

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

## **Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal**

**Aluno:** Lucas Brambilla Hilbig Feistauer

**Orientador:** Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

## **Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal**

**Aluno:** Lucas Brambilla Hilbig Feistauer

**Orientador:** Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como um pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Banca examinadora:**

**Prof. Dra. Christianne Salbego (UFRGS)**

**Prof. Dra. Cristiane Matté (UFRGS)**

**Prof. Dr. Vitor Manfroi (UFRGS)**

Porto Alegre, 2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Feistauer, Lucas Brambilla Hilbig  
Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal /  
Lucas Brambilla Hilbig Feistauer. -- 2016.  
83 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Cerveja artesanal. 2. Antioxidantes. I.  
Moreira, José Cláudio Fonseca, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS:**

Gostaria de agradecer a toda minha família, pelo suporte e compreensão e que me possibilitou muitas conquistas. Alguns com certo destaque como meu avô Alfonso que me ensinou muito sobre a vida. Agradeço a minha mãe pelo que sou e escreveria uma dissertação somente sobre o que ela já fez por mim. Ao meu padastro companheiro e sempre presente e de bom grado para me auxiliar em qualquer questão que fosse. A minha irmã pelo carinho e companheirismo. A minha esposa que eu amo tanto e que me ajudou desde o início do trabalho.

Ao Zé, orientador incrível, compreensivo e paciente, obrigado por ter me aguentado por tanto tempo e me ensinado tanto que me fogem palavras para agradecer o que tu fizeste por mim.

A todos os colegas do laboratório, pela ajuda, pelo convívio e que sem vocês eu nunca teria conseguido realizar esse trabalho, obrigado pelo espírito de equipe de todos.

Aos amigos cervejeiros e companheiros de uma boa cervejada, que me auxiliaram muito nesse caminho embaçado entre uma cerveja e outra. Filipão, Glauco, Juciano, Uruguaiana, Maurílio, Bobs.

Ao núcleo de apoio a estatística da UFRGS, principalmente ao Daniel Sganzerla que ajudou muito na parte estatística.

Aos professores e todos os funcionários do PPG-Bioquímica da UFRGS, que direta ou indiretamente, ajudaram a desenvolver esse trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPQ, CAPES e FAPERGS por financiarem a pesquisa e auxiliarem o pesquisador a conseguir viver da pesquisa.

## Resumo

Na cultura ocidental o hábito de consumir cerveja é bem disseminado, sendo essa, umas das bebidas mais consumidas no mundo, ocupando o primeiro lugar entre as alcoólicas. A cerveja é uma bebida complexa por incluir em seu preparo inflorescências de lúpulo, cevada e fermento, ingredientes que conferem atividades antioxidantes para essa bebida, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos. Os polifenóis são uma família de compostos, produzidos pelas plantas, muitos deles com capacidade antioxidante. Sabe-se que a ingestão de certos alimentos ricos nesses compostos tem se mostrado relevantes para a saúde humana. O consumo moderado de cerveja tem se mostrado benéfico como adjuvante no tratamento de doenças coronarianas, diabetes, osteoporose e alguns tipos de câncer. Existe muita variação entre as cervejas a respeito da quantidade de lúpulo utilizado em suas formulações, onde a maioria das cervejas comerciais possui pouca quantidade desse ingrediente em relação às cervejas artesanais. Além disso, cervejas artesanais possuem maior diversidade e quantidade de compostos fenólicos, entre eles o xantohumol e isoxantohumol. O objetivo do trabalho foi investigar o potencial antioxidante de cervejas, comparando algumas marcas artesanais com algumas marcas comerciais, e também investigar se o consumo dessas bebidas confere algum tipo de hepatoproteção em um modelo de indução de dano hepático induzido por tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em ratos Wistar. Trataram-se os animais durante 30 dias, na garrafa de beber, durante o período noturno de 12h, com: água, etanol 6,7%, cerveja comercial, cerveja artesanal ou silimarina, ministrada por gavagem (2 mL/kg do medicamento Legalon). Após o período de tratamento, o  $\text{CCl}_4$  foi injetado (i.p. 2,5 mL/kg) e 12h após as injeções os animais foram sacrificados. Analisou-se o peso das gorduras abdominais e peso do fígado, parâmetros redox do fígado e o perfil redox do soro. A cerveja artesanal demonstrou maior capacidade antioxidante, um aumento dos níveis de HDL, nenhum tipo de dano oxidativo, nem dano hepático. Entretanto não foi observado efeito de hepatoproteção em nenhum dos tratamentos testados.

