóxicos. Além disso, esses compostos têm demonstrado outros efeitos benéficos para a saúde, como ação imunomoduladora, hepatoprotetora, anti-hiperglicêmica, anti-hiperlipidêmica, cardioprotetora, anti-inflamatória e antirreumática, devido às suas excelentes propriedades antioxidantes (López et al., 2018).

Em geral, os antimutagênicos têm sido classificados em desmutagênicos e bioantimutagênicos; o primeiro considera substâncias que promovem a eliminação de agentes genotóxicos do organismo, bem como substâncias que inativam os agentes mutagênicos por interação enzimática ou química antes que o agente cause danos ao DNA. Os bioantimutagênicos são capazes de suprimir o processo de mutação após o DNA ser danificado por agentes mutagênicos, bem como, atuar nos processos de reparo e replicação do DNA, resultando em um declínio na frequência de mutação (Kada et al., 1987; De Flora, 1998; Słoczyńska et al., 2014). De Flora (1998), apresentou como sugestão uma classificação dos inibidores de mutagênese e carcinogênese em três níveis de prevenção, considerando o modo de ação dos mesmos, assim como o ambiente de ação, extra ou intracelular. A prevenção primária inibe a mutação e a iniciação do câncer. A prevenção secundária considera os vários mecanismos que inibem a progressão do tumor à condição de malignidade. A prevenção terciária refere-se à inibição das metástases. Os mecanismos extracelulares envolvidos na prevenção de mutágenos e /ou carcinógenos são: inibição da penetração ou remoção do agente do organismo; formação de complexo inativo, inibição da formação endógena de mutágenos; diluição ou desativação do mutágeno e carcinógeno; e ainda o favorecimento da absorção de agentes protetores. Dentre as vias envolvidas na inibição de mutação e iniciação do câncer por mecanismos celulares, podemos citar: desintoxicação celular; modificação no transporte trans-membrana; modulação do metabolismo celular; inibição da replicação celular; modulação no sistema de reparo do DNA; controle da expressão gênica (De Flora, 1998).

Nesse contexto, os agentes alquilantes são utilizados a fim de avaliar a ação antigenotóxica e/ou antimutagênica de algum composto (Słoczyńska et al., 2014). A ciclofosfamida (CP) é um agente alquilante anticancerígeno amplamente utilizado. Sua

ativação metabólica ocorre pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), seus efeitos anticancerígenos estão associados ao seu metabólito mostarda fosforamida, enquanto o metabólito acroleína está ligado a seus efeitos tóxicos, podendo resultar em tumores secundários e citotoxicidade em células não tumorais. A ação mutagênica e carcinogênica de várias substâncias genotóxicas, como a CP também envolve a geração de radicais livres reativos ao DNA, que sobrecarregam os sistemas de defesa antioxidante endógeno, caracterizando o estresse oxidativo (Delarmelina et al., 2014; Vredenburg et al., 2015).

Assim, em geral, todos os agentes antioxidantes são potenciais inibidores de mutagênese e carcinogênese. No entanto, ainda são escassos os trabalhos que relatem os efeitos a longo prazo do consumo da cerveja do tipo IPA e sua ação no material genético. Uma vez que os polifenóis encontrados na cerveja agem como antioxidantes, eles podem ser capazes de atuar contra a genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vivo* o efeito genotóxico/antigenotóxico e mutagênico/antimutagênico do consumo da cerveja do tipo IPA, avaliar *ex-vivo* o efeito antioxidante desta cerveja assim como o potencial de prevenir danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ e por fim, avaliar os parâmetros comportamentais da capacidade exploratória, locomotora e comportamento do tipo depressivo em camundongos tratados com cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* o efeito de uma cerveja artesanal tipo IPA sobre parâmetros genotóxicos/antigenotóxicos, mutagênicos/antimutagênicos e comportamentais.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar os parâmetros comportamentais da capacidade exploratória, locomotora e comportamento do tipo depressivo em camundongos tratados com cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo.
- b) Avaliar o possível efeito genotóxico e antigenotóxico de uma cerveja do tipo IPA, álcool 7% e lúpulo, através do ensaio cometa em sangue total periférico, córtex cerebral, fígado e coração.
- c) Avaliar o possível efeito mutagênico e antimutagênico de uma cerveja do tipo IPA, álcool 7% e do lúpulo, através do teste de micronúcleo em medula óssea.
- d) Avaliar *ex-vivo* o efeito antioxidativo de uma cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo e o potencial de prevenir danos oxidativos, induzidos pelo H₂O₂ em sangue periférico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Critérios Éticos

Foram utilizados 64 camundongos Swiss machos (30 - 35g), com 60 dias de idade. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.1 Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo número Nº 31/2021), conforme Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 da cidade de Criciúma – SC. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Cuidados foram tomados de modo a evitar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais.

3.2 TRATAMENTOS

A cerveja artesanal puro malte tipo American IPA e lúpulo fervido foram obtidos de uma cervejaria artesanal, localizada na cidade de Içara- SC. Ambos apresentam 15,4 g de lúpulo/L. Na composição de ingredientes da cerveja IPA encontram-se: água, malte, lúpulo, levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Na escala de amargor de 0 à 100 medida em *International Bitterness Units scale* (IBU) está classificada como 67 IBU. O seu álcool por volume (ABV) é de 7%. Foi oferecido água à vontade nas garrafas de hidratação durante todo o ciclo claro-escuro (7:00 às 19:00) e a cerveja IPA e seus compostos isolados (álcool 7% e lúpulo) foram oferecidos em garrafas de hidratação protegidas da luz durante o ciclo escuro (19:00 às 7:00h) por 30 dias de tratamento. Estas dosagens e o tempo de tratamento foram escolhidos de acordo com dados descritos previamente na literatura (Caon et al., 2021). A via de

administração e o período de tratamento foram escolhidos de modo a manter a relevância da aplicabilidade de estudos em humanos. O álcool etílico absoluto 99,8% P.A. (Neon) foi dissolvido em água potável até obtenção do mesmo percentual de 7% presente na cerveja IPA utilizada no tratamento.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental ocorreu em 31 dias totais de experimento, sendo composto inicialmente por 8 grupos experimentais com 8 animais cada (Figura 1).

- Grupos 1 e 2: Água (n=8 cada): Consumo de água disponibilizada *ad libitum* durante 30 dias.

- Grupos 3 e 4: IPA (n=8 cada): Consumo de cerveja IPA e água disponibilizada *ad libitum* durante 30 dias.

- Grupos 5 e 6: Álcool (n=8 cada): Consumo de álcool 7% e água disponibilizada *ad libitum* durante 30 dias.

- Grupos 7 e 8: Lúpulo (n=8 cada): Consumo de lúpulo e água disponibilizada *ad libitum* durante 30 dias.

Os animais receberam água, cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo através da garrafa de hidratação.

Nos 27^o, 28^o e 29^o dias de tratamento os animais passaram pelos testes comportamentais de habituação ao campo aberto (Open Field) para avaliação da capacidade exploratória e locomotora e pelo teste suspensão pela cauda para avaliar a ação depressiva dos compostos nos grupos tratados. No 30^o dia de tratamento, foi coletado sangue de 8 animais dos grupos: 2, 4, 6 e 8 (uma vez que até o 30^o dia os grupos 1, 3, 5 e 7 receberam respectivamente os mesmos tratamentos), através de uma incisão na extremidade da cauda com auxílio de uma micropipeta (10µL) para a realização do ensaio cometa *ex-vivo*. Após 1 hora da coleta de sangue, foi feita a administração intraperitoneal de solução salina 1mL/Kg nos grupos 1, 3, 5 e 7 e do agente alquilante ciclofosfamida (CP) na concentração de 50 mg/Kg nos grupos 2, 4, 6 e 8. Após 4 horas da administração da CP ou solução salina foi realizada uma nova coleta de sangue em todos os grupos para realização do ensaio cometa. No 31^o dia, 24 horas após administração da CP e solução salina, os animais foram eutanasiados

para disseção do cérebro, fígado e coração para realização do ensaio cometa e disseção dos fêmures para retirada da medula óssea para o Teste de Micronúcleos.

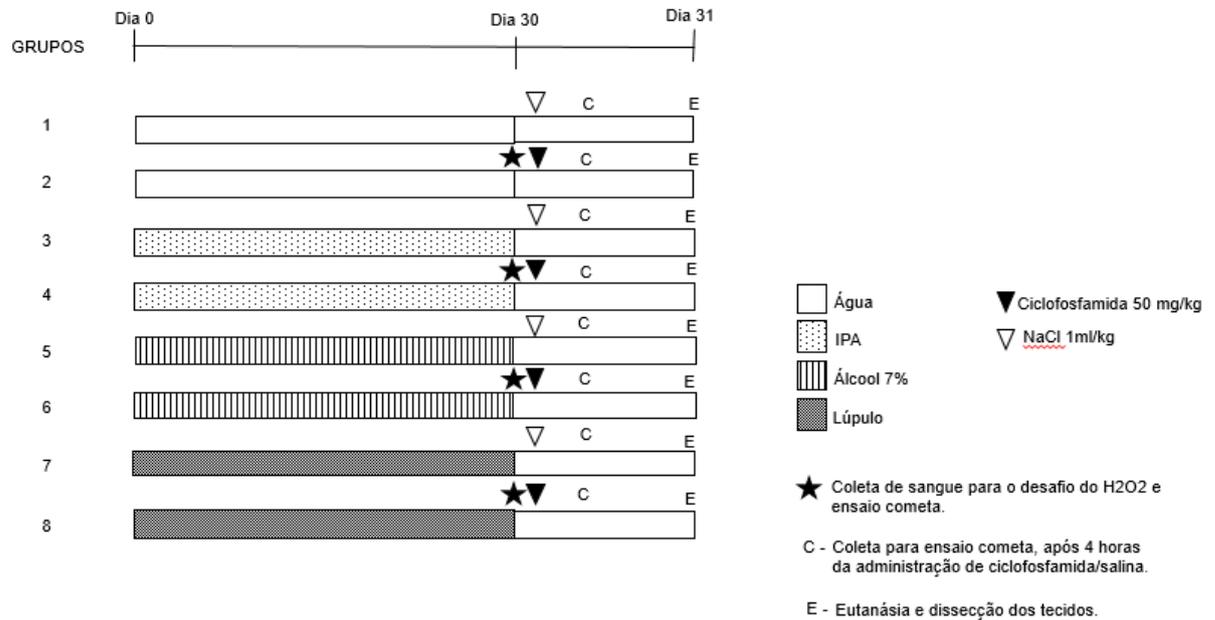


Figura 1. Desenho experimental dos grupos.

