

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE  
CEVADA EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA  
HIPERLIPÍDICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Alice Mesquita Zimmermann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

# **POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE CEVADA EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA**

**por**

**Alice Mesquita Zimmermann**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg**

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE CEVADA EM RATOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA**

elaborada por  
**Alice Mesquita Zimmermann**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**José Laerte Nörnberg, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Claudia Severo da Rosa, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Virgínia Cielo Rech, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus... Deus forte e fiel, pelas oportunidades, pelo conhecimento e pela criatividade. Também por ter enviado todo o suporte necessário e pessoas que me auxiliaram incontestavelmente.

Ao meu amado Bruno, esposo sempre presente, pelo amparo e pela paciência. Para sempre serei grata!

Aos demais familiares, pelo apoio e admiração. Agradeço as palavras de ânimo e de incentivo.

Ao meu professor orientador, Prof. Dr. José Laerte Nörnberg, pessoa digna de honra pela sabedoria e pelo empenho na arte de ensinar.

À Aline Bezerra, obrigada pela ajuda com os extratos. Sua participação neste trabalho foi fundamental.

À Mariana, muito prestativa e capaz, pelo trabalho em equipe e grande ajuda.

À estagiária Alessandra, agradeço por ter acompanhado meu experimento colaborando sempre com o que fosse necessário.

Aos colegas de laboratório e do curso de pós-graduação, pela companhia e pela prontidão em ajudar.

Aos professores do curso de pós-graduação, por todos os ensinamentos.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, pelos serviços prestados.

**“A sabedoria é a coisa principal; adquire pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento”.**

**(Pv 4:7)**

**“Porque o SENHOR dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento”.**

**(Pv 2:6)**

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria-RS/Brasil

### **POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE CEVADA EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA**

Autora: Alice Mesquita Zimmermann

Orientador: José Laerte Nörnberg

Data e Local: Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2010.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos antioxidantes, o que causa injúria celular, desencadeando e agravando algumas patologias. Desta forma, pesquisas buscam alternativas para amenizar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, melhorando a capacidade antioxidant do organismo, que pode ser uma alternativa no tratamento e na prevenção das enfermidades e de suas complicações. Os polifenóis pertencem a uma classe de fitoquímicos que se destacam pelo papel antioxidant. A cevada é um cereal rico em polifenóis, os quais podem inibir a oxidação das lipoproteínas, reduzindo os agravos do estresse oxidativo. Assim, objetivou-se estudar o efeito do extrato de grãos de cevada sobre a oxidação lipídica, em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. O experimento foi conduzido por um período de 67 dias, durante os quais os animais foram submetidos à dieta rica em gordura suína, sendo um dos grupos experimentais suplementados com extrato de cevada. Foi avaliado o ganho de peso corporal e o consumo alimentar, foram feitas análises bioquímicas do soro e foi quantificado o malondialdeído no tecido hepático. Não houve diferenças no ganho de peso e nos parâmetros bioquímicos dos animais. Experimentalmente, o extrato de cevada reduziu a lipoperoxidação no fígado dos ratos, causada pela dieta hiperlipídica, portanto, a cevada é um cereal rico em polifenóis, sendo que seu extrato é um efetivo antioxidant.

Palavras-chave: estresse oxidativo; extrato de cevada; dieta hiperlipídica.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Pos-Graduate Course of Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **ANTIOXIDANT POTENCIAL OF BARLEY EXTRACT IN RATS SUBJECTED TO HIGH-FAT DIET**

Author: Alice Mesquita Zimmermann

Adviser: José Laerte Nörnberg

Date and Place: Santa Maria, February, 26, 2010.

The oxidative stress is an imbalance between reactive oxygen species and the antioxidants action capacity, which cause cellular injury, triggering and exacerbating some pathologies. Thus, researchs, seek to alternative to ease damaging effects of oxidative stress, improving the body's antioxidant capacity, which can be an alternative for the treatment and prevention of diseases and its complications. The polyphenols belong to a class of phytochemicals that show a strong antioxidant role. The barley is a cereal rich in polyphenols, can inhibit the oxidation of lipoproteins, reducing the damages of oxidative stress. This work aimed to study the effect of the extract of barley on lipid oxidation in rats subjected to high-fat diet. The experiment was conducted over a period of 67 days, where the animals were submitted to a diet rich in pork fat, one of the experimental groups supplemented with barley extract. We assessed the body weight gain and food consumption were performed biochemical analysis of serum and the malondialdehyde was quantified in liver tissue. There were no differences in weight gain and biochemical parameters of the animals. Experimentally, the barley extract reduced lipid peroxidation in the liver of mice, caused by high-fat diet, so barley is a cereal rich in polyphenols, and its extract is an effective antioxidant.

Keywords: oxidative stress; barley extract; fat diet

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

<b>Table 1 – Dry matter intake (DMI), dry matter digestibility (DMD), ether extract intake (EEI), ether extract digestibility (EED), protein intake (PI), protein digestibility (PD) and food efficiency ratio (FER).....</b>	44
<b>Table 2 – Gain weight (WGT), liver weight, heart weight, epididymal fat weight (EFW) and blood parameters of animals in different experimental groups.....</b>	45

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

<b>Figura 1 -</b> Fontes de EROS e mecanismos de defesa.....	14
<b>Figura 2 -</b> Esquema representativo da lesão celular e da peroxidação lipídica.....	15
<b>Figura 3 -</b> Classificação dos fitoquímicos dietéticos.....	20
<b>Figura 4 -</b> Estrutura química dos principais flavonóides.....	23

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

<b>Fig. 1</b> Effect of high-fat diet and supplementation with barley extract TBARS in liver of rats. The data are expressed as nmol MDA/g protein and represented as average. Values statistically different ( <sup>a,b</sup> ) ( $p<0.05$ ) compared with control ( $p<0.05$ ), by the Tukey test.....	43
--	----

## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO 1 – Manual de publicação da revista Food Chemistry.....62**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	11
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	13
<b>2.1 Estresse Oxidativo.....</b>	13
<b>2.2 Lipídios.....</b>	16
<b>2.3 Antioxidantes .....</b>	18
2.3.1 Fitoquímicos.....	19
<b>2.4 Cereais.....</b>	25
2.4.1 Cevada.....	26
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	29
<b>3.1 Antioxidant potential of barley extract in rats subjected to high-fat diet.....</b>	30
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	53
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	54

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre a saúde e o estado nutricional do organismo humano tem sido bastante estabelecida na medida em que são realizadas pesquisas no ramo da Ciência dos Alimentos. Quanto mais se estudam os alimentos, melhor é a definição de suas qualidades e benefícios (COLLI, 1998 apud FUJITA; FIGUEROA, 2003; RODRIGUES et al., 2003), tais como efeitos fisiológicos protetores e redução de riscos de doenças degenerativas (ANGELIS, 2001).

Alguns alimentos contêm substâncias biologicamente ativas que desencadeiam processos metabólicos ou fisiológicos favoráveis ao organismo, resultando em redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e na manutenção da saúde (ANJO, 2004). Os componentes com propriedades antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação das espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, contribuindo para manter a integridade celular (BELING; PUJOL; ANDRADE, 2007).

Freitas (2006) observou o aumento do efeito antioxidant de forma proporcional ao aumento da concentração de polifenóis totais nos alimentos pesquisados. Estes compostos estão presentes em grande diversidade de gêneros alimentícios e bebidas, incluindo frutas, legumes, chá, vinho tinto, café e cacau (ROGINSKY; LISSI, 2005). Alguns estudos têm quantificado grandes quantidades de compostos com ação antioxidant nos cereais, como a pesquisa de Alvarez-Jubete et al. (2010).

A cevada é um cereal muito antigo, utilizado nos tempos da Bíblia, antes mesmo do trigo (PHILIPPI, 2006). Um conteúdo abundante de compostos fenólicos na cevada indica que este cereal pode servir como uma excelente fonte de antioxidantes naturais para a prevenção de doenças e promoção da saúde (LIU; YAO, 2007).

Embora estudos anteriores tenham demonstrado presença de elevados teores de compostos polifenólicos em grãos de cevada de cultivares estrangeiras (MADHUJITH; SHAHIDI, 2006) e nacionais (BEZERRA, 2009), são escassas as pesquisas quanto à ação antioxidant destes extratos de cevada e dos grãos de

cevada (LIU; YAO, 2007). Ainda, há outros aspectos a esclarecer, tais como a biodisponibilidade destes compostos fenólicos. Portanto, mais investigações são necessárias para avaliar a ação antioxidante da cevada e seus produtos *in vivo* (MADHUJITH; SHAHIDI, 2007).