**Palavras-chave:** Cerveja artesanal, estresse oxidativo, xantohumol.

## **ABSTRACT:**

In occidental culture, beer consumption is a widespread habit. This is one of the most consumed beverages in the world, and the number one of alcoholic beverages. Beer is a complex beverage because includes in its brewing hops, barley malt and yeast, ingredients that endows antioxidant activity to this beverage, probably due to the presence of phenolic compounds. Polyphenols are a family of compounds produced by plants, many of them with antioxidant capacity. It is known that a high consumption of polyphenols is good for health. The moderate consumption of beer is beneficial as adjuvant in treatment of many diseases as coronary diseases, diabetes, osteoporosis, and some cancers. There are a lot of variations in beers formula, mainly in quantity of hops used. As craft beers have more quantities of this ingredient, they reveal more variety and quantity of phenolic compounds, among them xanthohumol and isoxanthohumol. The objective of this research was investigate the antioxidant potential of beers, comparing some commercial brands with some craft beers brands, and also investigates if a pré-treatment with beers could be hepatoprotective in a carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) model in rats. They were treated for 30 days in drinking bottle, during night shift (12h), with: commercial beer, craft beer, ethanol 6,7 %, water or Silymarin, administered by gavage (2 mL/kg of Legalon medicine). After the treatment, CCl<sub>4</sub> was injected (i.p 2,5 mL/kg) and 12h after injection animals were sacrificed. It was analyzed abdominal fat weight, liver weight, liver redox parameters and serum redox profile. Craft beer presented higher antioxidant potential, raised HDL levels, no oxidative damage nor hepatic injury. However no hepatoprotection was observed with any of tested treatments.

**Key words:** Craft beer, oxidative stress, xanthohumol.

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

ALT: Alanina-aminotransferase

AST: Aspartato-aminotransferase

ATP: Adenosina-trifosfato

AUC: Área sob a curva

AVC: Acidente vascular encefálico

CAT: Catalase

CCl<sub>4</sub>: Tetracloreto de Carbono

COX-1: Ciclo-oxigenase-1

ERN: Espécies reativas de nitrogênio

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GPx: Glutaciona-peroxidase

GST: Glutaciona-S-Transferase

HDL: Lipoproteína de alta densidade

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

NO: Óxido nítrico

SOD: Superóxido-dismutase

TAR: Reatividade antioxidante total

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP: Potencial antioxidante total

I<sub>0</sub>/I: Razão entre intensidade luminosa sem amostras/intensidade luminosa após adição da amostra

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cerveja no contexto histórico-cultural .....	1
1.2 Comércio e indústria cervejeira.....	2
1.3 Consumo saudável .....	4
1.4 Bioquímica da cerveja.....	7
1.5 Espécies reativas e estresse oxidativo.....	11
1.6 Defesas antioxidantes não enzimáticas .....	13
1.7 Modelo de indução de dano com tetracloreto de carbono .....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1 Could craft beer really be efficient as hepatoprotector? .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	25
7. PERSPECTIVAS .....	26
8. REFERÊNCIAS .....	26
ANEXO I: Carta de aceite CEUA .....	36
ANEXO II: Guide for authors.....	36



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Cerveja no contexto histórico-cultural**

Existem registros de bebidas fermentadas produzidas pelas civilizações Suméria e Assíria de 10.000 a.C. Nessa época, a mistura era nutritiva e considerada sagrada, oferecida aos deuses [Cruz et al., 2008]. A cerveja foi muito importante para os povos antigos, pois a primeira língua escrita tinha um símbolo para cevada muito utilizado [Cohen et al., 2004]. Também existem evidências na Mesopotâmia, de 6000 a.C, da utilização de cerveja exercendo funções medicinais como aplicando-a sobre ferimentos, como antisséptico bucal, utilizada para enema e lavagem vaginal, além da introdução na dieta alimentar [Darby, 1977]. Traços de um moderno antibiótico, a tetraciclina, foram encontrados em ossos de múmias egípcias com mais de 2000 anos de idade. Esse achado foi correlacionado com o consumo de cerveja, sugerindo um uso medicinal para bebida [Nelson et al., 2010]. A cerveja também era usada como uma bebida hidratante e, por não conter contaminantes, era dada para crianças beberem na idade média [Unger, 2004].