Essa quantidade de animais por grupo nos garante melhor homogeneidade do grupo para posteriores análises, uma vez que para esses testes o número amostral mínimo de animal por grupo é 8 animais (Singh et al., 1988; Krishna e Hayashi, 2000). Para melhor entender como ocorreram as coletas, segue a linha do tempo abaixo:

LINHA DO TEMPO

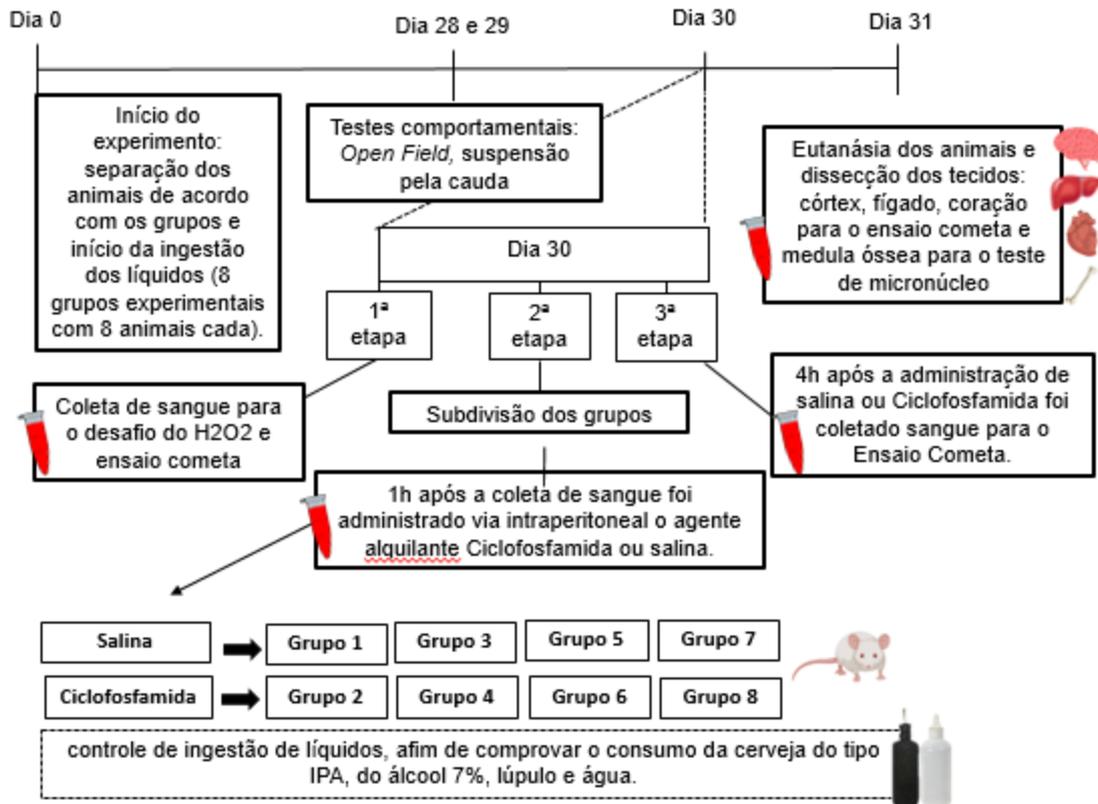


Figura 2. Linha do tempo.

3.4 Eutanásia dos animais

Após o término do tratamento dos diferentes grupos analisados, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue e dissecação do córtex cerebral, fígado, coração e medula óssea. As amostras foram processadas, aliquotadas e armazenadas para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

3.5 Consumo de líquidos e peso corporal final

O consumo de líquidos (água, cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo) foi calculado semanalmente pelo volume de líquidos (mL) fornecidos aos animais e subtraindo o líquido (mL) remanescente da garrafa de hidratação durante todo o experimento (Diniz et al., 2004; Diniz et al., 2005). Os animais foram pesados no final do experimento

para calcular a dosagem adequada de salina e ciclofosfamida que foram injetadas nos animais.

3.6 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Oito animais de cada grupo passaram pelos seguintes testes comportamentais: Habituação ao campo aberto, relacionado à atividade exploratória e locomotora e Teste de suspensão pela cauda, para avaliação da ação depressiva dos compostos estudados. Ressalta-se que os testes não foram executados todos no mesmo dia, uma vez que pode ocorrer alterações.

3.6.1 Habituação ao Campo aberto

Os animais foram colocados no aparato de habituação ao campo aberto, realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino na qual se repetiu o procedimento do treino. Foram medidos os números de “cruzamentos” através das linhas pretas e o número de “levantamentos” medidos pelas vezes que o animal permanece nas duas patas traseiras, esses parâmetros foram avaliados em ambas as sessões (Prut e Belzung, 2003).

3.6.2 Teste de Suspensão pela cauda

Neste teste foi analisado o tempo total de imobilidade do animal, em um total de 6 minutos de teste. No teste, os camundongos foram isolados em uma plataforma sendo suspensos pela cauda a uma altura de 50 cm do chão, utilizando para tanto uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. É proposto que substâncias com atividade não depressiva diminuam o tempo de

imobilidade dos animais neste teste, sem alterar a sua atividade locomotora (Steru et al., 1985).

3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizados sangue periférico, córtex cerebral, coração e fígados dos camundongos para a realização do ensaio cometa, e medula óssea para realização do teste de micronúcleos. Após os tratamentos, foram coletadas amostras de sangue no 30º dia de todos os animais dos grupos: água (grupo 2), IPA (grupo 4), álcool 7% (grupo 6) e Lúpulo (grupo 8), através de incisão na extremidade da cauda, retirando sangue da veia caudal com auxílio de uma micropipeta (10µL) para a realização do ensaio cometa *ex-vivo*, desafio com H₂O₂ e Ensaio Cometa normal. Ainda no 30º dia, 4 horas após a administração intraperitoneal de solução salina (grupos 1, 3, 5 e 7) e ciclofosfamida (grupos 2, 4, 6 e 8), foi realizada uma nova coleta de sangue através de incisão na extremidade da cauda de todos os animais.

No dia 31 os animais foram eutanasiados para dissecção do cérebro, fígado e coração para realização do ensaio cometa e dissecção dos fêmures para retirada da medula óssea para o Teste de Micronúcleos.

3.7.1 Ensaio Cometa *ex-vivo*

Foi coletado sangue da veia caudal dos animais dos grupos: água (grupo 2), IPA (grupo 4), álcool 7% (grupo 6) e Lúpulo (grupo 8) para realização da versão do ensaio cometa *ex-vivo* de acordo com o protocolo de Pereira et al., 2005.

O sangue coletado foi colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue (alíquotas de 5 µL de sangue total) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 µL) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levadas, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos à 4°C para solidificação.

Após a solidificação, as lâminas contendo as células foram tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio 0,20 mM em PBS por 5 minutos a 4°C e, após

lavadas três vezes com solução de NaCl 0,9%. Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) à 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 24 horas. Decorrido este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos para desenovelamento do DNA, e a corrida eletroforética realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30 v e 300 mA por 35 minutos. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise.

Um total de 100 células por indivíduo (50 células por duplicata) foram analisadas usando o sistema de análise de imagem semi-automatizado *Comet Assay IV* (*Perceptive Instruments*, UK). As análises microscópicas foram realizadas em um microscópio de fluorescência (*Eclipse E400*, *Nikon Instruments*, Japão), com objetiva de 40X. A porcentagem de DNA na cauda do cometa (% TDNA) foi o parâmetro usado para avaliar o dano do DNA.

3.7.2 Ensaio Cometa alcalino

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue ou de tecido (alíquotas de 5 µL ou alíquotas de 10 µL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 µL ou 110 µL, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30 v e 300 mA por 35 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca

amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise.

Um total de 100 células por indivíduo (50 células por duplicata) foram analisadas usando o sistema de análise de imagem semi-automatizado *Comet Assay IV* (*Perceptive Instruments*, UK). As análises microscópicas foram realizadas em um microscópio de fluorescência (*Eclipse E400*, *Nikon Instruments*, Japão), com objetiva de 40X. A porcentagem de DNA na cauda do cometa (% TDNA) foi o parâmetro usado para avaliar o dano do DNA (Collins et al., 1997).

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.7.3 Teste de micronúcleos (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000). O mesmo seguiu o protocolo sob número 474 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (a "OCDE"), atualizado em 2016. Sendo aceito e frequentemente revisado por agências internacionais e comitês de harmonização (OCDE, 2016).

Para a realização do teste foi realizada a extração da medula óssea. Após a extração, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 500 eritrócitos/animal. A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 4000 EPCs para cada animal (ou seja, 2000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de habituação ao campo aberto foi analisado pelo teste *t*-student comparando a sessão treino e teste, sendo os dados representados como média \pm erro padrão da média (média \pm EP). O teste de suspensão pela cauda foi analisado pelo teste análise de variância ANOVA one-way, e não foi seguido por *post-hoc* pois o valor de $p > 0,05$. Os dados são representados como média e desvio padrão da média (média \pm DP).

