

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DE BEBIDAS
FERMENTADAS A BASE DE CEVADA POR MEIO DO TESTE PARA
DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

***ASSESMENT OF CARCINOGENIC POTENTIAL OF FERMENTED
BEVERAGES BY TUMOR EPITHELIAL DETECTION TEST IN
DROSOPHILA MELANOGASTER***

Janaína Nayara da Silva Rodrigues¹
Carlos Fernando Campos²
Cássio Resende de Moraes²

RESUMO: A cerveja é uma bebida carbonada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação feita por leveduras do gênero *Sacharomyces*. Ingredientes usados na fabricação da cerveja são bem descritos como apresentando mecanismo de ação associado à atividade antioxidante. Ao mesmo tempo diversos problemas sociais estão intrinsecamente ligados com o uso abusivo do álcool, bem como problemas associados à quebra da homeostasia do organismo, tais como cirrose e pancreatite. Sabe-se que o aumento de câncer na população pode estar associado à exposição crônica de diferentes grupos químicos presentes nos alimentos e bebidas industrializadas. Em função do amplo consumo de cerveja pela população brasileira, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico de cinco marcas comerciais de cerveja, Skol, Bhrama, Crystal, Antartica e Caracu. Para avaliar o efeito carcinogênico e anticarcinogênico das cervejas, foi utilizado o teste para detecção de tumor epitelial em *D. melanogaster*. Larvas de 3º estágio descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, sb¹* e machos *mwh/mwh* foram tratadas com diferentes das cervejas (3.33; 1.65 e 0,83 mL/g de dieta). Para avaliar o efeito anticarcinogênico, larvas de 3º estágio foram expostas a 0,1 mM de mitomicina C por 6 horas e posteriormente exposta as diferentes concentrações das cervejas. Não foi observado efeito carcinogênico em nenhuma concentração das cervejas avaliadas neste trabalho. Na concentração de 3.33 mL/g de Caracu foi evidenciado redução da taxa de tumor epitelial em *D. melanogaster* quando comparado com o controle negativo. Os resultados sugerem que nestas condições experimentais, neste organismo modelo e nestas concentrações, Skol, Antartica, Crystal, Bhrama e Caracu não apresenta efeito carcinogênico. Caracu na concentração de 3.33 mL/g apresenta efeito citotóxico em *D. melanogaster*.

PALAVRAS-CHAVE: Cerveja; Tumor epitelial; *warts*

ABSTRACT: *The beer is a carbonated drink low alcohol prepared from the fermentation made by the Saccharomyces yeasts. Ingredients used in brewing are well described as having action mechanism associated with antioxidant activity. While many social problems are*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

- 1- Licenciada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP.
- 2- Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Docente e pesquisador pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP;

*inextricably linked with alcohol abuse, as well as problems associated with the breakdown of homeostasis of the organism, such as cirrhosis and pancreatitis. It is known that the increase of cancer in the population may be associated with chronic exposure to different chemical groups present in the food and beverage industrial. Due to the large consumption of beer by the Brazilian population, this study aimed to evaluate the carcinogenic and anticarcinogenic potential five brands of beer, Skol, Brahma, Crystal, Antarctica and Caracu. To evaluate the carcinogenic effect and anticarcinogenic beers, we used the test for epithelial tumor detection in *D. melanogaster*. 3rd stage larvae descendants of crosses between virgin females wts / TM3, and sb¹ male mwh/mwh were treated with different beers (3:33; 1.65 and 0.83 ml / g diet). To evaluate the anticarcinogenic effect of 3rd stage larvae were exposed to 0.1 mM of mitomycin C for 6 hours and subsequently exposed to different concentrations of beers. Carcinogenic effect was not observed at any concentration of beers evaluated in this work. At concentration of 3.33 ml / g Caracu evidenced epithelial tumor reduction rate in *D. melanogaster* compared with the negative control. The results suggest that under these experimental conditions, this model organism and at these concentrations, Skol, Antarctica, Crystal, Brahma, Caracu and has no carcinogenicity. Caracu concentration in 3.33 mL / g has a cytotoxic effect in *Drosophila*.*

KEYWORDS: Users, Beer; epithelial tumor; warts

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida carbonada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação feita por leveduras do malte da cevada, contendo lúpulo e água, podendo ainda utilizar-se de outras matérias-primas, como arroz, trigo ou milho. Há muito tempo o homem vem utilizando leveduras para a produção de pão, cerveja, vinho e outros alimentos obtidos por fermentação (CARVALHO; SILVA; BENTO, 2006; SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008). É através das leveduras do gênero *Saccharomyces*, as quais apresentam várias cepas, que são produzidos os dois metabólicos primários, importantes na cerveja, o etanol e dióxido de carbono (CARVALHO; SILVA; BENTO, 2006).