Neste contexto, objetivou-se estudar a potencialidade antioxidante de extrato de cevada em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

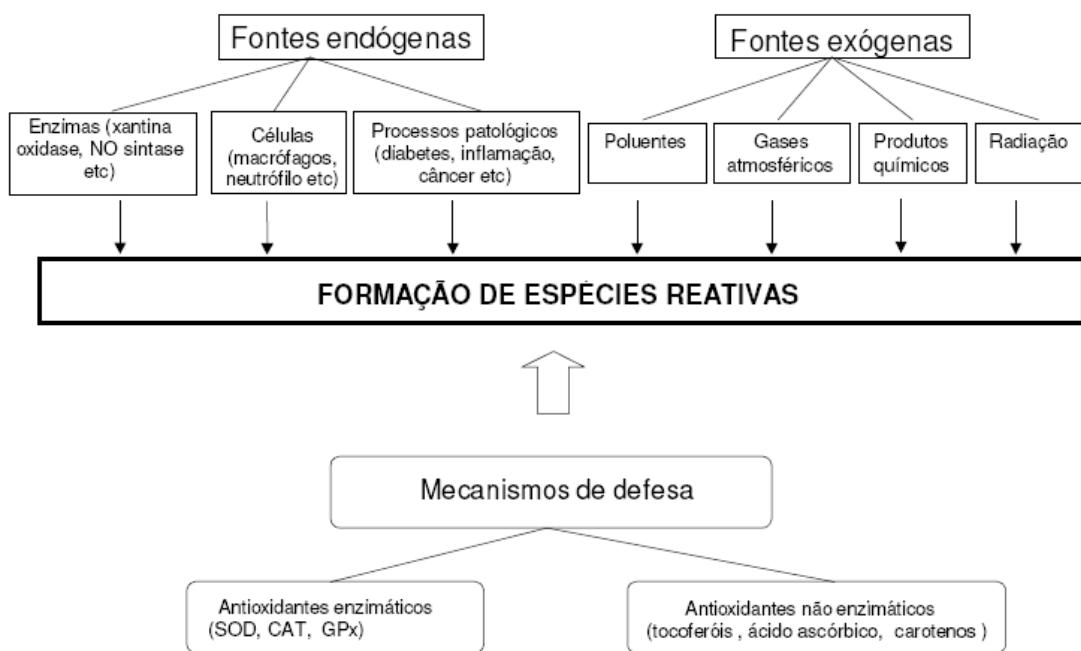
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estresse Oxidativo

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação oxidativa do oxigênio (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). As EROS são moléculas que apresentam elétrons não pareados em sua órbita externa, capazes de modificar moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácido desoxirribonucléico (DNA) (ANDRADE Jr. et al., 2005).

Dentre as principais espécies reativas de oxigênio estão: o radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), o oxigênio singlet ( $O_2^1$ ). Fazem parte das espécies reativas de nitrogênio (ERN) o óxido nítrico (NO), cátion nitrosônio ( $NO^+$ ), o ácido nitroso ( $HNO_2$ ), o íon nitrila ( $NO_2^+$ ), dentre outros (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). O oxigênio é um forte oxidante, visto que no estado fundamental possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais  $\pi$  de mesma energia, caracterizando, portanto, um estado triplete. Porém, uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete, pode ser gerada por um acréscimo de energia e é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental (RONSEIN et al., 2006).

Os RLOS podem ser produzidos por fontes endógenas e exógenas (SALVADOR; HENRIQUES, 2004) (**Figura 1**). Endogenamente, são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, sob a forma de EROS ou de RLOS (FERREIRA; ABREU, 2007), principalmente nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no citocromo P-450, na fagocitose e na xantina desidrogenase (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).



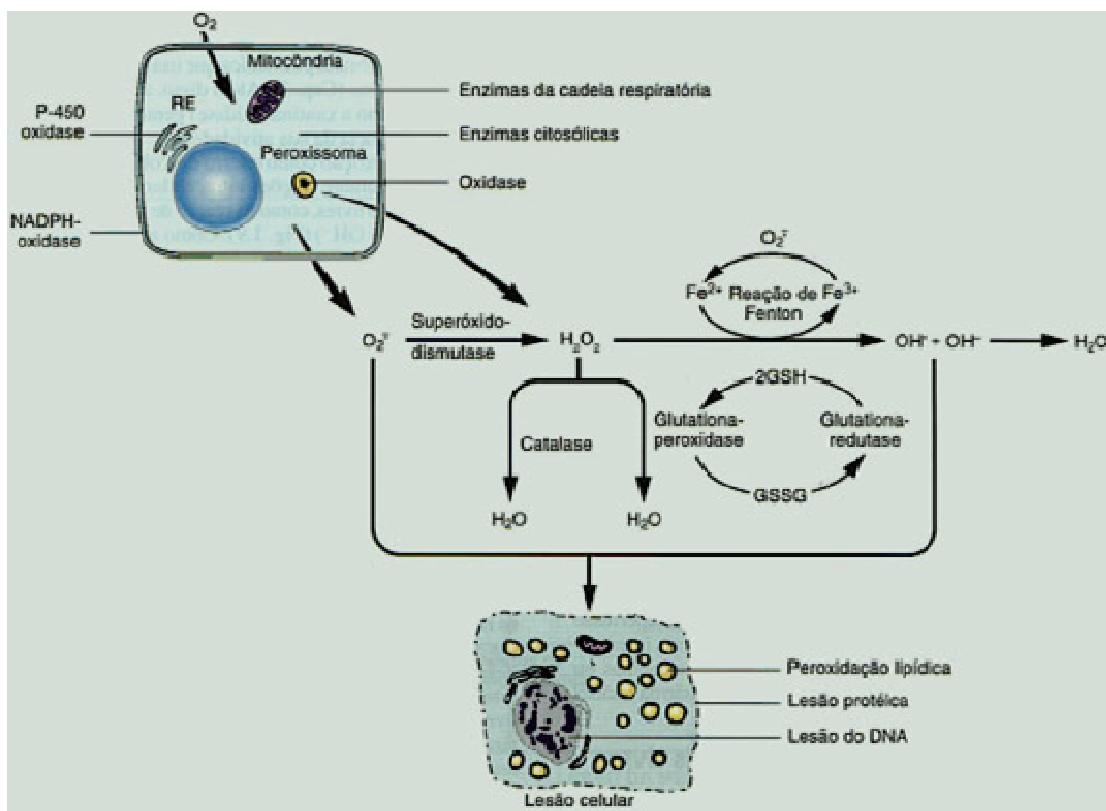
**Figura 1 -** Fontes de EROS e mecanismos de defesa (**fonte:** Freitas, 2006).

Estas EROS favorecem a formação de lesões celulares e danos aos lipídios, ao DNA, às proteínas, às mitocôndrias e às membranas, que podem culminar em diversas patologias e efeitos negativos ao organismo, como envelhecimento precoce, desenvolvimento de câncer e de doenças como as degenerativas, as neurológicas, as cardiovasculares (RODRIGUES et al., 2003; LIMA et al., 2006) e o diabetes tipo 2 (XIE et al., 2007).

Quando a produção de EROS é aumentada, há um desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes no organismo (HOPPS et al., 2010), conhecido como estresse oxidativo (KOURY; DONANGELO, 2003). Estudar o estresse oxidativo é muito importante devido ao seu envolvimento na progressão e na gravidade das doenças (SALMON; RICHARDSON; PÉREZ, 2010).

A reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado é chamada de peroxidação lipídica ou de lipoperoxidação (Figura 2). Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e de aldeídos, tais como malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001). O MDA é

considerado um biomarcador presuntivo de peroxidação lipídica nos organismos vivos (MATEOS et al., 2005).



**Figura 2** - Esquema representativo da lesão celular e da peroxidação lipídica (fonte: <http://images.google.com.br>).

O aumento do estresse oxidativo é um fator relevante na síndrome metabólica e contribui para o desenvolvimento de complicações metabólicas e cardiovasculares (HOPPS et al., 2010), como a disfunção vascular, a qual é demonstrada pela contração arterial prejudicada e pela insuficiência de relaxamento do endotélio e do músculo vascular liso (RODRIGUES; ÉVORA; SCHAFF, 2004).

O estresse oxidativo também desempenha um papel fundamental na patogênese da aterosclerose (VASSALLE et al., 2008), que ocorre por meio da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas paredes das artérias. Dois estágios definem o processo: o primeiro resulta na oxidação da LDL, com pouca alteração em apolipoproteína (apo B). O segundo estágio começa quando monócitos

são recrutados para a lesão e transformam-se em macrófagos. Esta LDL oxidada é modificada e, por isso, torna-se aterogênica. Ainda, há uma interação de anticorpos anti-LDL com a LDL oxidada, que também aumenta o potencial aterogênico (OLIVEIRA et al., 2002).

O estresse oxidativo pode ser crítico para a manutenção da saúde sob estados inflamatórios crônicos (SALMON; RICHARDSON; PÉREZ, 2010). Desta forma, é considerado um indicador das condições relacionadas às doenças cardiovasculares e aos processos inflamatórios (VASSALLE et al., 2008). Assim, acredita-se que, em um futuro próximo, a determinação de estresse oxidativo poderá contribuir para identificar um subconjunto de pacientes com síndrome metabólica em risco aumentado de eventos cardiovasculares e que são candidatos a terapias mais intensivas (HOPPS et al., 2010), visto que sua estimativa pode representar um instrumento valioso na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença arterial coronariana (VASSALLE et al., 2008).

Além disso, o estresse oxidativo está implicado na patogênese da doença e do envelhecimento no fígado (COGGER et al., 2004). O fígado é considerado um órgão chave no organismo, pelos seguintes motivos: maior responsável pelo metabolismo de antioxidantes na dieta, um dos principais órgãos suscetíveis a danos oxidativos pelos RLOS, responsável pela desintoxicação de xenobióticos e tem um papel fundamental no metabolismo lipídico (MATEOS et al., 2005).

## 2.2 Lipídios

Os lipídios são insolúveis em água, compostos por carbono, hidrogênio e oxigênio, porém com uma proporção bem maior de carbonos e de hidrogênios do que de oxigênio, sendo capazes de proporcionar mais energia por grama que carboidratos e proteínas (WHITNEY; ROLFES, 2008).

Ácido graxo é um composto orgânico formado por uma cadeia de carbonos com um grupo ácido ( $\text{COOH}$ ) em uma extremidade e um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) na outra. Pode ser saturado, quando carrega um número máximo de átomos de hidrogênio, ou insaturado, quando possui ligações duplas (WHITNEY; ROLFES, 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados constituem-se de duas famílias de ácidos graxos: ácido linoléico ( $\omega 6$ ) e ácido linolênico ( $\omega 3$ ), distintos pela localização da primeira dupla ligação contida na molécula a partir do grupo metil terminal do ácido graxo. Estes ácidos graxos poliinsaturados não podem ser sintetizados pelo organismo humano, devendo ser obtidos pela dieta (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Podem trazer importante contribuição, não somente na redução do risco de várias doenças, mas também, nos aspectos críticos do crescimento e desenvolvimento neonatal (BRANDÃO et al., 2005).