Para os ensaios genotóxicos os dados foram expressos como média e desvio padrão da média (média \pm DP). O teste *t*-student foi utilizado para se fazer a comparação dos parâmetros com distribuição normal em relação às comparações dos grupos experimentais. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão de líquidos

Durante o período de tratamento o volume de líquidos consumido foi quantificado e dividido pelo número de animais por gaiola, semanalmente. No último dia de tratamento foi feita a pesagem corporal final dos animais para calcular adequadamente a dose injetada de salina e ciclofosfamida. A tabela 1 mostra a ingestão média diária de líquidos por animal e o peso corporal final.

Tabela 1. Ingestão média diária de líquidos por animal (mL/kg) e peso corporal final (g).

Grupos	Água (mL)	Tratamento (mL)	Total de líquidos (mL)	Peso Final (g)
Água	7,27 ± 1,09	-	7,27 ± 1,09	34,31 ± 3,44
Cerveja IPA	4,98 ± 1,76	8,71 ± 2,85	13,69 ± 2,63	33,25 ± 4,00
Álcool 7%	7,80 ± 4,27	5,08 ± 2,28	12,88 ± 1,92	35,10 ± 4,42
Lúpulo	6,10 ± 2,20	7,40 ± 3,97	13,50 ± 0,92	34,43 ± 2,53

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de líquidos e peso corporal final (n=8 animais por grupo).

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os grupos tratados foram submetidos a comportamentos que avaliam atividade exploratória, locomotora e ação depressiva dos compostos através dos testes de habituação ao campo aberto (Figura 3) e de suspensão pela cauda (Figura 4), respectivamente.

4.2.1 Habituação ao Campo aberto

Os dados do teste de habituação ao campo aberto foram analisados pelo teste *t*-student para amostras dependentes. Considerando que bebidas alcoólicas podem induzir efeitos na memória, utilizou-se o teste de habituação ao campo aberto para avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais, onde foi analisado o número de cruzamentos que o animal realizou dentro do aparato, e atividade exploratória, que

é medida através do número de vezes que o animal se levanta nas patas traseiras. A figura 3 (A e B) mostra os resultados da memória de habituação avaliada pelo teste de habituação ao campo aberto referentes ao número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, entre o treino e o teste de animais.

Na figura 3 A, observa-se que a atividade locomotora dos animais que receberam água e lúpulo apresentou diminuição no número de cruzamentos ($p < 0,05$) em relação à sessão treino, demonstrando que não houve dano na memória de habituação dos animais, pois reconheceram o ambiente na sessão teste. Já o grupo que recebeu álcool 7% não apresentou diferença significativa da sessão treino em relação a sessão teste. Em contrapartida, o grupo que recebeu IPA como tratamento apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando um aumento no número de cruzamentos entre o treino e teste, sugerindo que houve dano na memória de habituação dos animais tratados com este composto.

Em relação ao número de levantamentos (figura 3 B), os grupos mantiveram o mesmo desempenho apresentado nos cruzamentos entre o treino e teste. Assim, os animais que receberam água e lúpulo apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), havendo diminuição nos números de levantamentos, demonstrando o reconhecimento do ambiente em que já estiveram explorando menos o aparato. O grupo que recebeu álcool 7% não apresentou diferença significativa entre as sessões treino e teste ($p > 0,05$). Já o grupo que recebeu IPA apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando aumento no número de levantamentos, sugerindo dano na memória exploratória dos animais e por isso, exploraram mais o aparato.

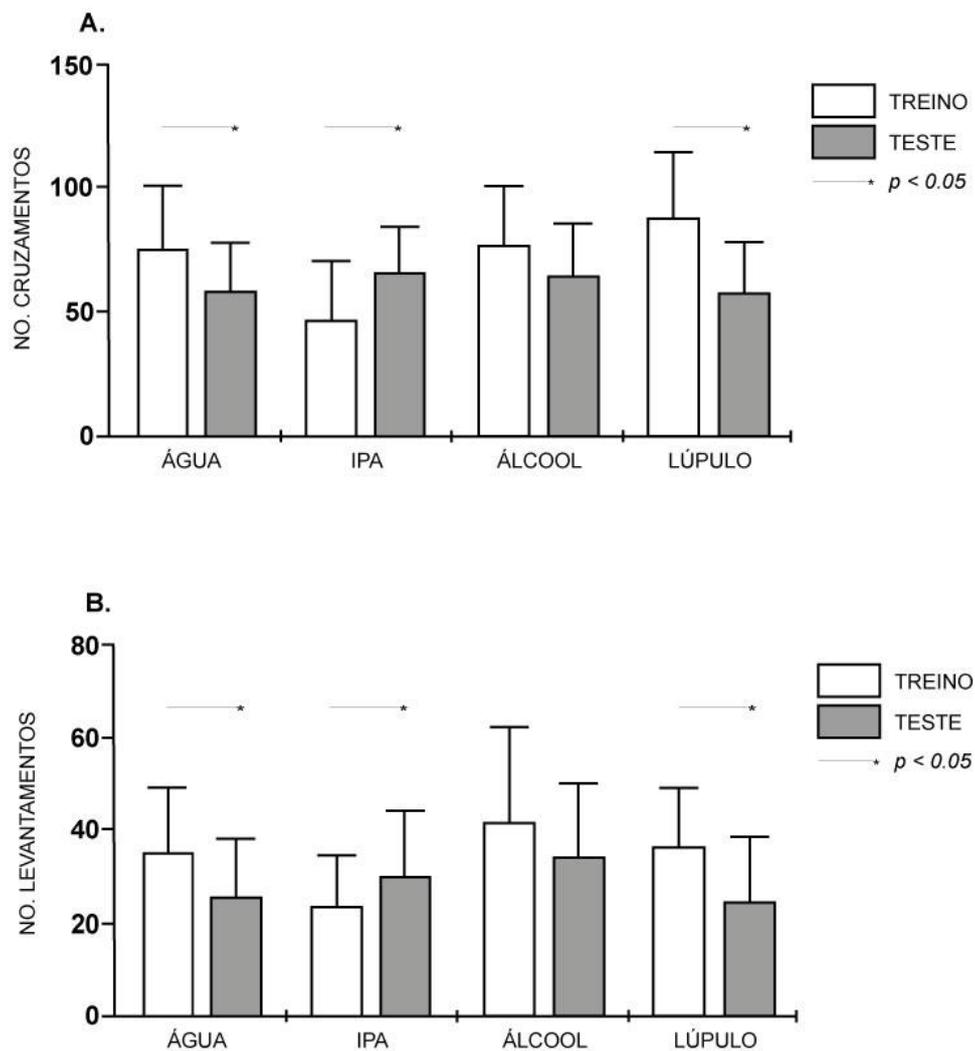


Figura 3. Teste comportamental de habituação ao campo aberto em camundongos machos que receberam (Cerveja IPA, Álcool 7% e lúpulo). A- Número de cruzamentos dos dias treino e teste. B- Número de levantamentos dos dias treino e teste. Os dados foram analisados pelo teste t-student para amostras dependentes. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 9-15$. * $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo na sessão treino.

4.2.2 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda foi aplicado para avaliar a capacidade depressiva da IPA e seus compostos isolados.

Os resultados deste teste podem ser avaliados na figura 4. Os grupos que receberam

IPA, álcool 7% e lúpulo não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle (água) ($p > 0,05$), ou seja, não apresentaram comportamento do tipo depressivo.

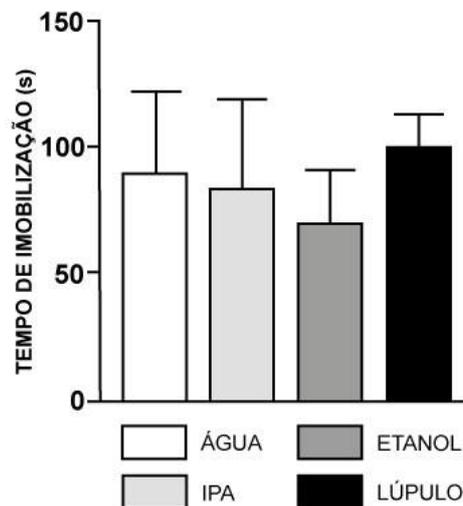


Figura 4. Teste comportamental de suspensão pela cauda em camundongos machos que receberam (Cerveja IPA, Álcool 7% e lúpulo). Os dados foram analisados pelo teste ANOVA one-way, e não foi seguido por post-hoc pois o valor de $p > 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 9-15$.

4.3 Análise da genotoxicidade da cerveja IPA e dos seus subprodutos através do Ensaio Cometa

Após a realização dos testes descritos anteriormente foram analisados os danos causados ao DNA de células sanguíneas, córtex cerebral, coração e fígado de camundongos expostos ao consumo moderado crônico de cerveja do tipo IPA, álcool 7% e lúpulo através do Ensaio Cometa, usado o parâmetro Tail Intensity (%). A figura 5, mostra os resultados referentes a avaliação de genotoxicidade do consumo de IPA, álcool 7%, lúpulo e água através do Ensaio Cometa.

Ao avaliar o Tail Intensity (%), nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu água e os grupos que receberam IPA, álcool 7% e lúpulo. Demonstrando que tanto a IPA, como o álcool 7% e o lúpulo não demonstraram ação genotóxica após o consumo crônico nos diferentes tecidos.