Os principais atrativos da cerveja estão associados ao paladar, o preço acessível e a disponibilidade no mercado. A cerveja está entre as bebidas mais populares no mundo, gerando grande consumo e movimentação de capital. No Brasil, a cerveja é uma das bebidas mais comercializadas, influenciando diretamente na economia do país, contabilizando entre 2010 e 2013 o investimento de R\$ 17 bilhões de dólares (CERVBRASIL, 2014).

Possui cerca de 2,7 milhões de pessoas empregadas ao longo de sua cadeia de produção. No ano de 2013, o setor de cerveja gerou R\$ 21 bilhões em impostos. Como a

bebida movimenta grandes somas de capital, sua produção e venda movimenta 2% do PIB e 15% da indústria de transformação nacional (CERVBRASIL, 2014).

Basicamente, a cerveja é produzida por processos fermentativos por meio da manipulação e combinação de vários ingredientes. Os principais são o malte, o lúpulo e alguns nutrientes, tais como, folatos, riboflavina e selênio.

O malte da cevada (*Hordeum Vulgare L.*) usado na produção da cerveja é obtido de uma planta da família *Poaceae*, sendo produzida no Brasil em algumas partes do Rio Grande do Sul (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Esse material é um dos responsáveis pela coloração e sabor da cerveja. Nas maltarias, os grãos de cevada são submetidos à germinação controlada que induz os vegetais a produzirem enzimas que reduzem o amido em açúcar fermentável, sendo esse processo, indispensável na produção da bebida (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011; SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é usado para dar o sabor amargo à bebida, além do aroma característico. Esse material é advindo de uma espécie de trepadeira (família *Cannabaceae*). No Brasil não existem condições climáticas adequadas para a produção de lúpulo, sendo o material geralmente importado de outros países (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011).

Folatos, riboflavina e selênio destacam-se pela sua capacidade antioxidante, comparável à do vinho branco (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008). Compostos antioxidantes são bem descritos como potenciais agentes sequestradores de radicais livres, atuando de maneira preventiva a doenças associadas à instabilidade genética (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008).

Entretanto, o consumo crônico da bebida, pode gerar problemas de natureza social, bem como causar desequilíbrio na homeostase do organismo. De acordo com a Polícia Rodoviária Federal (PRF, 2009), o uso do álcool aliada a direção pode levar a morte de pelo menos 35 mil pessoas por ano, resultantes de acidentes. Só em rodovias federais, essa quantidade se aproxima a 7 mil. Numa lista de causas de desastres, a ingestão de álcool aparece entre os sete vilões das estradas.

O álcool atua no primeiro momento como uma droga psicotrópica estimulante e em segundo momento como um forte agente depressor do Sistema Nervoso Central. Comprometimento da noção de espaço, cirrose e pancreatites somam prejuízos associados à ingestão abusiva da bebida (VARELLA, 2011). A ingestão de bebidas alcoólicas pelas pessoas ocorre por diversos motivos, dentre os quais se podem citar: a facilidade de acesso,

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

por ser uma droga lícita, para que a pessoa se sinta socialmente aceita num grupo e por causa da influência das propagandas publicitárias de cervejas que são criadas com o objetivo de incentivar o consumo (PINSKY; JUNDI, 2008; MENEZES, 2015).

Segundo Doll e Peto (1981) e Brasil (2012), 3% dos cânceres de todas as origens são resultantes do uso crônico e abusivo do álcool.

A transformação de células selvagens em células cancerígenas ocorre por meio de eventos sequenciais que resultam no acúmulo de mutações (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002; ORSOLIN, NEPUMUCENO, 2009). No organismo as células tendem a manter comunidades organizadas, resguardando o controle da proliferação e o reconhecimento celular. Caso a célula escape desse mecanismo, cabe ao sistema de reparo do organismo identificar a mutação, reparar ou destruir a célula, evitando a sua propagação (MORAIS et al., 2016).