Os conceitos básicos de higiene e contaminação por microorganismos foi desenvolvido quando Pasteur olhou no microscópio uma cerveja estragada e associou a micro-organismos, que posteriormente foram associados a doenças. Ao longo dos anos, muitos nomes foram dados a bebida fermentada, mas somente no início do século XVI se definiu a palavra cerveja como: bebida fermentada por ação de leveduras; elaborada por cocção de cevada germinada (malte) e outros cereais; e aromatizada com lúpulo [Nogueira, 2006]. Sendo criada pelo império romano como denominação para a bebida fermentada de cevada (servisia) [Ferreira, 1986]. No século XVIII, foi criada na Bavária a Lei

da Pureza da Cerveja (*Reinheitsgebot*), que vigora até hoje em países como Alemanha e Grécia, restringindo a esta denominação somente a bebida fermentada obtida a partir de cevada malteada, água e lúpulo (cerveja conhecida como puro malte) [Garcia, 2012].

Na história do Brasil, a bebida demorou a tornar-se popular devido ao fato de Portugal incentivar o consumo de vinhos portugueses. A cerveja no Brasil era produzida de forma caseira e consumida somente pelas famílias de imigrantes. Somente após a vinda da corte Portuguesa para o Brasil (1808), a abertura dos portos possibilitou a entrada de cervejas importadas, principalmente inglesas, e com a popularização da bebida, iniciou-se um movimento de produção de cerveja brasileira [Coutinho, Quintella & Panzani, 2008].

A cerveja faz parte da construção da nossa sociedade e da nossa história. Hoje em dia, é uma das bebidas mais consumidas no mundo e dentre as alcoólicas é a mais consumida.

## **1.2 Comércio e indústria cervejeira**

Em 2013, o consumo global de cerveja foi de 188.81 bilhões de litros e a produção global foi de 192.94 bilhões de litros [Kirin Beer University]. O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo (13 bilhões de litros/ano), o terceiro maior consumidor (14 bilhões de litros/ano) e se encontra na 24ª posição do ranking de consumo per capita mundial, com 68 litros por ano [Kirin Beer University; Sindicerv, 2015]. Essa bebida é produzida a partir da fermentação do mosto (um líquido doce originado pela cocção da cevada, podendo ser outro cereal) por leveduras e adicionado o lúpulo, sendo um dos

alimentos da dieta humana que possui lúpulo como matéria prima. Cabe ressaltar, ainda, que atualmente já existem outros alimentos como: biscoitos, iogurtes etc. Porém, a cerveja é o alimento mais consumido dentre esses que contém lúpulo.

A cevada (*Hordeum sp.*) é uma gramínea cultivada em regiões de clima temperado [Hornsey, 1999], cultivada em vários estados brasileiros durante o inverno. O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta dioica da família das *Cannabaceae* e é cultivado em regiões de baixas temperaturas [Hornsey, 1999]. As condições para o plantio de lúpulo no Brasil não são as mais favoráveis, sendo essa matéria prima, praticamente toda importada [Hughes & Baxter, 2001]. O aroma e amargor característicos da cerveja são oriundos de diversos compostos presentes nas inflorescências femininas do lúpulo. Porém, cabe sinalizar que não é somente dessa parte, pois mais recentemente usam-se outras partes da planta.

O estilo de cerveja mais produzido e consumido no Brasil, e no mundo, é do tipo Pilsen (Standard American Lager), que possui grande percentual de adjuntos, pouco lúpulo, de cor clara, teor de extrato médio, baixa fermentação e baixo teor alcoólico [BJCP, 2008].

Diante desse fato, no Brasil, consumidores mais exigentes resgatam a história e a cultura de se fazer e beber boas cervejas [Rio, 2013], com a ideia de fabricar cerveja para consumo próprio, sem fins comerciais, de estilos europeus e norte-americanos, que apresentam propriedades organolépticas superiores às marcas encontradas no mercado brasileiro fornecido pelas grandes fábricas. Aumentando assim, o número de microcervejarias com produção própria e exclusiva [Rio, 2013].

O termo cerveja artesanal (craft beer) foi criado nos EUA na necessidade de distinguir as cervejas comerciais de larga escala, as tipo Pilsen. As cervejas artesanais, apesar de não representarem um estilo específico, seguem normas rígidas de qualidade. Entende-se por artesanal ou especial uma cerveja produzida com ingredientes diferenciados, com matérias primas de melhor qualidade, com nenhum ou poucos aditivos químicos e adjuntos. No Brasil, a matéria prima da cervejaria artesanal acaba sendo praticamente toda importada, já que as grandes cervejarias absorvem a cevada nacional. Em relação ao lúpulo, as cervejas artesanais possuem em suas receitas uma maior quantidade de lúpulo do que as cervejas comerciais [Wunderlich, Zürcher, Back, 2005]. A associação de cervejeiros dos EUA define a cervejaria artesanal como: pequena; independente e tradicional [Brewers Association, 2011]. Ao contrário da produção de cerveja em larga escala, que busca obter produtos padronizados e mercados cada vez mais homogêneos, as cervejas especiais representam uma forma genuína de inovação na produção desta bebida milenar.