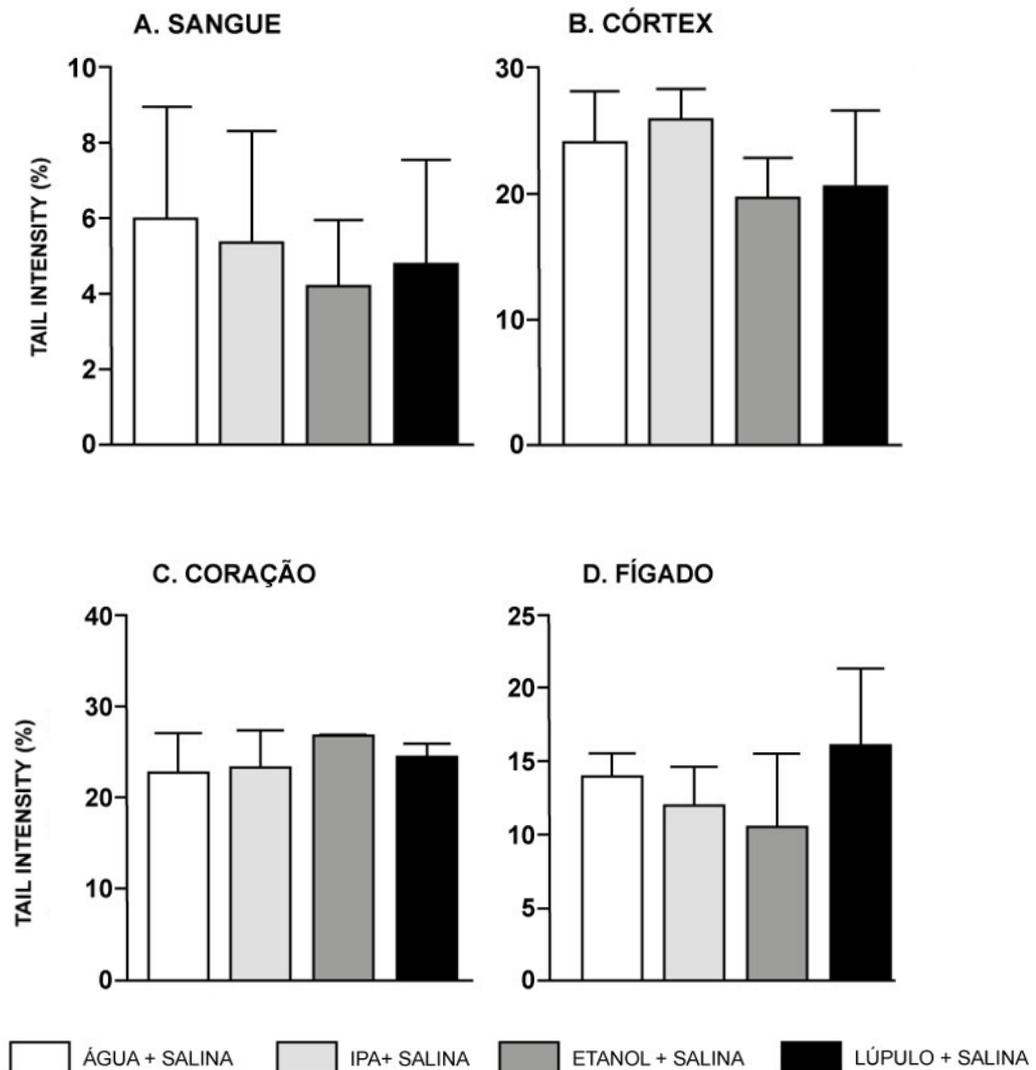


Figura 5. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico, córtex cerebral, coração e fígado de camundongos que receberam água, IPA, álcool 7% e lúpulo por 30 dias e expostos à solução salina (1mL/kg). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=8$ animais por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados ($p > 0,05$, teste t).

4.4 Análises da antigenotoxicidade da cerveja IPA e seus subprodutos através do Ensaio Cometa

Para verificar ação antigenotóxica da cerveja do tipo IPA, álcool 7% e lúpulo após o consumo moderado crônico, os camundongos foram expostos à uma dose de

50mg/kg do agente alquilante CP e 4h após foram analisados os danos em sangue total periférico. Após 24h da exposição a CP, amostras de córtex cerebral, coração e fígado foram analisadas através do Ensaio Cometa (Figura 6).

De acordo com a figura 6 pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa nos danos ao DNA em sangue total periférico, demonstrando que o grupo que recebeu cerveja IPA e lúpulo apresentaram redução nos danos ao DNA quando comparados ao grupo água ($p < 0,05$). Além disso, o grupo que recebeu lúpulo demonstrou danos ao DNA mais baixos em relação ao grupo álcool 7% ($p < 0,05$). Em contrapartida, o grupo que recebeu álcool 7%, apresentou danos maiores ao DNA em relação ao grupo que consumiu cerveja IPA ($p < 0,05$).

Na avaliação dos danos ao DNA no córtex cerebral (Figura 4), os grupos que receberam cerveja IPA e lúpulo demonstraram redução nos danos ao DNA em relação ao grupo água durante o período de experimento ($p < 0,05$). Contudo, o grupo que recebeu álcool 7% não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado aos demais grupos.

Nas células do coração (Figura 6) houve uma diferença significativa entre o grupo que recebeu álcool 7% em comparação ao grupo cerveja IPA ($p < 0,05$) demonstrando que a cerveja IPA apresenta menores níveis de danos ao DNA e maior ação antígenotóxica em relação ao grupo álcool 7%.

No fígado (Figura 6) observa-se que houve uma redução nos danos ao DNA nos grupos que receberam cerveja IPA e álcool 7% quando comparados ao grupo que consumiu água ($p < 0,05$), mostrando que são antígenotóxicos nestas condições experimentais. Em relação ao grupo que recebeu lúpulo, não foram observadas diferenças significativas em relação aos outros grupos, sugerindo que o consumo crônico não demonstra ação antígenotóxica no fígado de camundongos.

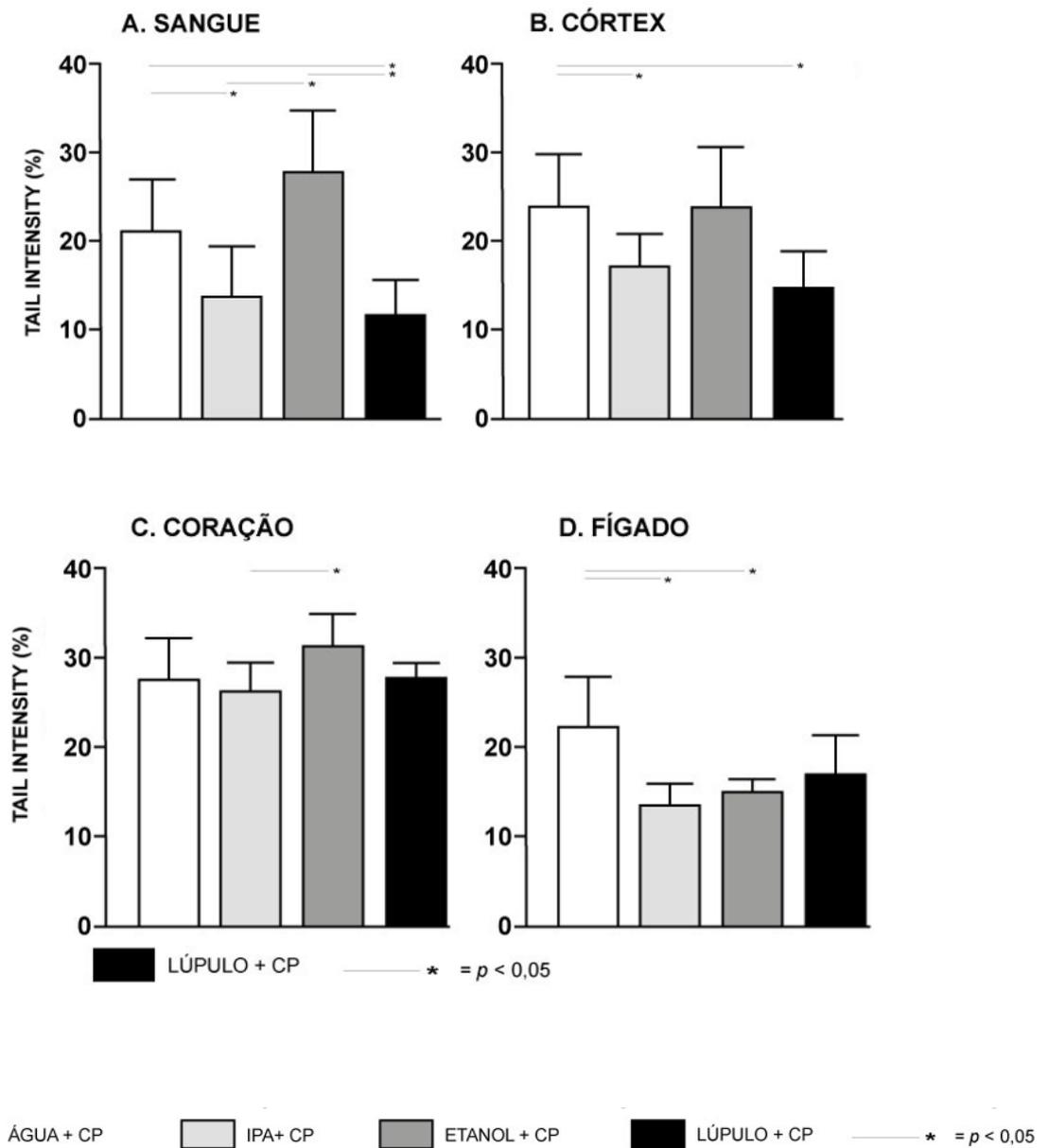


Figura 6. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em (A) sangue total periférico, (B) córtex cerebral, (C) coração e (D) fígado de camundongos durante o consumo crônico de água, IPA, álcool 7%, lúpulo e expostos ao agente CP (50 mg/Kg). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8 animais por grupo). *As extremidades das linhas representam diferença significativa entre os grupos abaixo ($p < 0,05$, teste t).