Em casos onde o reparo de mutações não ocorre antes do final da divisão celular, as alterações podem se tornar permanentes na célula (KIM et al., 2011). Mutações acima do limite tolerável basal podem resultar no descontrole da proliferação celular, podendo contribuir na instalação de neoplasias (HIB; ROBERTIS, 1998; COSTA; MENK, 2000).

Lesões no material genético por meio da exposição a agentes físicos químicos e biológicos podem comprometer o processo de disjunção mitótica, replicação e transcrição gênica da célula (FRANK, 2010).

Mutações em *locus* contendo genes supressores de tumor ou proto-oncogenes, são mais preocupantes, uma vez que estas duas categorias de genes são fundamentais no controle do ciclo celular, bem como previne a proliferação de células com alta capacidade proliferativa e invasiva (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002; LOURO et al., 2002; READ; STRACHAN, 2002).

A espécie *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, conhecida popularmente como mosca da fruta, é um dos invertebrados mais usados em pesquisas científicas. Sua utilização é baseada nas suas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas, as quais apresentam considerável conservação com as dos mamíferos. Após o sequenciamento do genoma humano e sua comparação com o genoma de *D. melanogaster*, foi constatada a homologia de 75% de genes relacionados às doenças humanas, o que tem conferido formidáveis vantagens quanto ao uso deste organismo como modelo experimental (GRAF et al., 1996; REITER et al., 2001; JENNINGS, 2011; PANDEY; NICHOL, 2011; KIM et al., 2011).

A conservação de alguns fatores genéticos e as vias bioquímicas, bem como, a conservação funcional dos genes associados à supressão de tumor em *D. melanogaster* e mamíferos, têm sugerido que estudos que envolvem a exposição de *Drosophila sp* a xenobióticos, associados à indução e manifestação de tumor nos discos imaginais, podem contribuir para o entendimento do câncer em humanos (POTTER et al., 2000).

Em *Drosophila*, mais de 50 genes foram mapeados e caracterizados como genes supressores de tumor. Oito deles têm função no desenvolvimento embrionário da mosca, 12 no desenvolvimento do cérebro, 19 são expressos nas células dos discos imaginais, 25 no desenvolvimento hematopoiético e 10 nas gônadas adultas (JUSTICE et al., 1995).

O gene *warts* (*wts*) foi identificado e caracterizado como um gene supressor de tumor (XU et al., 1995). A deleção desse gene e a expressão do alelo recessivo levam à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca (NISHIYAMA et al., 1999).

Nesse contexto o Teste para Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster* é uma robusta ferramenta para identificar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico de uma grande variedade de xenobióticos (SIDOROV et al., 2001; ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009; SILVA; NEPOMUCENO, 2011; COSTA et al., 2011; FURTADO; NEPOMUCENO, 2012; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPUMOCENO, 2012; MORAIS et al., 2016).

Baseado no amplo consumo de cerveja pela população, o presente trabalho tem como objetivo, avaliar a capacidade carcinogênica e anticarcinogênica de cinco cervejas amplamente comercializadas pela população brasileira. Avaliar os efeitos do consumo crônico de substância é de suma importância no intuito de prevenir doenças associadas à instabilidade genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Cinco marcas de cervejas brasileiras registradas no Brasil foram usadas neste trabalho. SKOL (Lote: MG08 31), BRAHMA chopp (Lote: MG03 37), CARACU (Lote: MG11 32) e ANTARCTICA SUBZERO (Lote: MG01 26) que foram produzidas e envasadas pela AMBEV S.A. CRYSTAL (Lote nº 42251514), que foi produzida e envasada pela cervejaria de Petrópolis/RJ.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

Mitomomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado é fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

2.2 Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* (Teste wts)

2.2.1 Linhagens de *Drosophila*, cruzamento e tratamentos

Duas linhagens mutantes foram usadas nesse teste: Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e linhagem *warts* (*wts*,3-100). A linhagem *multiple wing hairs* é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, localizado no cromossomo 3, em posição distal em relação ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). Quando expresso em homozigose recessiva o gene *mwh*, produz fenótipo de pelos nas asas da mosca em formato múltiplo, diferente do fenótipo selvagem (um único pelo por célula).