São classes de lipídios, os triglycerídeos, os fosfolipídeos, os esteróis e as vitaminas lipossolúveis. O colesterol é um lipídio bastante conhecido, pertencente à classe dos esteróis e presente somente em alimentos de origem animal, como carnes, ovos, peixes, aves e laticínios (WHITNEY; ROLFES, 2008). É componente essencial da membrana da maioria das células e tem se mostrado envolvido em uma grande variedade de funções celulares, como a modulação da função enzimática e da permeabilidade. A importância do colesterol para o funcionamento normal das membranas celulares está em sua capacidade de alterar as propriedades fundamentais da bicamada fosfolipídica e de interagir diretamente com as proteínas da membrana (ALBERT; BOESZE-BATTAGLIA, 2005).

Quando o colesterol forma depósitos nas paredes das artérias pode levar a efeitos danosos no organismo (WHITNEY; ROLFES, 2008). Para isto, é importante avaliar o nível de colesterol sanguíneo, que é influenciado pela quantidade e pela qualidade dos lipídios consumidos (BRAGAGNOLO; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Um alto teor de gordura na dieta também pode induzir a oxidação lipídica e, posteriormente, contribuir para o elevado risco de algumas patologias (MING et al., 2009).

Em um estudo realizado por Jaldin et al. (2006) pôde-se notar a influência da dieta no processo de formação aterosclerótica, quando coelhos foram suplementados com gema de ovo, que é rica em colesterol e em gorduras saturadas. Como consequência desta dieta houve o aumento dos níveis de colesterol total e frações, bem como a formação de estrias gordurosas no arco aórtico e na aorta abdominal.

Por outro lado, a gordura dietética aumenta a saciedade, retardando o esvaziamento gástrico e estimulando a liberação de hormônios. A saciedade é controlada por uma cascata de fatores que começa quando um alimento é

consumido e continua assim que entra no trato gastrointestinal e é digerido e absorvido. São ativados sinais em áreas específicas do cérebro que estão envolvidos na regulação do consumo de energia, em resposta às percepções sensoriais e cognitivas do alimento consumido e à distensão do estômago. É importante observar que um aumento no teor de gordura em um alimento ou na dieta tende a aumentar a palatabilidade e a densidade energética, os quais também podem afetar a saciedade e o consumo de energia (BENELAM, 2009).

### 2.3 Antioxidantes

Constantemente o organismo está combatendo a ação das EROS, também geradas em processos inflamatórios por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Para isto, as células apresentam uma atividade antioxidante de autoproteção contra danos oxidativos composta de componentes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase) e não-enzimáticos (fitoquímicos, tocoferol e ácido fólico) (HOPPS et al., 2010).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade (**Figura 1**). Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear o início da oxidação, ou seja, são as enzimas que removem as EROS. Na segunda classe, estão as moléculas que interagem com as EROS e são consumidas durante a reação, ou seja, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

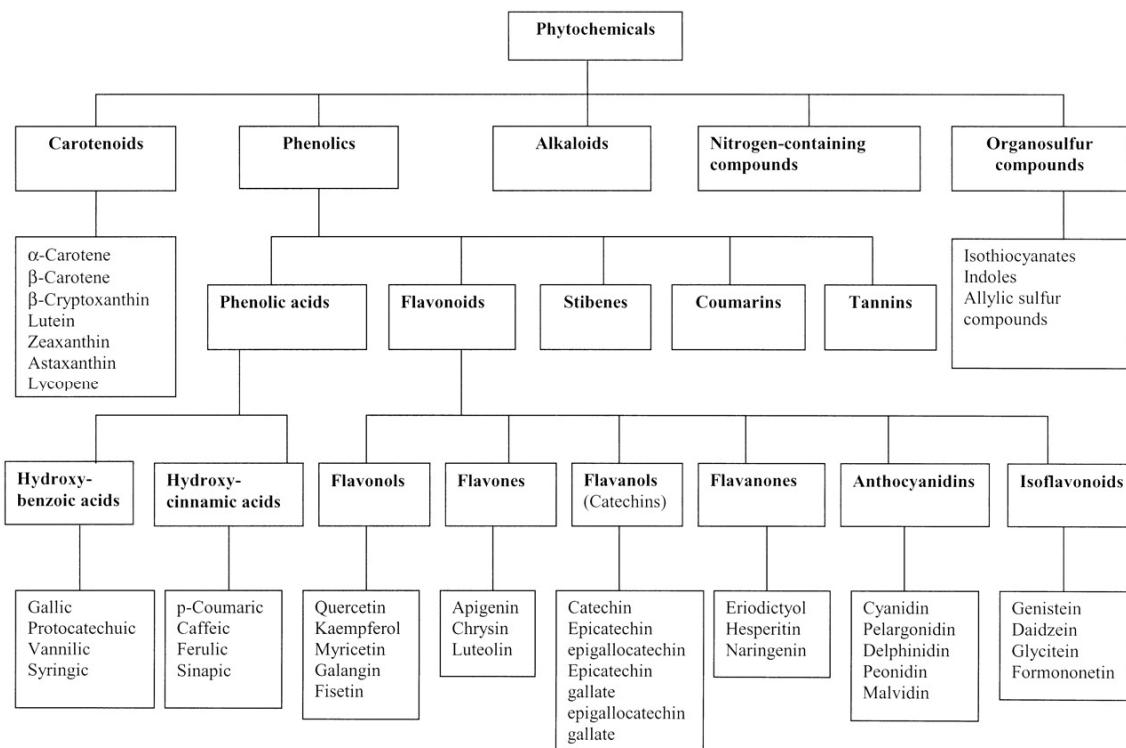
Dentre os principais agentes antioxidantes dietéticos envolvidos na redução do risco de doenças estão os fitoquímicos, que são compostos bioativos, provenientes de diferentes partes de plantas (sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias, ervas) (FERREIRA; ABREU, 2007). Para extrair estes componentes bioativos de plantas tem-se utilizado a extração com solventes (LIU; YAO, 2007). Também são extremamente importantes na interceptação dos RLOS o ácido ascórbico, os carotenóides, o tocoferol, os flavonóides, o selênio e o zinco (DRAGSTED, 2008).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os RLOS é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os RLOS gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos RLOS. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses RLOS com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Em vista disso, a busca por antioxidantes naturais para usos dietéticos, cosméticos e farmacêuticos tornou-se um desafio principal da pesquisa industrial e científica durante as últimas duas décadas. Esforços para obter amplo conhecimento sobre o poder dos antioxidantes de plantas e para aproveitar as suas potencialidades estão aumentando (ALI et al., 2008).

### 2.3.1 Fitoquímicos

Fitoquímicos são compostos produzidos e acumulados em plantas (CARDOSO; BARRÉRE; TROVÃO, 2009). A ingestão média de fitoquímicos é de aproximadamente 1 a 1,5 g/dia em uma dieta que inclui frutas, verduras, chá e vinho tinto (ANJO, 2004). São classificados em carotenóides, fenólicos, alcalóides, compostos contendo nitrogênio e compostos organosulfurados (LIU, 2004) (**Figura 3**).



**Figura 3 - Classificação dos fitoquímicos dietéticos (fonte: LIU, 2004).**

Os carotenóides fazem parte dos terpenóides, juntos com os limonóides, os fitoesteróis e as saponinas, que apresentam atividade antioxidante e interação com as EROS por divisão de sua extensa cadeia carbônica em membranas lipídicas. Alguns terpenos são encontrados naturalmente em grãos e têm relação com a redução do risco de câncer, já demonstrado em estudos *in vivo* (ANJO, 2004).

Carotenóides são os pigmentos mais generalizados da natureza e também têm recebido atenção considerável por ser uma próvitamina com função antioxidante. Foram identificados na natureza mais de 600 carotenóides diferentes. Eles estão presentes em plantas, microrganismos e animais. A estrutura pode ser ciclizada em uma ou ambas as extremidades, podem ter níveis diferentes de hidrogenação, ou podem possuir oxigênio contendo grupos funcionais. Licopeno e β-caroteno, são exemplos de carotenóides acicilizados e ciclizados, respectivamente. O traço mais característico de carotenóides é a longa série de duplas ligações conjugadas que formam a parte central da molécula. Isto lhes dá a sua estrutura,

reatividade química e propriedades de absorção de luz.  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina são capazes de funcionar como próvitamina A (LIU, 2004).

Os compostos fenólicos são estruturas químicas com hidroxilas e anéis aromáticos, em formas simples ou de polímeros (ANGELO; JORGE, 2007), podendo estabilizar o elétron desemparelhado. Devido à presença deste anel aromático é que eles possuem uma estrutura antioxidante ideal (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Os compostos fenólicos possuem função antioxidante, seqüestrando EROS e modulando diversas enzimas na defesa do corpo contra o estresse oxidativo (FREITAS, 2006). Esta atividade antioxidant depende da estrutura, do número e das posições dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (BALASUNDRAM; SUNDARAM; SAMMAN, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que muitas dietas constituídas de polifenóis, derivados de plantas, são mais efetivos antioxidantes *in vitro* do que o tocoferol ou ácido ascórbico. Portanto, pode contribuir significativamente para a proteção efetiva *in vivo* (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997), atuando como antioxidantes endógenos (VINSON et al., 1995).