4.5 Análise da antigenotoxicidade da cerveja IPA através do desafio do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A fim de avaliar a atividade antigenotóxica do consumo moderado crônico da cerveja tipo IPA, e seus componentes isolados (álcool e lúpulo), as células sanguíneas dos camundongos foram desafiadas *ex-vivo* com peróxido de hidrogênio e analisados os danos causados ao DNA através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa (figura 7).

Os valores obtidos nos grupos que receberam cerveja IPA e lúpulo foram significativamente menores em relação ao grupo que ingeriu água ($p < 0,05$, teste t), demonstrando que a cerveja IPA e o lúpulo possuem ação antigenotóxica *ex vivo*.

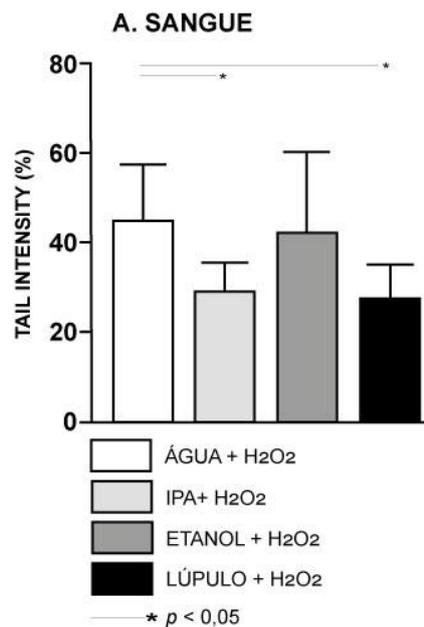


Figura 7. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico de camundongos que consumiram água, IPA, álcool 7% e lúpulo e foram expostos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) *ex vivo*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo água ($p < 0,05$, teste t).

4.6 Mutagenicidade da cerveja IPA

O teste de micronúcleos avaliou se o consumo crônico moderado de cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo promove efeitos mutagênicos nos camundongos durante o período de trinta dias. A tabela 2 apresenta os resultados encontrados neste teste.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no número de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados na medula óssea de camundongos entre os grupos que receberam cerveja IPA, álcool 7%, lúpulo e água. Em relação a proporção de EPC/ENC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade (tabela 2). Estes dados corroboram com os dados encontrados no Ensaio Cometa, demonstrando que a cerveja IPA e seus compostos isolados não demonstram aumentar danos ao DNA de camundongos durante o consumo crônico.

Tabela 2. Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em medula óssea de camundongos Swiss machos, durante o consumo de cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo e água.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
Controle (água) + salina	0,85 ± 0,69	0,51 ± 0,01
IPA + salina	1,75 ± 0,88	0,52 ± 0,01
Álcool + salina	0,83 ± 0,98	0,52 ± 0,04
Lúpulo + salina	0,87 ± 0,99	0,52 ± 0,04

Foram analisadas 4000 células por amostra. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=8 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos (teste t, $p > 0,05$).

4.7 Antimutagenicidade da cerveja IPA

O teste de micronúcleos avaliou se o consumo crônico moderado de cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo foi capaz de proteger dos efeitos mutagênicos induzidos pelo agente alquilante CP em camundongos durante o período de trinta dias de tratamento. A tabela 3 apresenta os resultados encontrados neste teste.

Tabela 3. Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em medula óssea de camundongos Swiss machos, durante o consumo de cerveja IPA, álcool, lúpulo e expostos ao agente alquilante ciclofosfamida.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
Controle (água) + CP	4,00 ± 1,26	0,53 ± 0,03
IPA + CP	3,28 ± 2,21	0,53 ± 0,01
Álcool + CP	3,20 ± 1,78	0,53 ± 0,02
Lúpulo + CP	2,75 ± 1,25	0,52 ± 0,02

Foram analisadas 4000 células por amostra. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=8 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

De acordo com os nossos resultados, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no número de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados na medula óssea entre os camundongos que receberam cerveja IPA, álcool 7%, lúpulo, água e posteriormente foram tratados com o agente alquilante CP, nos (tabela 2), sugerindo que o consumo crônico da cerveja IPA e seus compostos não demonstraram reverter a genotoxicidade ocasionada pelo agente mutagênico CP.

5 DISCUSSÃO

Estudos clínicos tem sugerido que o consumo moderado de cerveja é benéfico para saúde humana, principalmente devido aos seus nutrientes e compostos bioativos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Vazquez-Cervantes et al., 2021; Câmara et al., 2021).

De acordo com Liguori et al. (2018), a atividade antioxidante presente na dieta pode afetar positivamente os efeitos do estresse oxidativo na patogênese de muitas condições clínicas e envelhecimento. Estudos epidemiológicos sobre o consumo moderado da cerveja na saúde humana sugerem que a relação entre uma dieta equilibrada, com grandes quantidades de alimentos ricos em polifenóis associados à baixo teor alcoólico, diminuem os riscos de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Gaetano et al., 2016).

A cerveja artesanal é produzida com ingredientes diferenciados, com matérias primas de melhor qualidade, com nenhum ou poucos aditivos químicos e adjuntos. Um dos grandes diferenciais nestes tipos de cervejas é a maior concentração de lúpulo em sua composição em relação as cervejas comerciais (Wunderlich et al., 2005; Gerhards et al., 2020). Pesquisas comparando alguns tipos de cervejas artesanais relatam que a cerveja do tipo IPA, por ser originalmente composta com uma alta proporção de lúpulo possui uma maior variedade de compostos fenólicos quando comparada aos demais tipos, esse parâmetro influencia na qualidade do resultado final da cerveja (Cheiran et al., 2019; Caon et al., 2021). Além disso, alguns polifenóis específicos derivados da cerveja exercem respostas biológicas interessantes. Elas incluem efeitos antidiabéticos (Costa et al., 2017; Miranda et al., 2016), anticarcinogênicos (Aichinger et al., 2016; Jiang et al., 2018; Stevens et al., 2004), anti-inflamatórios (Everard et al., 2012), capacidade angiogênica, melhora do processo de cicatrização de feridas (Negrão et al., 2012) e antimutagênicos (Wang et al., 2013).

Tendo em vista os benefícios que os antioxidantes proporcionam à cerveja e à saúde humana, o interesse pelo estudo de suas propriedades nutritivas e nutracêuticas, em especial com potencial para a prevenção de numerosas doenças, tem crescido e atraído um interesse considerável de vários pesquisadores.

No presente trabalho, camundongos Swiss machos foram suplementados com

cerveja artesanal do tipo IPA e seus compostos isolados (álcool 7% e lúpulo) afim de avaliar os parâmetros comportamentais, capacidade genotóxica/antigenotóxica e mutagênica/antimutagênica da cerveja tipo IPA, frente a um agente alquilante sabidamente mutagênico como a ciclofosfamida (CP). Durante o período de tratamento, foi mensurado a quantidade de líquidos ingeridos pelos animais e os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas quando comparada a ingestão média de líquidos entre os grupos que receberam água, cerveja IPA, álcool 7% e lúpulo. Achados de estudos anteriores relatam que, semelhante aos humanos, os animais dão preferência para bebidas suaves que não sejam água. Os ratos possuem mecanismos endógenos para a regulação da ingestão calórica (Morton et al., 2014). A cerveja artesanal, por possuir mais calorias em relação aos demais estilos de cerveja, promove aos animais maior saciedade, portanto um menor consumo quando comparado à outras bebidas (Hargreaves et al., 2011; Caon et al., 2021). No entanto, nossos resultados demonstraram que os animais não deram preferência a nenhum tipo de bebida específica, incluindo água.

Em relação ao peso corporal dos animais, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Isso revela que independente do tipo de suplementação oferecida, os animais mantiveram peso adequados e uniformes entre os grupos, o que sugere que a ingestão da cerveja IPA e seus compostos isolados (álcool 7% e lúpulo) não são fatores interferentes no peso dos animais no período de 30 dias. Resultados semelhantes foram apontados por Negrão et al. (2010) e Kolota et al. (2019), onde não foram observadas diferenças na massa corporal em ratos Wistar machos adultos que receberam solução de etanol ou cerveja (ambos contendo 5% de etanol) e aqueles que não receberam álcool por cinco semanas.

O abuso do álcool é um importante problema de saúde em todo o mundo. Estudos anteriores já demonstraram que o álcool, quando consumido em excesso, é capaz de afetar várias partes do cérebro, pois interage com os receptores cerebrais, interferindo na comunicação entre as células nervosas e suprimindo a atividade das vias nervosas excitatórias (Pervin et al., 2021). A ingestão exacerbada de álcool durante um período prolongado de tempo pode ocasionar sérios problemas de cognição e memória (Harper et al., 2005). Por outro lado, o etanol também possui propriedades neuroprotetoras e, em dosagem baixa a moderada, reduz o risco de demência, inclusive do tipo Alzheimer (Brust, 2010; Muñoz et al., 2015). Estudos evidenciam que o consumo da cerveja é ansiolítico, porém atáxico, ou seja, ocasionando prejuízos nas

funções motoras (Gallate et al., 2003). Entretanto, compostos derivados da cerveja podem levar a melhores resultados em testes cognitivos, além de exercer efeito antidepressivo (Lin et al., 2021; Fukuda et al., 2019).

A fim de avaliar os possíveis efeitos do consumo de cerveja IPA e seus compostos isolados, foram realizados primeiramente os testes comportamentais para investigar a atividade exploratória, locomotora e comportamento do tipo depressivo nos animais.