A linhagem *warts* possui o marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹*. O marcador *wts*, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca.

Essas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo ¼ meio de cultura a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wts* [3-17]/*TM3,S B* [1]. Duas progênes são geradas nesse cruzamento: Progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) e progênie BH, heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb¹*). No Teste de Detecção de Tumor epitelial (teste *wts*), apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹*, que apresenta fenótipo de pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, com fenótipo de pelos longos e finos.

A coleta de ovos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* ocorreu dentro do período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram

lavadas com água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina.

Posteriormente, as larvas foram submetidas a tratamento crônico (48 horas) até completar o processo da metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de solução de cerveja na concentração usada pela população (Solução de 100%).

Paralelo ao teste *wts*, neste estudo foi avaliado a toxicidade das bebidas em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. A toxicidade foi mensurada pela taxa de indivíduos que completaram o processo de metamorfose após o tratamento crônico (48 horas).

O teste *wts* foi acompanhado de controle negativo, água ultrapura e controle positivo, mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 mM (exposição durante 6 horas). Esta concentração é baseada em estudos de recombinação mitótica em *Drosophila melanogaster* (TSUDA; TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; MORAIS et al., 2016).

Para determinar o efeito anticarcinogênico das bebidas à base de cevada, larvas de 3º estágio foram expostas durante 6 horas em dieta enriquecida com 0,1 mM de mitomicina C e posteriormente transferidas para os frascos contendo solução de purê de batata e cerveja. As larvas permanecerão nos frascos até completar o processo de metamorfose. O efeito anticarcinogênico foi avaliado ao comparar moscas expostas a 0,1 mM de MMC com moscas pré-tratadas com 0,1 mM e tratadas com diferentes concentrações das cervejas.

2.2.2 Fixação de moscas e análise de tumor epitelial

Para análise de tumor epitelial, adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/+mwh x wts+/TM3, Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob lupa estereoscópica (Bel® Photonics) em placa de petri com glicerina. A análise foi baseada na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão expressando os números de tumores observados em cada parte do corpo das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.2.3 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nos compostos tratados com cerveja e os controles (negativo e positivo) serão calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $P < 0,005$.

Comparações estatísticas referentes à taxa de sobrevivência das moscas tratadas com as cervejas e os controles (negativo e positivo) serão feitas com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado a toxicidade de diferentes marcas comerciais de bebidas fermentadas a base de cevada e o efeito carcinogênico e anticarcinogênico das cervejas por meio do teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*.

Conforme apresentado na **figura 1** moscas expostas cronicamente a 3,33 mL/g de caracu suplementada na dieta para *D. melanogaster* diferiram estatisticamente na taxa de sobrevivência, sendo observado 65% de mortalidade.