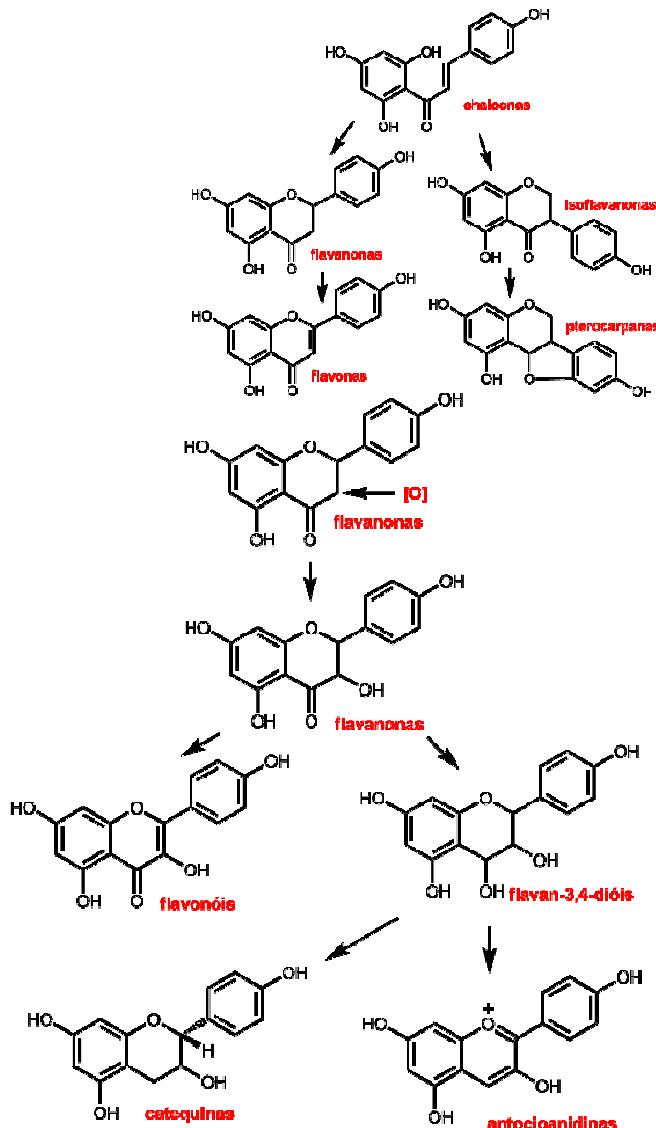
Uma dieta rica em substâncias fenólicas (derivadas do ácido cinâmico, como o ácido caféico) apresenta uma baixa oxidação de constituintes lipídicos, prevenindo o desenvolvimento de doenças, como a aterosclerose (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004), pois podem ser absorvidos e contribuir para a inibição da oxidação da LDL (VINSON et al., 1995).

Alguns compostos fenólicos têm ação hipocolesterolêmica mediada por redução na absorção de colesterol no intestino, aumento na excreção de ácidos biliares (RIQUE et al., 2002) e inibição da ação de enzimas de substâncias de resposta inflamatória (eicosanóides) (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Desta forma, os compostos fenólicos são parte essencial da dieta humana (BALASUNDRAM; SUNDARAM; SAMMAN, 2006), contribuindo para a prevenção de doenças neurológicas, cardiovasculares e cancerígenas (SOARES et al., 2008).

Os fenólicos são classificados como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos (**Figura 3**). Estima-se que os flavonóides são responsáveis por cerca de dois terços dos compostos fenólicos da dieta e o terço restante é composto por ácidos fenólicos (LIU, 2004).

Ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grandes grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Derivados do ácido hidroxibenzóico incluem ácidos p-hidroxibenzóico, protocatequina, vanílico, seríngico, e gálico. Derivados do ácido hidroxicinâmico incluem ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sináptico. Eles são comumente presentes na forma ligada e compõem uma estrutura complexa (SOARES, 2002) como ligninas e taninos hidrolisáveis (LIU, 2004) e como o ácido caféico, que associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

Flavonóides, que ostentam a estrutura C6-C3-C6, são responsáveis por mais da metade dos mais de oito mil diferentes compostos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDARAM; SAMMAN, 2006). Variações estruturais nos anéis permitem subdividir os flavonóides em várias famílias: flavonóis (quercetina e campoferol), flavonas (apigenina, luteolina e crisina), flavanóis-catequinas (epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina), isoflavonas (genisteína) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997), flavononas (eriodictiol) e antocianidinas (cianidina, malvidina) (LIU, 2004) (**Figura 4**).



**Figura 4 - Estrutura química dos principais flavonóides (fonte: <http://images.google.com.br>)**

Os flavonóides compõem um grupo de antioxidantes potentes, que têm extensivas propriedades biológicas, como a redução do risco de doenças cardiovasculares, por meio da ação antioxidante na LDL e modesta atividade antiplaquetária e anti-inflamatória (RIQUE et al., 2002). Naringina e rutina reduzem as concentrações de colesterol total, LDL, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e triacilgliceróis, não apresentando, entretanto, reduções nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (SILVA et al., 2001).

Os flavonóis-catequinas, uma classe de polifenóis presente no chá verde podem inibir o dano oxidativo do DNA, sendo que de seus componentes a epicatequina atua tão bem quanto a epicatequina galato e estas exercem atividade maior que a epigalocatequina-galato que, por sua vez, atuam melhor que a epigalocatequina (WEI et al., 2006).

As antocianinas são pigmentos presentes nos alimentos e apresentam capacidade antioxidante superior aos outros fenólicos presentes nas uvas, já que a correlação entre antocianinas e capacidade antioxidante foi superior à correlação entre fenólicos totais e capacidade antioxidante. Logo, há forte correlação entre o conteúdo de antocianinas totais e a capacidade antioxidante (ABE et al., 2007).

Incluído nos estilbenos está o resveratrol, que possui atividade antifúngica (SILVA et al., 2007). O resveratrol tem efeito benéfico no organismo, inibindo os danos causados pelo estresse oxidativo. Em ratos que foram induzidos ao estresse oxidativo por meio da administração crônica de álcool, pôde-se observar que a suplementação com resveratrol inibe a peroxidação lipídica hepática (KASDALLAH-GRISSA et al., 2007).

Do ponto de vista biológico, as proantocianidinas (taninos condensados) e estilbenos (1,2-diarilletenos) são as duas mais importantes classes de polifenóis da uva e do vinho. Isto se deve aos seus efeitos benéficos à saúde, relacionados com a sua ação protetora contra a doença cardiovascular e a capacidade em captar os RLOS (SUN; SPRANGER, 2005).

Taninos são compostos de grande interesse na química e na ecologia. Eles têm vários efeitos sobre a digestibilidade dos alimentos. Muitas espécies produtoras de taninos são usadas na medicina popular para diferentes finalidades (MONTEIRO et al., 2005), visto que agem como antioxidantes na prevenção de doenças cardiovasculares (ALI et al., 2008).

Os alcalóides fazem parte de um grupo de compostos complexos de nitrogênio, derivados de uma variedade de fontes, como microrganismos, organismos marinhos e plantas, por meio de complexas vias de biossíntese. São usados como medicamentos, no tratamento de uma ampla gama de queixas clínicas, por exemplo, como agentes anticancerígenos, antimálaricos e analgésicos, e no tratamento de parkinsonismo, hipertensão e doenças do sistema nervoso central. Muitas drogas valiosas são derivadas desses compostos naturais. Há

interesse no uso de alcalóides para fornecer novos compostos para a síntese de medicamentos novos ou melhorados (RATHBONE; BRUCE, 2002).

Nos compostos nitrogenados estão inclusos os glucosinalatos (ANJO, 2004). Os compostos organosulfurados estão presentes no alho e na cebola, sendo conhecidos como inibidores da carcinogênese química (REINA; MONTANARI; DONNICI, 2002).

## 2.4 Cereais

Os cereais são um dos alimentos mais importantes na dieta porque eles têm alto teor de carboidratos que podem fornecer energia (LIU; YAO, 2007), além de fazerem parte do hábito alimentar de diversos povos, serem de baixo custo e pela grande variedade de formas de utilização (PHILIPPI, 2006). Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de grãos integrais e produtos à base de grãos está associado ao risco reduzido de doenças (ADOM; LIU, 2002). Isto pode ser devido às fibras e micronutrientes na camada externa e em frações do germe do grão, agindo em conjunto para combater o estresse oxidativo, a inflamação, a hiperglicemia e a carcinogênese (FARDET; ROCK; RÉMÉSY, 2008).

O consumo de cereais, como aveia e cevada, produz efeitos fisiológicos positivos, como a redução do colesterol (AMES; RHYMER, 2008). São ricas em fibra solúvel, como as  $\beta$ -glucanas, que são polímeros de glicose, agindo na redução do colesterol no sangue (JONKER et al., 2010). Os benefícios à saúde proporcionados por grãos inteiros são atribuídos em parte à sua composição fitoquímica única (ADOM; LIU, 2002).

Os principais fitoquímicos dos grãos incluem várias classes de compostos fenólicos, como flavonóides e derivados cumarínicos, que possuem propriedades antioxidantes (KAMATH; CHANDRASHEKAR; RAJINI, 2004). Ácidos fenólicos como o ácido ferúlico são característicos de cereais. Eles podem “varrer” as espécies reativas de oxigênio *in vitro* e *in vivo* (FARDET; ROCK; RÉMÉSY, 2008).

A aveia (*Avena sativa L.*) é uma fonte de muitos dos compostos que exibem atividade antioxidante. Os antioxidantes mais abundantes na aveia são: tocoferol,

ácido fítico, compostos fenólicos, onde os esteróis e flavonóides também estão presentes (PETERSON, 2001).