Inicialmente, utilizou-se o teste de habituação ao campo aberto para avaliar a memória de habituação ao campo aberto dos animais. O grupo que recebeu cerveja IPA demonstrou aumento na resposta locomotora e dano na memória exploratória, sugerindo que não reconheceram o ambiente já explorado na sessão treino e que, esses dados podem ser um indicativo de ansiedade nesses animais. Gallate et al. (2003) avaliaram os efeitos ansiolíticos e atáxicos agudos do consumo de cerveja em ratos e os efeitos ansiogênicos da retirada do livre acesso à cerveja. Estes autores demonstraram que os ratos exibiam comportamentos que indicava intoxicação e redução da ansiedade, e que os animais expostos à cerveja de forma crônica exibiam comportamento ansiogênico apenas quando o acesso era interrompido por 24h, sugerindo que o acesso prolongado à cerveja induz dependência de etanol e síndrome de abstinência. Já o grupo que consumiu apenas álcool na mesma proporção presente na cerveja IPA, não demonstrou diferença significativa em relação aos demais grupos. No entanto, o grupo que recebeu lúpulo demonstrou que diminuiu a atividade locomotora dos animais e reduziu a atividade exploratória, diferenças estas observadas em relação à sessão treino, demonstrando que os animais reconheceram o ambiente que já haviam explorado. Em 2019, Ano et al. realizaram um estudo para avaliar se iso- α -ácidos (IAAs), ácidos amargos derivados do lúpulo da cerveja melhoram a memória dependente do hipocampo por meio da ativação do nervo vago. Os autores relataram que o consumo deste composto pode melhorar as funções de memória de reconhecimento espacial e de objetos, não apenas em camundongos controles mas também em camundongos em amnésia induzida farmacologicamente. Foi visto que o consumo de IAAs aumentou os níveis totais e extracelulares de dopamina no hipocampo de roedores, sugerindo que a ativação vagal com componentes alimentares, incluindo IAAs, pode ser uma abordagem fácil e segura

para melhorar as funções cognitivas. Em outro estudo, Sun et al. (2021) investigaram se o xanthohumol, um componente do lúpulo, poderia melhorar o comprometimento da memória e reduzir a deposição da proteína β -amilóide. Como resultado, o xanthohumol reduziu significativamente a deposição de β -amilóide no hipocampo e ativou a autofagia e os sinais antiapoptóticos, melhorando efetivamente o comprometimento da memória.

Já em relação ao teste de suspensão pela cauda, para avaliar o comportamento tipo depressivo nos camundongos, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos. Donoso et al. (2020) avaliaram o potencial terapêutico de uma variedade de polifenóis na reversão do impacto da separação materna no comportamento e no eixo microbiota-intestino-cérebro. Os ratos foram submetidos a uma intervenção dietética com os polifenóis presentes no lúpulo, xanthohumol e quercetina por 8 semanas, demonstrando que os polifenóis foram capazes de prevenir os comportamentos depressivos e ansiosos induzido pelo modelo de separação materna em roedores, onde os efeitos do xanthohumol foram correlacionados com o resgate dos níveis plasmáticos de BDNF. Esses dados corroboram com os achados de Fukuda et al. (2019) que demonstraram uma diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda após o consumo de ácidos amargos do lúpulo amadurecido, relatando a supressão nas produções de citocinas induzidas por lipopolissacarídeos no cérebro e aumento na secreção de noraepinefrina, melhorando assim o comportamento semelhante à depressão. No entanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos subjacentes do consumo moderado da cerveja e seus subprodutos nos parâmetros comportamentais.

Para avaliar a capacidade genotóxica/antigenotóxica da cerveja IPA e seus compostos isolados testados neste estudo, utilizamos os Ensaio Cometa em sangue periférico, córtex, coração e fígado de camundongos. Além disso, como forma de avaliar a atividade antigenotóxica da cerveja IPA e seus compostos isolados, as células sanguíneas dos camundongos foram desafiadas *ex vivo* com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), após a suplementação. O Ensaio Cometa é uma técnica amplamente utilizada para a detecção de efeitos genotóxicos/antigenotóxicos de substâncias naturais, pois avalia vários tipos de danos ao DNA, como quebras de fitas simples e dupla, sítio alcali-lábeis e ligações

cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (Singh, 1988; Liao et al., 2009).

Neste estudo as análises da genotoxicidade através do Ensaio Cometa, demonstraram que o consumo moderado de cerveja IPA e seus compostos não causou danos nas células sanguíneas, em córtex, coração e fígado dos animais tratados. Os valores foram semelhantes ao grupo controle (água), sugerindo que a cerveja IPA e seus subprodutos não exercem atividade genotóxica.

Resultados semelhantes foram citados por Amo et al. (2016). O estudo examinou o potencial nutracêutico da cerveja Blond Lager liofilizada de uma marca conhecida, bem como de dois de seus componentes bioativos: xanthohumol e ácido fólico pelo teste SMART *in vivo* em *Drosophila* e *in vitro* em modelo de células tumorais. Ao final concluíram que doses moderadas de cerveja Blond Lager podem ser recomendadas pois não é genotóxica, além de exercer proteção genômica contra o peróxido de hidrogênio, aumentar a expectativa de vida e inibir o crescimento de células tumorais. Ainda, os autores relatam que o xanthohumol protege contra agentes genotóxicos e que o consumo moderado diário de cerveja pode ser saudável devido às propriedades que a bebida oferece.

Para avaliar o potencial antígenotóxico da cerveja IPA e compostos isolados testados neste estudo foi utilizado um agente alquilante, a CP. A ciclofosfamida (CP) é um agente alquilante anticancerígeno amplamente utilizado. Sua ativação metabólica ocorre pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) e seus efeitos anticancerígenos estão associados ao seu metabólito mostarda fosforamida, enquanto o metabólito acroleína está ligado a seus efeitos tóxicos, podendo resultar em tumores secundários e citotoxicidade em células não tumorais. A ação mutagênica e carcinogênica de várias substâncias genotóxicas, como a CP também envolve a geração de radicais livres reativos ao DNA, que sobrecarregam os sistemas de defesa antioxidante endógeno, caracterizando o estresse oxidativo (Delarmelina et al., 2014; Vredenburg et al., 2015).

Em relação às avaliações de antígenotoxicidade, os resultados demonstraram uma redução nos parâmetros de Tail Intensity (%) induzidos pela CP e H₂O₂ principalmente nos grupos que consumiram Cerveja IPA e lúpulo, havendo uma redução significativa nos danos ao DNA na maior parte dos tecidos avaliados, o que representa ação antígenotóxica. O grupo que consumiu álcool 7% demonstrou ser eficaz na redução dos danos ao DNA apenas no tecido hepático,

mostrando ação antígenotóxica unicamente no fígado.

Uma hipótese para explicar a ação antígenotóxica da cerveja artesanal do tipo IPA encontrada nos resultados está na sua reconhecida ação antioxidante. Os componentes presentes na cerveja acabam agindo sinergicamente e atenuando possíveis danos que componentes isolados poderiam ter (Arimoto et al., 2006). O lúpulo parece ser um dos compostos mais genoprotetores dentre os testados, podendo conferir à cerveja suas propriedades genoprotetoras (Amo et al., 2016). Em concordância com os presentes achados Arimoto et al. (2006) avaliaram o potencial antígenotóxico dos componentes da cerveja contra carcinógenos encontrados na dieta humana, nomeadamente aminas heterocíclicas. Ao final, concluíram que a solução de cerveja adicionada à dieta como um mimetizador de aditivo alimentar foi capaz de reduzir a quantidade de danos ao DNA presentes no fígado e no pulmão de camundongos alimentados com aminas heterocíclicas, sugerindo que os componentes da cerveja atuam de forma protetora contra os efeitos genotóxicos de aminas heterocíclicas *in vivo*.

Um outro teste utilizado neste trabalho para análise da instabilidade genômica foi o teste do micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos, que providencia uma estimativa da quantidade de mutações cromossômicas induzidas através de eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000). Em relação às avaliações de mutagenicidade neste teste não foram observadas diferença estatisticamente significativas no número de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados na medula óssea de camundongos entre os grupos que receberam cerveja IPA, álcool 7 %, lúpulo e água, demonstrando não possuir ação mutagênica na medula óssea dos camundongos. Estes dados corroboram com os dados encontrados no Ensaio Cometa, demonstrando que a cerveja IPA e seus compostos isolados não demonstram aumentar danos ao DNA de camundongos durante o consumo crônico. Resultados semelhantes foram citados por Nagasako-Akazome et al. (2007), que ao avaliar os polifenóis derivados do lúpulo, mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas (500 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 2000 mg/Kg) dos polifenóis extraídos do lúpulo foi genotóxica quando avaliada através do teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos de camundongos machos.

Já se tem relatos, hoje em dia, de compostos bioativos e químicos que reduzem ou previnem as mutações, sendo chamados de agentes antimutagênicos,

devido às suas excelentes propriedades antioxidantes (Di Domenico et al., 2020; López et al., 2018; Shafreen et al., 2020). Estudos anteriores demonstraram que os polifenóis do lúpulo na dieta fornecem proteção contra a oxidação *in vitro* e *in vivo* e contra a mutagênese (Wang et al., 2014).

Para avaliação da antimutagenicidade, da mesma forma que no ensaio cometa, foi analisado resultados sobre a formação de micronúcleos em medula óssea de camundongos após administração da CP. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no número de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao grupo que consumiu apenas água, sugerindo que a cerveja IPA e seus subprodutos não tiveram ação protetora frente ao agente alquilante CP.

Kac et al. (2008) verificaram a antimutagenicidade do lúpulo e seu principal flavonóide, o xanthohumol. Eles concluíram que o xanthohumol não é mutagênico e exerce um efeito protetor muito forte contra a genotoxicidade induzida pelo carcinogênico 2-amino-3-metilimidazol (4,5-f) quinolina (IQ), uma amina heterocíclica, substância produzidas durante a exposição de alimentos a altas temperaturas. Ainda, o estudo fornece evidências adicionais para o potencial efeito preventivo ao câncer do xanthohumol.