### **1.3 Consumo saudável**

A relação entre uma dieta equilibrada, com grandes quantidades de alimentos ricos em polifenóis, está diretamente associada à redução de risco de doenças como acidente vascular encefálico (AVC); aterosclerose; diabetes; artrite; câncer [Patil et al., 2009, Joshipura et al., 1999]. Além de prevenir doenças, uma dieta rica em polifenóis pode levar a melhores resultados em testes cognitivos e diminuir o risco de depressão [Akbaraly et al., 2009]. Alguns polifenóis possuem potencial anti-inflamatório, com aplicações no tratamento de doenças como a hipertensão; alergia; hipercolesterolemia; cardiopatias e

problemas pulmonares [Ames et al., 1993; Witzum, 1994; Roy & Kulkarni, 1996; Stahl & Sies, 1997; Bravo 1998; Devi et al., 2014; Georgiev, Ananga & Tsoлова, 2014].

O consumo moderado de bebidas alcoólicas diminui a mortalidade, pois o etanol é conhecido por reduzir doenças coronarianas, aumentando os níveis de HDL [Hendriks et al, 1998; Sierksma et al., 2002]; aumentando a atividade da paraoxonase [Van der Gaag et al., 1999] e o efluxo de colesterol [Van der Gaag et al., 2001]; estimulando fibrinólise [Hendriks et al., 1994] e diminuindo a coagulação [Dimmitt et al., 1998]; consequentemente diminuindo os processos inflamatórios [Imhof et al., 2001; Koenig et al., 1999]. Ainda, bebidas alcoólicas produzidas por fermentação, não por destilação, contêm estimulantes da secreção de ácido gástrico [Teyessen et al., 1997], além de estimulantes de gastrina [Yokoo et al., 1999; Kimura et al., 2000]. Apesar do alcoolismo aumentar as concentrações de homocisteína no soro, estudos demonstram que consumidores de cerveja apresentam níveis mais baixos, quando comparados com consumidores de vinho ou destilados [Cravo, 1996; van der Gaag et al., 2000]. Há ainda relatos que a ingestão de xantohumol, através do consumo de cerveja, reduz a inflamação, o estresse oxidativo e a angiogênese; melhorando o processo de cicatrização [Negrão et al., 2012]. A cerveja também pode melhorar a função endotelial mais do que outras bebidas e reduzir a onda de reflexões da pressão mais do que a cerveja sem álcool [Karatzi, 2013]. Alguns resultados mostram que o consumo, de cerveja, com e sem álcool, diminui o dano mitocondrial induzido por adriamicina [Valls-Belles et al., 2010]. Já na parte comportamental, estudos evidenciam que o consumo de cerveja é ansiolítico, porém atáxico [Gallate et al., 2003].

Alguns autores estudaram as chalconas e as flavonas das cervejas, observando uma inibição da produção de óxido nítrico (NO), influenciando uma variedade de proteínas pró-inflamatórias, inibindo a expressão de ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) [Zhao et al., 2003; Motyl, 2013]. Além disso, certos compostos presentes no lúpulo foram descritos como citotóxicos contra algumas linhagens de cânceres [Gerhauser 2005; Ho et al., 2008; Dorn et al., 2010; Motyl, 2013] e capazes de efeitos sedativos e hipnóticos [Cooper, 1994]. Chen e colaboradores [2014] complementam a ação dos compostos presentes na cerveja como possuidores de vários efeitos bactericidas, anti-inflamatórios, antioxidativos, antiangiogênicos, antimelanogênicos, antiosteoporótico e anticarcinogênicos. Além disso, os efeitos na pele para tratamentos de diversas doenças também é descrito tanto no uso tópico, como na ingestão de cerveja, corroborando com o uso dos povos antigos, que o faziam como medicamento.

Já o consumo indiscriminado de bebidas alcoólicas é perigoso, prejudicial para saúde e nos deixa insociáveis, tendo efeitos como degeneração do sistema nervoso, hepatite, cirrose, aumentando a incidência de cânceres, cardiomiopatia e miopatia [Cooper, 1994]. Entretanto, baixas doses de álcool estimulam o apetite e melhoram a função intestinal na velhice [Dufour, 1992]. Além disso, o consumo excessivo de álcool é descrito por acarretar problemas na pele e no epitélio do trato digestório, aumentando a chance de desenvolvimento de cânceres [Reidy; McHugh; Stassen, 2011; Chen et al, 2014]. Ainda, a cerveja possui grandes quantidades de proteínas, além de conter peptídeos derivados das prolaminas, conhecidas por desencadear alergias em celíacos [Colgrave et al, 2013].