Há grande diversidade de compostos fenólicos, principalmente de flavonóides, no grão de arroz integral, o qual possui grande capacidade antioxidante. Estes dados fornecem oportunidades para aumentar o teor de compostos fenólicos e de flavonóides, principalmente no arroz branco (SHEN et al., 2009). Arroz preto em particular, têm demonstrado possuir propriedades bioativas e farelo de arroz também contém altos níveis de compostos antioxidantes (KONG; LEE, 2010).

O farelo de trigo também é uma excelente fonte de antioxidantes naturais, como os ácidos fenólicos e podem contribuir para o total de carotenóides na dieta. No entanto, diferentes cultivares apresentam diferentes quantidades de compostos fitoquímicos (ZHOU; SU; YU, 2004). Extratos de trigo têm apresentado um importante papel antioxidante (YU et al., 2002).

A farinha de trigo contém rutina (12,7 mg/100 g), catequina (3,30 mg/100 g), epicatequina (20,5 mg/100 g) e epicatequina galato (1,27 mg/100 g). Quanto às frações do grão, a maior concentração de rutina está presente no embrião e nos cotilédones das sementes do trigo maduro (DANILA et al., 2007). Inglett et al. (2009) encontrou no trigo sarraceno uma quantidade de polifenóis totais de até 18,5mg/g de trigo.

O sorgo ocupa o quinto lugar entre as culturas de cereais no mundo. Seu consumo na alimentação humana ainda é limitado, embora o sorgo seja rico em compostos fenólicos e taninos, que são componentes anticancerígenos e cardioprotetores. No entanto, pesquisas sugerem que uma dieta rica em sorgo pode ser útil no combate a doenças e que a produção de RLOS desempenha um papel fundamental (KAMATH; CHANDRASHEKAR; RAJINI, 2004).

#### 2.4.1 Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare L.*) é um cereal antigo e possui extensa produção mundial. No entanto, apenas cerca de 2% de sua colheita tem sido direcionada para a alimentação humana, sendo o restante direcionado para a alimentação animal e para a indústria da cerveja (BAIK; ULLRICH, 2008). Mas o interesse da sua

utilização na alimentação humana tem aumentado, devido ao seu alto valor nutricional (YALÇIN et al., 2007) e por ser facilmente disponível e de baixo custo (OSCARSON et al., 1996 apud HELM; FRANCISCO, 2004).

A cevada é o cereal que mais se adapta à produção de grãos em latitudes, altitudes e climas extremos e continua a ser uma fonte de alimento principal ainda hoje nas nações do Himalaia, Etiópia e Marrocos (BAIK; ULLRICH, 2008). É o quarto cereal de maior produção e consumo no mundo. No Brasil há uma extensa produção de cevada nos estados do sul (CAIERÃO; SPEROTTO, 2006). Há um aumento no interesse em utilizar cevada em produtos à base de cereais, como substituta parcial ou total de trigo, de aveia, de arroz e de milho, devido ao seu valor nutricional e a seus benefícios à saúde. Para usos alimentares, os grãos de cevada são descascados e podem ser consumidos na forma de grãos, de flocos ou de farinha. Estes produtos podem ser usados na elaboração de pães, de bolos, de biscoitos, de cereais matinais, de macarrão, de salgadinhos extrusados, de pasta de soja, de molho de soja, de guisados, de sopas, de mingaus e de alimentos para bebês (BAIK; ULLRICH, 2008).

Alimentos integrais de cevada parecem estar associados a um aumento da saciedade e da perda de peso. Ainda, as  $\beta$ -glucanas, presentes nos produtos alimentícios elaborados com cevada, estão associadas com a redução do colesterol e do índice glicêmico sanguíneo (BEHALL; SCHOLFIELD; HALLFRISCH, 2004). A cevada também é rica em compostos com função antioxidante (HOLTEKJOLEN et al., 2008).

Bezerra (2009) quantificou, por meio da extração hidroetanólica, de 752 a 1564mg de compostos fenólicos/Kg de cevada, em diferentes cultivares de cevada. Também identificou os seguintes compostos: rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina.

Freitas (2006) encontrou na cevada um conteúdo médio de polifenóis totais de 292 mg equivalente a ácido gálico (GAE)/100g, e 1779,75  $\mu$ Mol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox/100g. Sendo os principais grupos de compostos fenólicos, os flavanóis e derivados hidroxicinâmicos. Também foi observado, neste experimento, que a atividade antioxidante aumentou de forma proporcional ao aumento da concentração de polifenóis totais e que cultivares de cevada contém mais fenólicos totais que o trigo, o centeio e a aveia (ZIELINSKI; KOZLOWSKA, 2000).

Os compostos fenólicos presentes em cultivares de cevada podem ser eficazes na eliminação dos radicais livres, controlando a oxidação do LDL e inibindo a proliferação das células. O processamento de grãos de cevada afeta o seu teor de fenólicos totais, a capacidade em captar RLOS, o comportamento antioxidante e a inibição da oxidação do LDL. No entanto, extratos de grãos de cevada (processados ou não) podem inibir a oxidação da LDL. Portanto, o uso da cevada para consumo humano em várias formas de tratamento pode apresentar um grande potencial para melhorar a saúde humana (GALLEGOS-INFANTE et al., 2010).

A extração aquosa, metanólica, etanólica e com acetona, separados ou misturados, é comumente usada para extrair compostos fenólicos a partir de matérias-primas. Os solventes de extração afetam significativamente o conteúdo de fenóis totais e de proantocianidinas do extrato. O extrato pode ser usado como uma fonte facilmente acessível de antioxidantes naturais e como um possível suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica (LIU; YAO, 2007).

Extratos metanólicos de sementes inteiras de seis cultivares de cevada (Falcon, AC Metcalfe, Tyto, Tercel, Phoenix e Peregrine) foram avaliados quanto ao seu teor de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados variaram de 0,68 a 1,19 mg equivalente ao ácido ferúlico/g de matéria desengordurada. Extratos fenólicos de cevada apresentaram alta atividade antioxidante e antiproliferativa (MADHUJITH; SHAHIDI, 2006).

O extrato de malte de cevada contém muitos compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, sendo considerado como fonte de antioxidantes naturais (QINGMING et al., 2010).

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito apresenta-se em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista Food Chemistry. As normas da revista estão em anexo (**ANEXO 1**).

**3.1 Antioxidant potencial of barley extract in rats subjected to high-fat diet.**

Manuscrito a ser submetido para publicação

**ABSTRACT**

Objective was to study the effect of the extract of barley on lipid oxidation in rats subjected to high-fat diet. The experiment lasted 67 days. The animals were divided into three experimental groups: standard (P), high-fat diet group (L) and group with high-fat diet supplemented with barley extract (C). Feed intake of L and C groups was lowest ( $p <0.05$ ). Treatments did not influence weight gain, organ weights measured and blood parameters. However, the levels of malondialdehyde present in liver tissue were higher in group L and lower in groups P and C. Therefore, the results indicate an increased level of lipid peroxidation in liver of rats subjected to high-fat diet, which was reduced by the consumption of barley.

Keywords: oxidative stress; biological assay; lipid peroxidation

## 1. Introduction

Environmental factors, along how a high-fat diet, cause an imbalance between the antioxidants and pro-oxidant tissue. Therefore, high consumption of lipid induces oxidative stress in livers of rats (Marczuk-Krynicka, Hryniewiecki, Paluszak, Krauss & Nowak, 2009).

The exposure to stress leads to the formation of reactive oxygen species (EROS) favoring the oxidative stress, inducing a set of physiological and behavioral changes to maintain homeostasis of the organism, which can cause cell damage and damage to lipids, DNA, proteins, mitochondria and membranes (Rodrigues, Diniz, Faine, Almeida, Fernandes & Novelli, 2003; Lima, Barbosa, Santos Filho & Gouvêa, 2006).

Oxidative stress is the central factor of many diseases (Salvador, Poletto, Andreazza & Smith, 2004). This damage may lead to various diseases and negative effects to the body, such as aging, cancer development and cardiac diseases, degenerative, neurological and changes in serum glucose and lipids (Rodrigues et al., 2003; Lima et al., 2006).

Nutrients with antioxidant properties may act directly in the neutralization of the action of free radicals, preventing the loss of cellular integrity (Beling, Pujol & Andrade, 2007). Therefore, dietary antioxidants are effective means to limit lipid peroxidation *in vivo*. Recent investigations have focused on natural molecules to meet consumer concerns about the safety and toxicity (Gladine, Morand, Rock, Gruffat, Bauchart & Durand, 2007).

Polyphenols are examples of these natural components found in foods with antioxidant properties (Sokmen et al., 2005). Can be absorbed and inhibit the

oxidation of low-density lipoproteins (LDL), slowing the process of atherosclerosis (Vinson, Jang, Dabbagh, Serry & Cai, 1995). Phenolic acids, flavonoids, proanthocyanidins and tannins are polyphenols that may have beneficial effect on human health and protection against chronic diseases (Ovaskainen et al., 2008).

Among important food sources of polyphenols are the cereal (Ovaskainen et al., 2008) as well as in a large variety of natural plants (Lizcano, Bakkali, Ruiz-Larrea & Ruiz-Sanz, 2010). This contributes to the recommendations of a varied diet of fruits, cereals and vegetables (Ovaskainen et al., 2008). Cereal grains are widely consumed by do part of the feeding habits of various people, ease of culture, the low cost, and high nutritional value and variety of forms of use. The main cereals grown are oats, wheat, rye, corn, barley and triticale (Philippi, 2006), among which barley (*Hordeum vulgare L.*) is the fourth largest cereal production and consumption in the world (Caierão & Sperotto, 2006) and there is a growing interest for its use in human food (Baik & Ullrich, 2008). It is rich in compounds with antioxidant function (Holtekjolen, Baevre, Rodbotten, Berg & Knutsen, 2008), and naturally healthy (Oscarson et al., 1996 apud Helm & Francisco, 2004; Yalçın, Çelik, Akar, Sayim & Köksel, 2007).