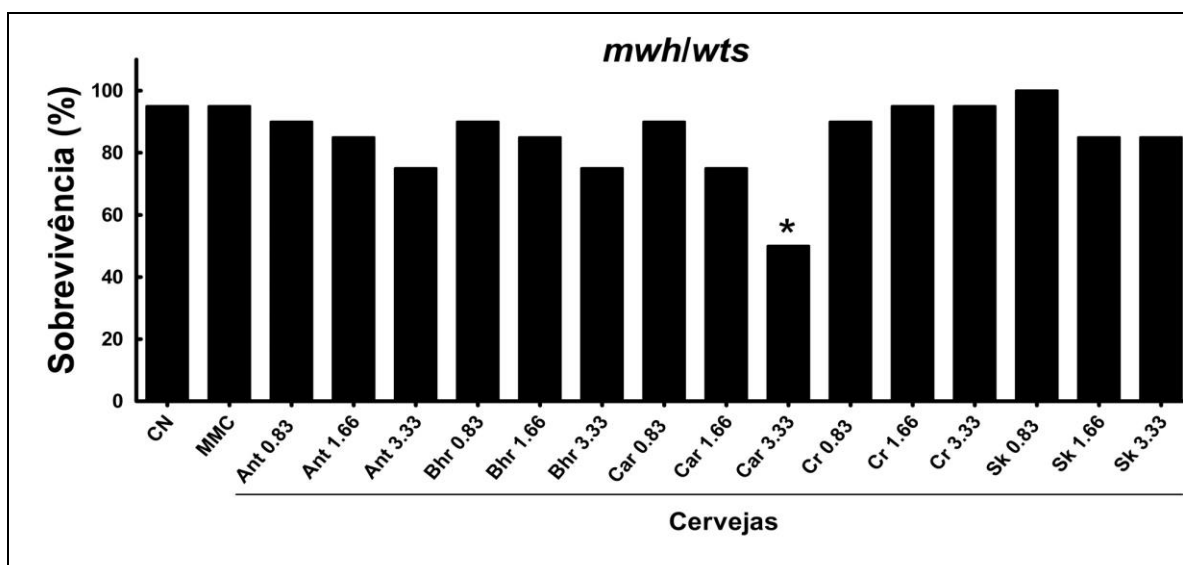


Figura 1. Taxas de sobrevivência das progênies de *Drosophila melanogaster* resultantes do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3, Sb¹*. NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Mitomicina C 0,1 mM); Ant = Antártica; Bhr = Brahma; Car = Caracu; Cr = Crystal; SK = Skol. Cervejas (concentrações em mL/g).

*Diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

As demais cervejas não apresentaram toxicidade significativa em nenhuma das concentrações avaliadas neste trabalho. Tanto o controle negativo (água ultrapura) quanto o controle positivo (0,1 mM de Mitomicina C) não excederam 5% na taxa de mortalidade.

Na **tabela 1** estão representados o resumo dos resultados obtidos para a frequência de tumor epitelial nos diferentes apêndices da mosca, nas diferentes cervejas e concentrações. Quando comparado ao controle negativo não foi observado diferenças estatisticamente significativa ($P > 0,05$) na frequência de tumor epitelial, demonstrado que as bebidas não são capazes de causar a perda da heterozigose do marcador *wts*, não apresentando, portanto efeito carcinogênico.

Tabela 1. Frequência de clones de tumor epitelial observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com mitomicina C e diferentes concentrações de bebidas fermentadas a base de cevada.

Tratamentos			Frequência de tumor (número total de tumor)						
Cervejas (mL/g)	MMC (mM)	Nº de moscas	Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	Total
Controle negativo	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,023 (03)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,046 (06)
Controle positivo	0,1	130	0,230 (30) *	0,076 (10) *	1,546 (201) *	1,153(150) *	0,192 (25) *	0,061(08) *	3,261 (424) *
Antarctica									
0.83	-	130	0,007 (01)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,023 (03)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,046 (06)
1.66	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,038 (05)
3.33	-	130	0,000 (00)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,138 (05)
Brhama									
0.83	-	130	0,015 (02)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,053 (07)
1.66	-	130	0,007 (01)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,046 (06)
3.33	-	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,046 (06)
Caracu									
0.83	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,030 (04)	0,030 (04)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,076 (10)
1.66	-	130	0,007 (01)	0,007 (01)	0,007 (01)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,046 (06)
3.33	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,007 (01)
Crystal									
0.83	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,023 (03)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,061 (08)
1.66	-	130	0,007 (01)	0,007 (01)	0,023 (03)	0,030 (04)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,069 (09)
3.33	-	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,015 (01)	0,023(03)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,053 (07)
Skol									
0.83	-	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,023 (03)	0,007 (01)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,053 (07)
1.66	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,030 (04)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,046 (06)
3.33	-	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,030 (04)

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância de ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

MMC, Mitomicina C (0.1 mM).

Fonte: Dados da autora.

AValiação DO POTENCIAL CARCINOgÊNICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

Para avaliar o efeito anticarcinogênico das bebidas, larvas de 3º estágio descendentes do *cruzamento wts/TM3, sb¹ x mwh/mwh* foram submetidas a um pré-tratamento com 0,1 mM de MMC durante 6 horas e posteriormente foram transferidas para *vials* contendo 0,83, 1,66 e 3,33 mL de cerveja por g de purê de batata. Moscas expostas nas diferentes concentrações e nas diferentes cervejas foram comparadas com moscas tratadas apenas com 0,1 mM de MMC (controle positivo). O resumo dos resultados do ensaio de anticarcinogenicidade esta apresentado na **tabela 2**.