Achados semelhantes foram descritos por Wang et al. (2014), onde a administração de um extrato de polifenol extraído do lúpulo nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg preveniu significativamente a mutagenicidade induzida pela ciclofosfamida em camundongos machos e fêmeas de 8 à 10 semanas de idade.

Por fim, nossos resultados demonstraram que o consumo moderado da cerveja artesanal tipo IPA e seus subprodutos é eficaz na proteção e na reversão dos danos causados pelo agente alquilante CP. Com isso, pode-se sugerir que a cerveja IPA bem como seus derivados não apresenta ação genotóxica e mutagênica, e o consumo de forma moderada apresenta ação antígenotóxica, revertando os danos ocasionados pela CP, e no modelo *ex vivo*, ocasionados pelo H₂O₂, em camundongos.

Considerando a escassez de evidências que relatem os efeitos a longo prazo do consumo moderado da cerveja do tipo IPA e sua ação no material genético, uma análise mais completa sobre as propriedades da cerveja artesanal tipo IPA e seus subprodutos poderá permitir estudos clínicos posteriormente para delinear

novas diretrizes do consumo moderado de cerveja artesanal tipo IPA. Ainda é importante ressaltar que o conceito moderado do consumo de álcool em cada organismo deve ser estudado e considerado.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, no que se refere aos parâmetros comportamentais, o consumo moderado da cerveja artesanal tipo IPA e seus subprodutos apresentou melhora na memória de habituação apenas nos animais que consumiram lúpulo. Em relação à avaliação do comportamento tipo depressivo nos camundongos, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos. Ainda, a cerveja IPA e seus subprodutos não apresentaram ação genotóxica e mutagênica durante o período de tratamento. Em relação à ação antígenotoxicidade, os modelos *in vivo* e *ex-vivo* demonstraram resultados semelhantes nos grupos que receberam cerveja IPA e lúpulo, apresentando menores danos ao DNA quando comparados aos grupos que consumiram álcool em todos os tecidos, com exceção nas células do fígado onde o grupo que recebeu álcool demonstrou maior capacidade de reverter os danos ao DNA quando comparado ao grupo que recebeu lúpulo. No entanto, em relação à ação antimutagênica, não houve diferença estatisticamente significativa no número de micronúcleos em medula óssea entre os camundongos, sugerindo que a cerveja IPA e seus compostos não demonstraram reverter a citotoxicidade ocasionada pelo agente mutagênico CP.

Dessa forma, o consumo moderado de cerveja tem sido relacionado a efeitos benéficos à saúde humana devido ao seu alto valor nutricional e biológico, provenientes de seus compostos bioativos. No entanto, mais estudos são necessários a fim de confirmar o efeito a longo prazo do consumo da cerveja artesanal IPA e seus compostos isolados e sua ação no material genético, visto que os compostos bioativos encontrados na cerveja agem como antioxidantes, atuando contra a genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aichinger G, Beisl J, Marko D. The Hop Polyphenols Xanthohumol and 8-Prenyl-Naringenin Antagonize the Estrogenic Effects of Fusarium Mycotoxins in Human Endometrial Cancer Cells. *Front. Nutr.* 2018;5.

Alhmoud JF, Woolley JF, Al Moustafa AE, Malki MI. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12:(4):1050.

Amo M, Cuevas T, Carretero D, Antonio M., Alonso M, Ángeles and Calahorro, Fernando. In vivo and in vitro studies of the role of lyophilised blond Lager beer and some bioactive components in the modulation of degenerative processes. *Journal of Functional Foods*, 2016;27:274-294.

Ano Y, Hoshi A, Ayabe T, Ohya R, Uchida S, Yamada K, Kondo K, Kitaoka S, Furuyashiki T. Iso- α -acids, the bitter components of beer, improve hippocampus-dependent memory through vagus nerve activation. *FASEB J.* 2019;33:(4):4987-4995.

Arimoto Kobayashi S, Ishida R, Nakai Y, Idei C, Takata J, Takahashi E, Okamoto K, Negishi T, Konuma T. Inhibitory effects of beer on mutation in the Ames test and DNA adduct formation in mouse organs induced by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP). *Biol Pharm Bull.* 2006;29:(1):67-70.

Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2019;140:(11):596-646.

Ascensión M, Serra-Majem L, Pérez-Jiménez F, Pascual V, Tinahones FJ, Estruch R. Moderate Consumption of Beer and Its Effects on Cardiovascular and Metabolic Health: An Updated Review of Recent Scientific Evidence. *Nutrients.* 2021;13:(3):879.

Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL). Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/. [Acessado em 4 de fevereiro de 2022].

Basu AK, Nohmi T. Chemically-Induced DNA Damage, Mutagenesis, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19:(6):1767.

Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy P H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2017;1863:(5): 1066-1077.

Brányik T, Silva D, Baszczynski M, Lehnert R, Almeida J. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering.* 2012; 108:(4):493- 506.

- Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*. 2005 Apr;35(3):187-93.
- Brust JC. Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(4):1540-57.
- Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RCG, Gonçalves JL, Granato D, Pereira JAM, Barros L, Ferreira ICFR. Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods*. 2021;10(1):37.
- Caon G, Marrone M, Feistauer L, Sganzerla, Moreira J. Moderate beer consumption promotes silymarin-like redox status without affecting the liver integrity in vivo. *Food Bioscience*. 2021;43.
- Cheiran KP, Raimundo VP, Manfroi V, Anzanello MJ, Kahmann A, Rodrigues E, Frazzon J. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chem*. 2019;286:113-122.
- Collins SE. Associations Between Socioeconomic Factors and Alcohol Outcomes. *Alcohol Res*. 2016;38(1):83-94.
- Costa C, Tsatsakis A, Mamoulakis C, Teodoro M, Briquoglio G, Caruso E, Tsoukalas D, Margina D, Dardiotis E, Kouretas D, Fenga C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem Toxicol*. 2017;110:286-299.
- Costa R, Rodrigues I.S.O.P.E.F., Guardão L, Rocha-Rodrigues S., Silva C, Magalhães J., Ferreira-De-Almeida M, Negrão R, Soares R. Xanthohumol and 8-prenylnaringenin ameliorate diabetic related metabolic dysfunctions in mice. *Journal Nutr. Biochem*. 2017;45:39–47.
- Cyurczyk M, Zujko ME, Jamiolkowski J, et al. Dietary Total Antioxidant Capacity Is Inversely Associated with Prediabetes and Insulin Resistance in Bialystok PLUS Population. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(2):283.
- De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998;402:(1-2), 151–158.
- Del Bo' C, Marino M, Martini D, et al. Overview of Human Intervention Studies Evaluating the Impact of the Mediterranean Diet on Markers of DNA Damage. *Nutrients*. 2019;11(2):391.
- Delarmelina JM, Dutra JC, Batitucci Mdo C. Antimutagenic activity of ipriflavone against the DNA-damage induced by cyclophosphamide in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:140-6.
- Di Domenico M, Feola A, Ambrosio P, et al. Antioxidant Effect of Beer Polyphenols and Their Bioavailability in Dental-Derived Stem Cells (D-dSCs) and Human Intestinal Epithelial Lines (Caco-2) Cells. *Stem Cells Int*. 2020;10.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli EL. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2005;21(6):749-55.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(2):313-19.

Donadini G, Fumi MD, Newby CIR. Consumers preference and sensory profile of bottom fermented red beers of the Italian Market. *Food Research*. 2014; 58: 69-80.
Donadini G, Porretta S. Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Res Int*. 2017;91:183-198.

Donoso F, Egerton S, Bastiaanssen TFS, Fitzgerald P, Gite S, Fouhy F, Ross RP, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Polyphenols selectively reverse early-life stress-induced behavioural, neurochemical and microbiota changes in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;116.

Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K and Jačević V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front. Plant Sci*. 2021;11.

Erdtmann, Bernardo. A genotoxicidade nossa de cada dia. In: SILVA, Juliana; Erdtmann, Bernardo; HENRIQUES, João P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

Everard A, Geurts L, Van Roye M, Delzenne NM, Cani PD. Tetrahydro iso-Alpha Acids from Hops Improve Glucose Homeostasis and Reduce Body Weight Gain and Metabolic Endotoxemia in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE*. 2012;7

Fukuda T, Ohya R, Kobayashi K, Ano Y. Matured Hop Bitter Acids in Beer Improve Lipopolysaccharide-Induced Depression-Like Behavior. *Front Neurosci*. 2019;28:13-41.

Gaetano, G, Costanzo S, Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, Chiva-Blanch G, Estruch R, Vecchia C, Panico S, Pounis G, Sofig F, Stranges S, Trevisani M, Ursinij F, Cerletti C, Donati MB, Iacoviello L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016;26(6):443–467.

Gallate JE, Morley KC, Ambermoon P, McGregor IS. The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166(1):51-60.

Gerhards S, Talaverano MI. et al. Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality. *J Sci Food Agric*. 2020;101:2828-2835.

Giovenzana V, Beghi R, Guidetti R. Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 2014;142: 80.

Gomez A, Caballero I, Blanco CA. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*. 2020;10(3):400.
Gorter de Vries AR, Pronk JT, Daran JG. Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS Yeast Res*. 2019;19(7):63.

Gribkova IN, Kharlamova LN, Lazareva IV, Zakharov MA, Zakharova VA, Kozlov VI. The Influence of Hop Phenolic Compounds on Dry Hopping Beer Quality. *Molecules*. 2022 Jan 24;27(3):740.

Grosso G; Godos J, Lamuela R, Ray S, Micek A, Pajak A, Sciacca S, D’Orazio N, Del Rio D, Galvano F. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol. Nutr. Food Res*. 2017;61;930.