Thus, the abundant content of phenolic compounds in barley suggests its use as a potential source of antioxidants, working in disease prevention and health promotion (Liu & Yao, 2007). Similar studies with extracts of barley has also have shown antioxidant effect (Giriwono, Hashimoto, Ohsaki, Shirakawa, Hokazono & Komai, 2010). The objective was to study the effect of the evaporated hidroethanolic extract of barley on lipid oxidation in rats subjected to high-fat diet.

## 2 Materials and Methods

### 2.1. Samples

To prepare the extract, we used barley grain of BRS Lagoa, provided by the Centro de Pesquisa da Embrapa/Trigo Passo Fundo, cultivated in Ibiaçá/Rio Grande do Sul, in 2006.

### 2.2. Preparation of extract

The extract was obtained by extraction hydroethanolic to 80%. To 100ml of extract, 80ml of ethanol and 20ml of water, then we added 64g of barley, previously ground into micro-mill, in order to obtain particle size less than 1.5 mm. Subsequently the sample was sonicated for 30 minutes at room temperature ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) and filtered through filter paper of rapid filtration to remove the waste. Subsequently, the solvent was evaporated in a rotary-evaporator at  $40^{\circ}\text{C}$ , according to Bezerra (2009).

### 2.3. Determination of total phenols

The determination of total phenolic content in the barley extract was performed by the method of Folin-Ciocalteu, according to Singleton and Rossi (1965).

## 2.4. Diets

The diets was prepared according to American Institute of Nutrition (AIN) (Reeves, Nielsen and Fahey, 1993). Were made a standard diet (P) and two hyperlipidemic diets (L and C), the latter added with extract of barley, during the animal feeding, the amount of 4mL/dia/animal. The inclusion of fat occurred at the expense of the fraction glycid using the addition of 14% of pork fat, according to Moraes et al. (2003).

The feed ingredients were mixed and sifted three times to the diets stayed homogeneous and uniform. Although they contain antioxidant (TBHQ), diets were prepared every 10 days and divided into packets of 4 kg and kept under refrigeration to avoid possible lipid oxidation of fat in the diet.

## 2.5. Animals and Treatments

We used 30 adult male rats Wistar, 50 days old and initial body weight between 148 to 270 g. The animals were divided into three experimental groups, each with 10 rats: standard (P), high-fat diet group (L) and group with high-fat diet supplemented with barley extract (C).

The animals were housed in individual metabolic cages equipped with water and food bowls and catch tray feces, maintained in a room ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ ) in a light / dark cycle 12:12 h, with free access to food and water.

The experiment was conducted in a total of 74 days, whose first seven days of adaptation to the environment, with consumption of standard diet for all groups. The animals were weighed at baseline and during the trial period, every three days.

In the experimental period (67 days) was determined amount of ration consumed daily (difference between the original amount given and the leftovers) and the amount of feces excreted. The food efficiency ratio (FER) was calculated by dividing the total weight gain of animals (g) by the total consumption of diet (g).

## 2.6. Determination of food consumption and digestibility of dry matter, lipids and proteins

To determine the intake of dry matter, ether extract and protein and dry matter digestibility of lipids and protein was performed to determine the chemical composition of feed consumed and faeces excreted, according to the techniques described by AOAC. For the determination of dry matter, faeces collected during the experiment were dried in an oven with air circulation at 65° C for 72h and then cooled, weighed and ground.

The protein content was determined by Kjeldahl method, which quantifies the total nitrogen in the sample. In the calculation of conversion of nitrogen in proteins, we used the factor 6.25 (AOAC, 1995). The determination of lipids was carried out in Soxhlet type apparatus, using ether as solvent oil, according to Instituto Adolfo Lutz (1985).

## 2.7. Blood analysis and organ weights

One day after the end of the experiment the animals were fasted 12 hours to then be anesthetized and euthanized by cardiac puncture, and then blood samples. The collected blood was then centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm to separate

serum, which was kept in a freezer until the biochemical analysis of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, total protein and albumin, which were performed with enzymatic colorimetric kits supplied by the company Doles®, whose methodology was in accordance with the relevant protocol. The proteins in liver tissue were determined by the method of Lowry et al. (1951).

The epididymal fat and other organs removed were weighed immediately after dissection of the rodents.

#### 2.8. Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was determined by quantifying of malondialdehyde (MDA) in liver of rats, according Ohkawa, Ohishi and Yagi (1979), to determine the thiobarbituric acid reactive species (TBARS).

#### 2.9. Statistical analysis

The data was subjected to analysis of variance (ANOVA) to test for differences between experimental groups. For comparison, a test Tukey was used with 5% probability of error.

### 3. Results

In the determination of total polyphenols was found 0.74 mg of gallic acid equivalent (GAE) / g of barley. The extract obtained had a yield of 30 ml, when done with 100mL of solvent hydroethanolic and 64g of barley. After evaporation of 80% of

the extract, which corresponds to the fraction of alcohol, was obtained from 6 mL of aqueous extract. After evaporation of alcohol a greater concentration of total polyphenols, but was not proportional to the reduction of volume, indicating a loss of polyphenols during the evaporation of the extract. The estimated intake of total polyphenols was 4.32 mg/day/animal.

Food intake and digestibility of dry matter were lower in groups L and C ( $p<0.05$ ). The consumption of lipids and digestibility was increased in rats subjected to high-fat diet ( $p<0.05$ ). The food efficiency ratio was also higher in the groups submitted to high-fat diet ( $p<0.05$ ) (**Table 1**).

The weight gain of animals, weight of organs and blood parameters were similar in the different treatments (**Table 2**). The determination of protein in the liver tissue showed the following mean  $\pm$  SD:  $31.77\pm7.18$  (group P),  $27.14\pm4.38$  (group L) and  $31.00\pm4.09$  (group C).

The levels of MDA, as determined by TBARS, present in liver tissue increased in rats fed high-fat diet (L group), which were lowered by diet supplemented with barley extract (group C). Thus, there is an increase in lipid peroxidation (TBARS) and reduction of these levels in the group fed diet supplemented with barley extract (**Fig. 1**).

#### 4. Discussion

The method of ultrasonic extraction for 30 minutes, using solvent hydroethanolic (80% v/v) was chosen by a greater extraction capacity of polyphenolic and its low toxicity on the other solvents (acetone and methanol) as studies Bezerra (2009). The amount of polyphenols present in barley is consistent with that identified

by Bezerra (2009) (1,02mg GAE/g), in the same cultivar. Similar amounts of total phenolic content were found in sorghum, which ranged from 0.46 to 0.76 (mg GAE/g flour) as the type of extraction used (Kamath, Chandrashekhar & Rajini, 2004).

The mount of total polyphenols present in the extract evaporated from barley was 1.08 mg GAE/mL. This value is above that of grape juice and red wine (0.62 and 0.73 mg GAE/mL, respectively) according to Moura (2009).

During the experimental period, the average daily feed consumption in the control group was  $19.17 \pm 1.42$  g in groups with high-fat diet was  $15.30 \pm 1.44$  g and  $15.13 \pm 1.50$  g (for the supplemented extract). The total food consumption and average daily consumption of animals fed high-fat diet was lower. This is probably because of the fat in the diet, because of the high-energy, increase satiety and reduce in food intake (Benelan, 2009). It is observed that the statement was offered and accepted, did not influence the acceptability of the diet by rats, whereas no effect on food intake.

Many studies showed that increased consumption of saturated fat contributes to the increase in body weight, triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol in the body which are risk factors for cardiovascular diseases (Ming, Guanhui, Zhanhao, Guang & Xuan, 2009). Contrary to expectation, no difference in weight gain between the groups, which was also observed by Melo et al. (2007) and Cherem and Bramosrki (2008). This is probably due to reduced food intake and digestibility of hyperlipidemic diets, which contributed to reducing the amount of energy absorbed. Moura (2009) offered high-fat diet and was not observed in the levels of total cholesterol, triglycerides, total protein and glucose in the blood of animals, despite having caused increase in LDL cholesterol and low HDL cholesterol.

Similarly, the liver weight and heart weight of the rats were similar between groups and represent average 2.64 and 0.2% their respective body weights. These results were similar to that found in the literature, as in the data Gladine et al. (2007).

Sources of saturated and unsaturated fats induce oxidative stress in rat liver (Marczuk-Krynicka et al., 2009), as visualized by Oliveros, Videla and Giménez (2004), by increasing the levels of TBARS tissues of rats fed a diet rich in saturated fat. In this work it was observed by increasing the levels of MDA in the liver of mice fed a diet rich in pork fat, also quantified by TBARS technique.

Through the TBARS method was identified the process of lipid peroxidation. Thiobarbituric acid reactive substances are produced during oxidative stress, which is induced by damage to lipids, or lipid peroxidation, MDA is the best known compound of TBARS (Behuliak, Pálffy, Gardlík, Hodosy, Halcák & Celec, 2009). Furthermore, compared to others is more sensitive and simple (Liu, Yeo, Doniger & Ames, 1997). Determination of serum MDA is still the most commonly used test for lipid peroxidation in biomedical sciences, as MDA is one of the major aldehydes formed after breakdown of lipid hydroperoxides. Therefore, it is considered a good biomarker of the involvement of the damage caused by free radicals in diseases associated with oxidative stress (Mateos, Lecumberri, Ramos, Goya & Bravo, 2005).

There was a clear decrease in lipid peroxidation and restoring antioxidant status in animals supplemented with barley extract, demonstrated by the low level of MDA in the liver of this group (**Fig. 1**). Similar results were also observed by Giriwono et al. (2010), with the use of yeast extract used when barley fermented barley.