Tabela 2. Frequência de clones de tumor epitelial observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, pré-tratadas com mitomicina C e posteriormente submetido a diferentes concentrações de bebidas fermentadas a base de cevada.

Tratamentos			Frequência de tumor (número total de tumor)						
Cervejas (mL/g)	MMC (mM)	Nº de moscas	Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	Total
<i>Controle negativo</i>	-	130	0,000 (00)*	0,000 (00)*	0,015 (02)*	0,023 (03)*	0,007 (01)*	0,000 (00)*	0,046 (06)*
<i>Controle positivo</i>	0,1	130	0,230 (30)	0,076 (10)	1,546 (201)	1,153 (150)	0,192 (25)	0,061 (08)	3,261 (424)
<i>Antarctica</i>									
0,83	0,1	130	0,238 (31)	0,100 (13)	1,538 (200)	1,176 (153)	0,200 (26)	0,076 (10)	3,330 (433)
1,66	0,1	130	0,223 (29)	0,084 (11)	1,546 (201)	1,153 (150)	0,169 (22)	0,046 (06)	3,223 (419)
3,33	0,1	130	0,207 (27)	0,115 (15)	1,530 (199)	1,130 (147)	0,161 (21)	0,076 (10)	3,223 (419)
<i>Brhama</i>									
0,83	0,1	130	0,246 (32)	0,076 (10)	1,561 (203)	1,200 (156)	0,169 (22)	0,076 (10)	3,330 (433)
1,66	0,1	130	0,269 (34)	0,092 (12)	1,576 (205)	1,161 (151)	0,161 (20)	0,061 (08)	3,223 (430)
3,33	0,1	130	0,230 (30)	0,115 (15)	1,584 (206)	1,176 (153)	0,161 (20)	0,069 (09)	3,330 (433)
<i>Caracu</i>									
0,83	0,1	130	0,230 (30)	0,092 (12)	1,576 (205)	1,176 (153)	0,200 (26)	0,038 (05)	3,315 (431)
1,66	0,1	130	0,192 (25)	0,061 (08)	1,553 (202)	1,115 (145)	0,153 (20)	0,076 (10)	3,153 (410)
3,33	0,1	130	0,084 (11)*	0,069 (09)*	1,176 (153)*	0,792 (103)*	0,153 (20)*	0,000 (00)*	2,292 (298)*
<i>Crystal</i>									
0,83	0,1	130	0,269 (35)	0,061 (08)	1,538 (200)	1,169 (152)	0,215 (28)	0,038 (05)	3,292 (428)
1,66	0,1	130	0,269 (34)	0,092 (12)	1,561 (203)	1,115 (145)	0,169 (22)	0,069 (09)	3,269 (425)
3,33	0,1	130	0,246 (32)	0,084 (11)	1,538 (200)	1,176 (153)	0,138 (18)	0,069 (09)	3,253 (423)
<i>Skol</i>									
0,83	0,1	130	0,269 (35)	0,115 (15)	1,600 (208)	1,115 (145)	0,207 (27)	0,046 (06)	3,353 (436)
1,66	0,1	130	0,269 (35)	0,115 (15)	1,623 (211)	1,138 (148)	0,153 (20)	0,030 (04)	3,330 (433)
3,33	0,1	130	0,292 (38)	0,084 (11)	1,607 (209)	1,100 (143)	0,169 (22)	0,038 (05)	3,292 (428)

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância de ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle positivo (MMC).
MMC, Mitomicina C (0.1 mM).

Fonte: Dados da autora.

Foi observada redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na frequência de tumor epitelial em moscas tratadas com 3,33 mL/g de caracu quando comparado ao controle positivo. Nesta concentração também foi observado baixa frequência de tumor epitelial em todos os apêndices da mosca quando comparado ao controle positivo.

Mesmo apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle positivo, os autores do presente trabalho não acreditam no efeito anticarcinogênico da cerveja caracu, mas sim em um possível efeito citotóxico.