Guido LF. Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role. *Sci. Agric*. 2016; 73(2):189-197.

Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(1):73-8.

Hoes L, Dok R, Verstrepen KJ, Nuyts S. Ethanol-Induced Cell Damage Can Result in the Development of Oral Tumors. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 30;13(15):3846.

Humia BV, Santos KS, Barbosa AM, Sawata M, Mendonça MDC, Padilha FF. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*. 2019;24(8):1568.

IARC. Alcohol drinking Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. Lyon, France. 2010; 96. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/mono96.pdf> [Acessado em 25 de fevereiro de 2021].

Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem*. 2018;62(5):643-723.

Jiang CH, Sun TL, Xiang DX, Wei SS, Li WQ. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus* L.) *Front. Pharmacol*. 2018;9:530.

Juan CA, Lastra JM, Plou FJ, Lebeña EP. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22(9), 4642.

Kac J, Plazar J, Mlinaric A, Zegura B, Lah TT, Filipic M. Antimutagenicity of hops (*Humulus lupulus* L.): bioassay-directed fractionation and isolation of xanthohumol. *Phytomedicine*. 2008;15(3):216-20.

Kada T, Shimo K. Desmutagens and bio-antimutagens - their modes of action. *BioEssays*, 1987;7(3),113–116.

Kiokias S, Proestos C, Oreopoulou V. Phenolic Acids of Plant Origin—A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods*. 2020;9(4):534.

Kirin Beer University. Report Global Beer Consumption 2018. Disponível em: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2019/1224_01.html. [Acessado em 4 de fevereiro de 2022].

Koch W. Dietary Polyphenols-Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable Diseases. A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(5):1039.

Koller H, Perkins LP. Brewing and the Chemical Composition of Amine-Containing Compounds in Beer: A Review. *Foods*. 2022;11:257.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000; 455:(1-2):155-166.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2019;24-370.

Lacomino G, Tedesco I, Russo GL. Biological properties of beer and its componentes compared too wine. Academic Press. 2009;484-491.

Liao W, McNutt MA, Zhu W. GThe comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009;48:(1).

Liquori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772.

Lin K, Li Y, Toit ED, Wendt L, Sun J. Effects of Polyphenol Supplementations on Improving Depression, Anxiety, and Quality of Life in Patients With Depression. *Front Psychiatry*. 2021;12:765485.

Loconte NK. Alcohol and cancer: A statement of the American society of clinical oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 2018;36:(1):83–93.

López RD, Izquierdo VJA, Morales GJA, et al. Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 2: Plants, Vegetables, and Natural Resin. *Nutrients*. 2018;10:(12):1954.

Mahat RK, Singh N, Gupta A, Rathore V. Oxidative DNA Damage and Carotid Intima Media Thickness as Predictors of Cardiovascular Disease in Prediabetic Subjects. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2018;5:(1):15.

Maietti A, Brighenti V, Bonetti G, Tedeschi P, Prencipe FP, Benvenuti S, Brandolini V, Pellati F. Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L.(hop). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;43.

Martín JL, Galán I, Segura García L, Camaralles Guillem F, Suárez Cardona M, Brime Beteta B. Episodios de consumo intensivo de alcohol “Binge drinking”: retos en su

definición e impacto en salud [Binge drinking: the challenges of definition and its impact on health.]. *Rev Esp Salud Publica*. 2020;94.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1990; 239:(1):29-80.

Micek A, Godos J, Del Rio D, Galvano F, Grosso G. Dietary Flavonoids and Cardiovascular Disease: A Comprehensive Dose-Response Meta-Analysis. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65:(6):1019.

Miles B, Tadi P. *Genetics, Somatic Mutation*. Treasure Island (FL): Stat Pearls. 2021.

Miranda C, Stevens J, Helmrich A, Henderson M, Rodriguez R, Yang YH, Deinzer M, Barnes D, Buhler D. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol*. 1999; 37:271–285.

Miranda CL, Elias VD, Hay JJ, Choi J, Reed RL, Stevens JF. Xanthohumol improves dysfunctional glucose and lipid metabolism in diet-induced obese C57BL/6J mice. *Arch. Biochem. Biophys*. 2016;599:22–30.

Miranda E, Irwansyah E, Amelqa AY, Maribondang MM, Salim M. Detection of Cardiovascular Disease Risk's Level for Adults Using Naive Bayes Classifier. *Healthc Inform Res*. 2016;(3):196-205.

Molina M, Muñoz-Garach A, Tinahones FJ, Moreno-Indias I. A New Perspective on the Health Benefits of Moderate Beer Consumption: Involvement of the Gut Microbiota. *Metabolites*. 2019; 9(11):272.

Muñoz G, Urrutia JC, Burgos CF, Silva V, Aguilar F, Sama M, Yeh HH, Opazo C, Aguayo LG. Low concentrations of ethanol protect against synaptotoxicity induced by A β in hippocampal neurons. *Neurobiol Aging*. 2015;36:(2):845-56.

Nagasako-Akazome Y, Honma D, Tagashira M, Kanda T, Yasue M, Ohtake Y. Safety evaluation of polyphenols extracted from hop bracts. *Food Chem Toxicol*. 2007;(8):1383-92.

Nardini M, Foddai MS. Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. *Molecules*. 2020;26;25:(11):2466.

OECD (2016), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing: <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>. [Acessado em 15 de fevereiro de 2021].

Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr*. 2008 Mar;138:(3):562-6.

Padro T, Muñoz-García N, Vilahur G, Chagas P, Deyà A, Antonijoan RM, Badimon L. Moderate Beer Intake and Cardiovascular Health in Overweight Individuals. *Nutrients*. 2018;10(9):1237.

Pervin Z, Stephen JM. Effect of alcohol on the central nervous system to develop neurological disorder: pathophysiological and lifestyle modulation can be potential therapeutic options for alcohol-induced neurotoxication. *AIMS Neurosci*. 2021; 8(3):390-413.

Piepoli MF, Abreu A, Albus C, Ambrosetti M, Brotons C, Catapano AL, Corra U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hoes A, Lochen ML, Matrone B, Redon J, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M. Update on cardiovascular prevention in clinical practice: A position paper of the European Association of Preventive Cardiology of the European Society of Cardiology. *Eur J Prev Cardiol*. 2020;27(2):181-205.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journ. Of Pharmacology*. 2003;33(3):463.

Negrão R, Costa D, Duarte TT, Gomes P, Coelho, J.T. Guimarães, L. Guardão, I. Azevedo, R. Soares Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(1):100-109.

Rehm J. The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res Health*. 2011;34(2):135-43.

Ren N, Atyah M, Chen WY. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *J Transl Med*. 2017;15: 110.

Rienks J, Barbaresko J, Nöthlings U. Association of Polyphenol Biomarkers with Cardiovascular Disease and Mortality Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2017;9(4):415.

Shafreen RM, Lakshmi SA, Pandian SK, Park YS, Kim YM, Paško P, Deutsch J, Katrich E, Gorinstein S. Unraveling the Antioxidant, Binding and Health-Protecting Properties of Phenolic Compounds of Beers with Main Human Serum Proteins: In Vitro and In Silico Approaches. *Molecules*. 2020;25(21):4962.

Shahidi F, Yeo J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1573.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-191.

Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet*. 2014;55(2):273-285.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.

Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry*. 2004;65:1317–1330.

Strong G, England K. Beer Judge Certification Program (BJCP) style guidelines. 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org> [Acessado em 15 de fevereiro de 2022].

Sun XL, Zhang JB, Guo YX, Xia TS, Xu LC, Rahmand K, Wang GP, Li XJ, Han T, Wang NN, Xin HL. Xanthohumol ameliorates memory impairment and reduces the deposition of β -amyloid in APP/PS1 mice via regulating the mTOR/LC3II and Bax/Bcl-2 signalling pathways. *J Pharm Pharmacol*. 2021;73(9):1230-1239.

Tiwari V, Wilson DM. DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging. *Am J Hum Genet*. 2019;105(2):237-257.

Vazquez-Cervantes GI, Ortega DR, Blanco Ayala T, Pérez de la Cruz V, Esquivel DFG, Salazar A, Pineda B. Redox and Anti-Inflammatory Properties from Hop Components in Beer-Related to Neuroprotection. *Nutrients*. 2021;13(6):2000.

Vera L, Aceña L, Guasch, J. et al. Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399:2073–2081.

Vredenburg G, den Braver-Sewradj S, van Vugt-Lussenburg BM, Vermeulen NP, Commandeur JN, Vos JC. Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants. *Toxicol Lett*. 2015;232(1):182-92.

Wang X, Yang L, Yang X, Tian Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). *J Sci Food Agric*. 2014;94(8):1693-700.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2018.

Wunderlich s, Back w. Overview of manufacturing beer: Ingredients, process and quality criteria. In: V. R. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2009;3-17.

Wunderlich S, Zürcher A, Back W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(9):874-881.

8 ANEXO A – CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **15/06/2021**.

Título do projeto	Avaliação da capacidade antioxidante, antígenotóxica e antimutagênica da cerveja artesanal tipo IPA.
Project title	Evaluation of the antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic capacity of IPA craft beer
Número do protocolo Protocol number	31/2021
Pesquisador principal Principal Investigator	Vanessa Moraes de Andrade
Pesquisadores Researchers	Schellen de Córdova Kindermann, Luiza Martins Longaretti, Adriani Paganini Damiani, Marina Lummertz Magenis, Carla de Oliveira Bauer, Isadora de Oliveira Monteiro.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/07/2021 a 16/08/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/Swiss
Idade/Peso	60 dias/ 30-35g
Número de animais	64 / masculino
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 15 de junho de 2021

Josiane Budni

Coordenadora da CEUA