This effect can be attributed in part to the antioxidant properties of polyphenols (Vinson, Teufel & Wu, 2001), which have attracted the attention of

medical scientists because of its strong ability to scavenge free radicals and break the reaction chain of these radicals *in vitro* and *in vivo* (Liu & Yao, 2007).

Many studies with extracts of several plants have been tested positive for the reduction of oxidative stress, due to the wealth of antioxidants such as polyphenols. Vijayakumar, Surya and Nalini (2004), for example, found these effects in black pepper, Gladine et al. (2007) in extracts of rosemary, grape, citrus and calendula and Papandreou et al (2009) in blueberries (*Vaccinium angustifolium*).

## **5. Conclusions**

The inclusion of pork fat, the level of 14% in the diet of adult Wistar rats reduced food intake and dry matter digestibility inhibiting the excessive weight gain and decompensation of the blood biochemical parameters, however, increased lipid peroxidation in the liver, ie, the high-fat diet can induce oxidative stress, bringing harm to the body. However, the phenolic compounds present in barley, used in the form of evaporated aqueous ethanol extract showed antioxidant activity *in vivo* by reducing lipid peroxidation in liver.

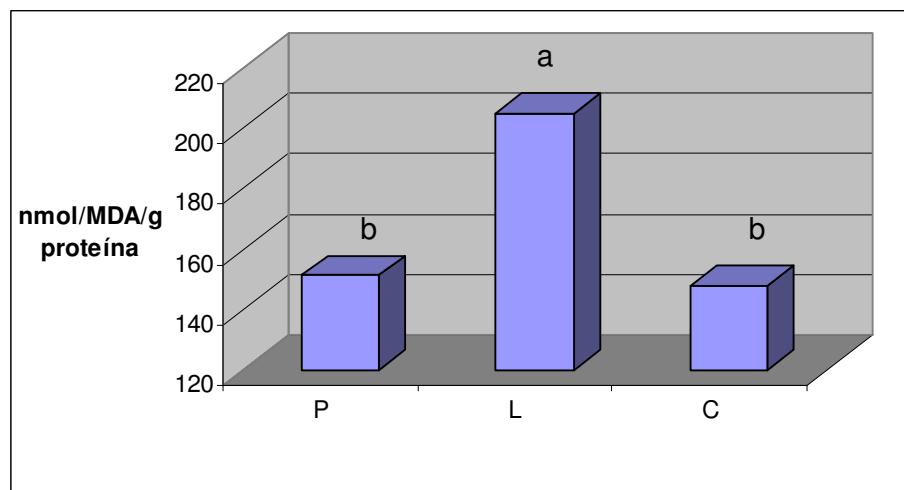
## **6. Acknowledgement**

To CAPES, for financial support in carrying out this work through the PROAP and scholarship for one year.

To Doles, the donation of laboratory Kits.

## **7. Ethics Committee**

This work was approved by Comitê de Ética e Bem Estar Animal of Universidade Federal de Santa Maria and observed ethical standards set.



**Fig. 1** Effect of high-fat diet and supplementation with barley extract in TBARS of liver of rats. The data are expressed as nmol MDA/g protein and represented as average. Values statistically different (<sup>a,b</sup>) ( $p<0.05$ ), by the Tukey test.

**Table 1** – Dry matter intake (DMI), dry matter digestibility (DMD), ether extract intake (EEI), ether extract digestibility (EED), protein intake (PI), protein digestibility (PD) and food efficiency ratio (FER).

Variables	P	L	C
DMI (g)	1284.18±95.10 <sup>a</sup>	1025.42±96.75 <sup>b</sup>	1013.66±100.54 <sup>b</sup>
DMD (%)	91.28±0.65 <sup>a</sup>	89.05±1.01 <sup>b</sup>	88.91±1.14 <sup>b</sup>
EEI (g)	56.31±4.17 <sup>b</sup>	202.57±19.11 <sup>a</sup>	200.25±19.86 <sup>a</sup>
EED (%)	95.65±1.51 <sup>b</sup>	98.53±0.52 <sup>a</sup>	98.50±0.78 <sup>a</sup>
PI (g)	172.25±12.75 <sup>a</sup>	137.54±12.98 <sup>b</sup>	135.96±13.49 <sup>b</sup>
PD (%)	90.19±0.72 <sup>a</sup>	88.67±1.32 <sup>b</sup>	88.82±1.52 <sup>b</sup>
FER	0.11±0.02 <sup>b</sup>	0.14±0.03 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>a</sup>

Values represent mean ± S.D. Values statistically different (<sup>a,b</sup>) between groups ( $p<0.05$ ) by Tukey test.

**Table 2 –** Gain weight (WGT), liver weight, heart weight, epididymal fat weight (EFW) and blood parameters of animals in different experimental groups.

Variables	P	L	C
WGT (g)	159.46±29.47	166.19±42.56	194.53±38.01
Liver weight (g)	9.43±1.72	9.48±1.82	10.64±2.11
Heart weight (g)	0.99±0.17	1.01±0.15	1.03±0.16
EFW (g)	5.29±1.03	5.96±1.38	5.70±1.25
Total cholesterol (mg/dL)	80.13±20.73	75.82±12.26	75.69±12.09
HDL (mg/dL)	110.49±53.76	103.57±38.45	85.10±17.75
Triglycerides (mg/dL)	47.86±19.63	45.71±12.04	49.96±13.78
Glucose (mg/dL)	82.02±5.31	83.65±5.90	82.28±4.03
Total protein (mg/dL)	6.73±0.87	6.67±0.60	6.81±0.65
Albumin (mg/dL)	3.33±0.21	3.30±0.21	3.30±0.19

Values represent mean ± S.D. Values statistically different (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) between groups (p<0.05) by Tukey test.

## 8. References

Official Analytical Chemists AOAC. Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists, 16th ed., Supplement 1998. Washington: AOAC, 1995. 1018p.

Abe, L. T. et al. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), 394-400.

Baik, B. K., Ullrich, S. E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 233–242.

Behuliak, M., Pálffy, R., Gardlík, R., Hodosy, J., Halcák, L., Celec, P. (2009). Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. *Disease Markers*, 26(2), 49–53.

Beling, D., Pujol, A. P., Andrade, V. O. de. (2007). Antioxidantes para a prevenção do envelhecimento cutâneo: uma revisão. *Nutrição em Pauta*, 15(85), 40-46.

Benelam, B. (2009). Satiation, satiety and their effects on eating behaviour. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 34 (2), 126–173.

Bezerra, A. S. (2009). *Caracterização de compostos antioxidantes em grãos de diferentes cultivares de cevada (Hordeum vulgare L.)*. Dissertação (Mestrado em

Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, (p.108).

Caierão, E., Sperotto, A. L. (2006). Barley cultivar MN 698, high malting quality for the state of Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, 36(1), 279-281.

Cherem, A. da R., Bramosrki, A. (2008). Excreção de gordura fecal de ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar), submetidos a dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas suplementadas com quitosana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(4), 701-706.

Giriwono, P. E., Hashimoto, T., Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Hokazono, H., & Komai, M. (2010). Extract of fermented barley attenuates chronic alcohol induced liver damage by increasing antioxidative activities. *Food Research International*, 43(1), 118-124.

Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D., & Durand, D. (2007). The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed n-3 PUFA rich diets. *Animal Feed Science and Technology*, 139(3-4), 257-272.

Helm, C. V., & Francisco, A. de. (2004). Chemical characterization of Brazilian hulless barley varieties, flour fractionation, and protein concentration. *Scientia Agricola*, 61(6), 593-597.

Holtekjolen, A. K., Baevre, A. B., Rodbotten, M., Berg, H., & Knutsen, S. H. (2008). Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. *Food Chemistry*, 110(2), 414–421.

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). São Paulo: o Instituto.

Kamath, V. G., Chandrashekhar, A., & Rajini, P. S. (2004). Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. *Journal of cereal science*, 40(3), 283-288.

Lima, A. R., Barbosa, V. C., Santos Filho, P. R., Gouvêa, C. M. C. P. (2006). Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista brasileira de farmacognosia*, 16(4), 531-536.

Liu, J., Yeo, H. C., Doniger, S. J., & Ames, B. N. (1997). Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 161–166.

Liu, Q., & Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, 102(3), 732-737.

Lizcano, L. J., Bakkali, F., Ruiz-Larrea, M. B., & Ruiz-Sanz, J. I. (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119(4), 1566–1570.

Marczuk-Krynicka, D., Hryniwiecki, T., Paluszak, J., Krauss, H., & Nowak, D. (2009). High Fat Content in Diets and Oxidative Stress in Livers of Non-Diabetic and Diabetic Rats. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(2), 249-253.

Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., & Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography*, 827(1), 76-82.

Melo, S. S., Nunes, N. S. I., Baumgarten, C. B., Tressoldi, C., Faccin, G., Zanuzo, K., Michels, M. K., Cunha, N. da, Specht, S., & Silva, M. W. da. (2007). Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. *Alimentos e Nutrição*, 18(4), 439-447.

Ming, M., Guanhua, L., Zhanhai, Y., Guang, C., & Xuan, Z. (2009). Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. *Food Chemistry*, 113(4), 872-877.

Moura, G. B. de. (2009). *Vinho tinto, suco de uva e etanol em ratos adultos submetidos à dieta hiperlipidêmica*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, (p.56).

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.

Oliveros, L. B., Videla, A. M., & Giménez, M. S. (2004). Effect of dietary fat saturation on lipid metabolism, arachidonic acid turnover and peritoneal macrophage oxidative stress in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), 311-320.

Ovaskainen, M., Törrönen, R., Koponen, J. M., Sinkko, H., Sinkko, H., Hellström, J., Reinivuo, H., & Mattila, P. (2008). Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *The Journal of Nutrition*, 138, 562-566.

Papandreou, M. A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z. I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margarity, M., & Lamari, F. N. (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research*, 198(2), 352–358.