Esta hipótese é sustentada pela comparação do teste de toxicidade (**figura 1**) e os dados de frequência de tumor epitelial em *D. melanogaster* (**tabela 2**). Como apresentado na **figura 1** a concentração de 3,33 mL/g de caracu foi a única concentração que reduziu a taxa de sobrevivência de *D. melanogaster*, a mesma concentração que reduziu a frequência de tumor epitelial em *D. melanogaster* (**tabela 2**). Neste sentido se fosse assumido esta hipótese o efeito citotóxico da cerveja caracu inviabilizaria a identificação de tumor em nível do fenótipo, motivo pelo qual foi evidenciado redução da frequência de tumor epitelial.

Na **tabela 3** está representada os ingredientes declarados pelos fabricantes na produção das diferentes marcas comerciais de cerveja. A cerveja caracu é a única bebida fermentada analisada neste trabalho que faz uso do corante caramelo III na sua formulação.

Tabela 3. Ingredientes declarados pelos fabricantes contidos na formulação das cervejas.

Cervejas	Ingredientes					
	Base	Corante	Estabilizante	Alérgicos	Antioxidante	Teor alcoólico
Antártica	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos e lúpulo.	Nd	INS405	Cevada, glúten	INS316 e INS221	4,6%
Brahma	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos e lúpulo.	Nd	INS405	Cevada, glúten	INS316 e INS221	4,8%
Caracu	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos, lúpulo e malte torrado.	Caramelo III	INS405	Cevada, glúten	INS150c	5,4%
Crystal	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos, lúpulo	Nd	INS405	Cevada, glúten	INS316 e INS223	4,5%
Skol	Água, malte, cereais não maltados, carboidratos e lúpulo.	Nd	INS405	Cevada, glúten	INS316 e INS221	4,7%

Nd. Não declarado pelo fabricante

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

O corante caramelo é segundo Downham e Collins (2000) o corante mais utilizado na indústria alimentícia representando sozinho, 11% do mercado. A adição de corante caramelo III, sobretudo confere cor à bebida, variando de marrom-amarelada clara, marrom escura até preto (ZENKEVICK et al., 2002).

O tratamento térmico dos açúcares na presença do promotor de caramelização leva à formação de compostos indesejáveis recém-formados. Pesquisas sobre a toxicidade de caramelos ajudou a mostrar que o corante de caramelo de classe III e IV são mais perigosos que outros caramelos pela presença de nitrogênio em seus promotores de caramelização.

Em particular, permitem a formação de imidazol, reconhecido como tóxico: 4-metilimidazol (4MEI) presente no corante caramelo de classe III e IV e 2-acetil-4-(1, 2, 3, 4-tetrahidroxibutil) do imidazol (THI) isto só no corante caramelo de classe III (MORETTON, 2009).

Somado a toxicidade conferida provavelmente pelo corante caramelo III o teor de álcool (5,4%), relativamente mais concentrado que as demais cervejas analisadas neste trabalho, pode ter contribuído com a redução da taxa de sobrevivência em *D. melanogaster*.

Mesmos sendo discutida a atividade antioxidante de diferentes ingredientes presentes na formulação de bebidas fermentadas a base de cevada, tais como folatos, riboflavina e selênio (SIQUEIRA et al., 2008; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004), no presente trabalho não foi observado efeito protetor das cervejas sobre o efeito carcinogênico induzido pela MMC (0,1 mM).

4 CONCLUSÃO

Nestas condições experimentais, neste organismo modelo e nas concentrações analisadas, as cervejas Antártica, Bhrama, Caracu , Crystal e Skol não foram carcinogênicas para *Drosophila melanogaster*. Na concentração de 3,33 mL/g (concentração de uso) a cerveja caracu foi tóxica para *D. melanogaster*. Em função da ampla utilização destas bebidas pela população brasileira este trabalho alerta para a necessidade de mais testes com as bebidas usando outros organismos modelos.

REFERÊNCIAS

RODRIGUES, J. N. S.; CAMPOS, C. F.; MORAIS, C. R.

MEGA, J.F; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v.1, n.1, p. 1-34, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/diretrizes_cancer_trabalho.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2016.

CARVALHO, G.B.M; SILVA, J.B.A; BENTO, C.V. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. **Revista Analytica**, v. 1, n.25, p. 36-42, 2006

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v.3, n.12, 2000.

COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 3236-3245, 2011.

DEGÁSPARI, C.H; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes e compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, Curitiba, v. 5, n.1, p. 33-40, 2004.

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 66, n. 6, p.1191-1308, 1981

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v.35, p.5-22, 2000.

FRANK, S.A. Evolution in health and medicine sackler colloquium: somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1 p. 1725-30, 2010.

FURTADO, S.G.; NEPOMUCENO, J.C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio do teste wts (Warts). **Perquirere**, v. 9, p. 224-240, 2012.

GRAF, U.; Spanó, M.A.; Guzmán, J. R.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixture as well as for studies of antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, v. 6: p. 9-13, 1996.

HIB, J.; ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GETEC, v.15, p.13-27/2024

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DE BEBIDAS FERMENTADAS

JENNINGS, B. H. *Drosophila* - a versatile model in biology e medicine. **Materials Today**, v. 14, p. 190-195, 2011.

JUSTICE, R.W.; ZILIAN, O.; WOODS, D.F.; NOLL, M.; BRYANT, P.J. The *Drosophila* tumor suppressor gene Warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes and Development**, v. 9, n. 5, p.534-546, 1995.

KIM, S. I.; J. W.; JUNG, J. W.; A. H. N, Y. J.; RESTIFO, L. L.; KWON, H. W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 4, p.509-517, 2011.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 2, n. 2, p.1-7, 2002.

LOURO, I. D. et. al.. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MENEZES, Ligia. **Como manter seu filho longe do álcool** Disponível em: <<http://educarparacrescer.abril.com.br/comportamento/alcool-642504.shtml>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

MORETTON, Cedric. Analyse des caramels liquides : developpement et validation de nouvelles methodes basees sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC). Other. Universite Claude Bernard - Lyon I, 2009. French. Disponível em: http://www.sethness.com/caramel_color_facts/properties.php. Acesso em Setembro/2016.

MORAIS, C.R; ET ALL. Assessmento carcinogenic potential of soft drinks cola, diet cola, orange and lemon, produced in the city of Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil. **Bioscience Journal**, v. 32, n.4, p. 1025-1039, 2016.

NISHIYAMA, Y; ET ALL. A human homolog *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**, v. 459, n. 2, p.159-165, 1999.

ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquiere**, v. 6, p. 55-69, 2009.

ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPUMOCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.8, p. 2598-2604, 2012.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**. 63: 411-436, 2011.

RODRIGUES, J. N. S.; CAMPOS, C. F.; MORAIS, C. R.

PINKSY, I; JUNDI, S A. R. J. O impacto da publicidade de bebidas alcoólicas sobre o consumo entre jovens: revisão da literatura internacional. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 30, n. 4, p. 362-374, 2008;

POTTER, C.J.; TURENSCHALK, G.S.; XU, T. *Drosophila sp* in cancer research: an expanding role. **Trends Genetic**. V. 16, p. 33-39, 2000.

PRF. **Conhecendo a Lei seca**. Disponível em: <<http://www.dprf.gov.br/PortalInternet/leiSeca.faces#faq3>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

READ, A. P.; STRACHAN, T. **Genética molecular humana**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

REITER, L. T.; POTOCKI, L.; SAM, C.; GRIBSKOV, M.; BIER, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 11, p. 1114-1125, 2001.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogeneses. **Mutation Research**, v. 498, n.1, p. 181-191, 2001.

SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C.. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 8, p. 80-94, 2011.

SIQUEIRA, Priscila Becker; BOLINI, Helena Maria André; MACEDO, Gabriela Alves. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.4, p. 491-498, 2008.

TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and Mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.189, p. 375-379, 1987.

VARELLA, Dráuzio. **Cirrose**. Disponível em: <<http://drauziovarella.com.br/dependencia-quimica/alcoolismo/cirrose/>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

VARELLA, Dráuzio. **Pancreatites**. Disponível em: <<http://drauziovarella.com.br/entrevistas-2/pancreatites-entrevista/>>. Acesso em: 20 abr. de 2016.

XU, T.; ET ALL. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v. 12, n. 4, p.1053-1063, 1995.

ZENKEVICH, I. G. ET ALL. Caramel standardization with respect to 5-hydroxymethylfurfural. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 36, n.1, p. 50-53, 2002.