Philippi, S. T. (2006). *Nutrição e técnica dietética*. Barueri: Manole. (p.402).

Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr., G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76<sup>a</sup> rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951.

Rodrigues, H. G., Diniz, Y. S., Faine, L. A., Almeida, J. A., Fernandes, A. A. H., & Novelli, E. L. B. (2003). Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. *Revista de Nutrição*, 16(3), 315-320.

Salvador, M., Poletto, N. P., Andreazza, A. C., & Soares, D. G. (2004) Estresse oxidativo e as doenças. In *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. (pp. 69-111). Canoas: ULBRA.

Singleton V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A., & Serkedjieva, J. (2005). In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, 76(25), 2981–2993.

Vijayakumar, R. S., Surya, D., & Nalini, N. (2004). Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Report*, 9(2), 105-110.

Vinson, J. A., Jang, J., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Cai, S. (1995). Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2798–2799.

Vinson, J. A., Teufel, K., & Wu, N. (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*, 156(1), 67-72.

Yalçın, E., Çelik, S., Akar, T., Sayım, I., & Köksel, H. (2007). Effects of genotype and environment on  $\beta$ -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. *Food Chemistry*, 101(1), 171-176.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste experimento foi utilizado extrato de cevada como antioxidante dietético, o qual apresentou alto teor de polifenóis totais, quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu. O extrato de cevada apresentou seu potencial antioxidante por reduzir a quantidade de MDA no fígado dos ratos alimentados com dieta rica em gordura. Determinar o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de extratos de diferentes cereais e em diferentes frações destes cereais é uma perspectiva futura.

Apesar de muitos estudos atribuírem os efeitos deletérios de lipídeos (tais como o aumento plasmático de LDL, de triglicerídeos e de colesterol) a uma alta ingestão de gorduras (MING et al., 2009), neste trabalho a dieta hiperlipídica não provocou alterações nos parâmetros sanguíneos. Isto pode estar relacionado com o aumento da saciedade da gordura, que é associada ao baixo consumo alimentar.

No entanto, sugere-se desenvolver mais pesquisas com quantidades maiores de gordura suína em ratos ou utilizar outro modelo experimental, como o coelho. Além disso, utilizar diferentes fontes de energia na dieta e correlacionar com a saciedade, consumo alimentar, ganho de peso dos animais e parâmetros sanguíneos.

O alto teor de gordura na dieta induziu o estresse oxidativo no fígado dos ratos e o consumo de extrato hidroetanólico evaporado de cevada causou um efeito protetor. Também, sugere-se avaliar os efeitos antioxidantes dos polifenóis da cevada e do extrato de cevada em amostras humanas e em modelos experimentais voltados para outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, síndrome metabólica e doenças degenerativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.
- ALBERT, A. D.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of cholesterol in rod outer segment membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 44, n. 2-3, p. 99-124, 2005.
- ALI, S. S. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.
- ALVAREZ-JUBETE, L. et al. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 770–778, 2010.
- AMES, N. P.; RHYMER, C. R. Evidence for health claims on food: how much is enough?: Part II Issues surrounding health claims for barley. American Society for Nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1237-1243, 2008.
- ANDRADE Jr., D. R. de et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ANGELIS, R. C. de. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 4, p. 269-271, 2001.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal vascular brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- BAIK, B. K.; ULLRICH, S. E. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 2, p. 233–242, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEHALL, K. M.; SCHOLFIELD, D. J.; HALLFRISCH, J. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1185–1193, 2004.

BELING, D.; PUJOL, A. P.; ANDRADE, V. O. de. Antioxidantes para a prevenção do envelhecimento cutâneo: uma revisão. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n. 85, p. 40-46, 2007.

BENELAM, B. Satiation, satiety and their effects on eating behaviour. **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 126–173, 2009.

BEZERRA, A. S. **Caracterização de compostos antioxidantes em grãos de diferentes cultivares de cevada (*Hordeum vulgare L.*)**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por clae e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 275-280, 1997.

BRANDÃO, P. A. et al. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**, v. 26, n. 1, p. 5–14, 2005.

CAIERÃO, E.; SPEROTTO, A. L. Barley cultivar MN 698, high malting quality for the state of Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 279-281, 2006.

CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P. N.; TROVÃO, F. C. de S. Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde **Einstein: Educação Continuada em Saúde.**, v. 7, n. 2, p. 106-109, 2009.

COGGER, V. C. et al. The effects of oxidative stress on the liver sieve. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 3, p. 370-376, 2004.

DANILA, A. M. et al. Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *fagopyrum esculentum moench* by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1139-1143, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos antioxidants properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DRAGSTED, L. O. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. **European Journal of Nutrition**, v. 47, supl. 2, p. 3-18, 2008.

FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 2, p. 258-276, 2008.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, ano IV, n. 2, p. 32-39, 2007.

FREITAS, G. L. **Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e no bagaço de brassagem.** 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FUJITA, A. H.; FIGUEROA, M. O. R. Composição centesimal e teor de β-glucanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.116-120, 2003.

GALLEGOS-INFANTE, J. A. et al. Effect of processing on the antioxidant properties of extracts from mexican barley (*Hordeum vulgare*) cultivar. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 903-906, 2010.

HELM, C. V.; FRANCISCO, A. de. Chemical characterization of brazilian hulless barley varieties, flour fractionation, and protein concentration. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 6, p. 593-597, 2004.

HOLTEKJOLEN, A. K. et al. Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 414–421, 2008.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 2010.

INGLETT, G. E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) with or without microwave irradiation. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1216-1219, 2010.

JALDIN, R. G. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 5, n. 4, p. 247-256, 2006.

JONKER, D. et al. 28-Day oral toxicity study in rats with high purity barley beta-glucan (Glucagel™). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 422-428, 2010.

KAMATH, V. G.; CHANDRASHEKAR, A.; RAJINI, P. S. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor L. Moench*) flour extracts. **Journal of cereal science**, v. 40, n. 3, p. 283-288, 2004.

KASDALLAH-GRISSA, A. et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Sciences**, v. 80, n. 11, p. 1033-1039, 2007.

KONG, S.; LEE, J. Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 278-281, 2010.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LIMA, A. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 732-737, 2007.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare L.*) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5018–5024, 2007.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Optimization of the extraction of antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8048-8057, 2006.

MATEOS, R. et al. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography**, v. 827, n. 1, p. 76-82, 2005.

MING, M. et al. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 872-877, 2009.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

OLIVEIRA, T. T. et al. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002.

PETERSON, D. M. Oat antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 2, p. 115-129, 2001.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e técnica dietética**. 2. ed. Barueri: Manole, 2006. 402 p.

QINGMING, Y. et al. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare L.*) toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 84-89, 2010.

RATHBONE, D. A.; BRUCE, N. C. Microbial transformation of alkaloids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 274-281, 2002.

REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Interação de compostos organossulfurados derivados do alho com o citocromo-c: um estudo eletroquímico. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 5-9, 2002.

RICE-EVANS C. A.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIQUE, A. B. R. et al. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 244-254, 2002.

RODRIGUES, A. J.; ÉVORA, P. R. B.; SCHAFF, H. V. Protective effect of N-acetylcysteine against oxygen radical-mediated coronary artery injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1215-1224, 2004.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

SALMON, A. B.; RICHARDSON, A.; PÉREZ, V. I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 642-655, 2010.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: ULBRA, 2004, 201 p.

SHEN, Y. et al. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 1, p. 106-111, 2009.

SILVA, L. da et al. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 361-367, 2007.

SILVA, R. R. da S. et al. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 51, n. 3, p. 258-264, 2001.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SUN, B.; SPRANGER, M. I. Revisão: extração e análise quantitativa de proantocianidinas e estilbenos da uva e do vinho. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v., 20, n. 2, p.59-89, 2005.

VASSALLE, C. et al. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 14-15, p. 1162–1167, 2008.

VINSON, J. A. et al. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2798–2799, 1995.

XIE, W. et al. Preventive effects of fenofibrate on insulin resistance, hyperglycaemia, visceral fat accumulation in NIH mice induced by small-dose streptozotocin and lard. **Pharmacological Research**, v. 5, n. 5, p. 392-399, 2007.

ZHOU, K.; SU, L.; YU, L. Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6108–6114, 2004.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2008–2016, 2000.

WEI, Q. et al. Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. **Food Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 90-95, 2006.

WHITNEY, E.; ROLFES, S. R. **Nutrição: entendendo os nutrientes**. 10. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 342 p.

YALÇIN, E. et al. Effects of genotype and environment on  $\beta$ -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 171-176, 2007.

YU, L. et al. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 457–461, 2002.

## **ANEXO 1 – Manual de publicação da revista Food Chemistry**

### **Guide for Authors**

#### **Submission of Papers**

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/foodchem> . **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor: Professor Gordon Birch School of Food Biosciences University of Reading Whiteknights, PO Box 226 Reading RG6 6AP, UK

**Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute).**

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in

the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

### Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

### Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. *Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. *Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. *Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. *Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. *Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. *Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

#### 7. *Book reviews*

### Manuscript Preparation

**General:** Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

**Abstracts:** Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

**Text:** Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The

corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

**Units:** The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' ( $10^9$  in America,  $10^{12}$  in Europe) is ambiguous and should not be used.

**Symbols:** Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

**References:** All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript

should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisins: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisins in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

*Citing and listing of web references.* As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*: doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

## Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

## Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

## General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
  - Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
  - Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
  - Number the illustrations according to their sequence in the text.  
Use a logical naming convention for your artwork files.
  - Provide all illustrations as separate files.
  - Provide captions to illustrations separately.
  - Produce images near to the desired size of the printed version.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:  
[\*\*You are urged to visit this site.\*\*](http://www.elsevier.com/artworkinstructions)

## Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

## Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

## Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

## Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.