Embora o impacto do consumo de cerveja e a quantidade considerada moderada sejam muito discutidos na literatura, ainda não foi investigado um possível efeito hepatoprotetor. Porém, o impacto do consumo da cerveja artesanal brasileira é pouco descrito; principalmente o quanto dessa bebida pode ser consumido sem que haja um dano hepático.

#### **1.4 Bioquímica da cerveja**

A água é o principal constituinte da cerveja. A elevada quantidade de água associada à concentração de sais minerais similares a do suor tornam essa bebida hidratante e refrescante [Hughes & Baxter, 2001; Jiménez et al, 2009]. A dureza da água está associada à concentração total de íons cálcio e magnésio. O cálcio protege as enzimas alfa-amilases do calor da mostura, isso contribui para uma maior hidrólise do amido durante a mosturação. Além disso, sua presença estimula a ação enzimática de proteases e amilases, aumentando o teor de açúcares fermentáveis e compostos nitrogenados no mosto. O magnésio, proveniente principalmente do malte, atua como cofator enzimático durante a etapa de fermentação [Bernstein & Willox, 1977].

O pH influencia na mostura, na extração do lúpulo e na fermentação. A faixa ideal de pH para a produção cervejeira é entre 6,5 e 7, variando de acordo com o tipo de cerveja a ser produzido [Brigido, 2006]. Se o pH for alcalino, poderá dissolver materiais não desejados na mosturação que estão contidos na casca do malte, diminuindo os efeitos positivos do cálcio e do magnésio [Bernstein & Willox, 1977].

Hornsey [1999] destaca dentre os principais constituintes da cevada os polissacarídeos amiláceos, polissacarídeos não-amiláceos, as proteínas, lipídeos e outros constituintes como os monofenóis, polifenóis e alguns íons. O

malte de cevada torrado pode ser um ingrediente das cervejas artesanais que não é utilizado nas receitas das cervejas comerciais, no qual foi isolado um composto com atividade antioxidante considerada benéfica em biosistemas [Papetti et al., 2006].

A cevada é utilizada na produção cervejeira por suas características intrínsecas de teor de amido, riqueza proteica, uniformidade dos grãos e quantidade de cascas [Aquarone et al., 2001]. Após passar por um processo de germinação em condições controladas (malteação) a cevada recebe o nome de malte [Cruz et al., 2008]. O objetivo deste processo é: desenvolver enzimas (alfa-amilase e beta-amilase, amiloglicosidase, beta-glucanase, protease, beta-glucanasolubilase e pentosanase) que converterão o amido em açúcares solúveis; modificar o amido tornando-o mais solúvel e solubilizar proteínas [Nogueira, 2006]. A variedade da cevada, a temperatura, a aeração, o grau de torrefação, a umidade e a secagem influenciam no processo de malteação [Cruz et al., 2008]. Outros cereais podem ser adicionados como adjuntos cervejeiros, substituindo o malte de cevada por outras fontes de carboidrato [Morado, 2009].

González-Gross e colaboradores [2001] descreveram os principais constituintes do lúpulo, que são resinas, óleos essenciais e polifenóis. As inflorescências secas de lúpulo contém 4-14 % de polifenóis, principalmente ácidos fenólicos, chalconas preniladas, catequinas, proantocianidinas e flavonoides. Os flavonoides são responsáveis por uma série de propriedades bioativas, propriedades sedativas, estrogênicas e anticancerígenas. Os óleos essenciais, assim como as resinas, são provenientes da glândula lupulina, que contribuem para o aroma da cerveja. Eles apresentam sesquiterpenos,



monoterpenos, álcoois, ésteres, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos [Hornsey, 1999]. As resinas são divididas em moles (alfa-ácidos: humulona, cohumulona, adhumulona; e beta-ácidos: lupulona, colupulona e adlupulona) e duras (alfa e beta-ácidos oxidados). Além disso, o lúpulo possui uma resina contendo monoacilfloroglicídios, que são convertidos a ácidos amargos durante o processo cervejeiro [Gerhauser, 2005].

O lúpulo é o responsável por grande parte das propriedades antioxidantes conhecidas para a cerveja em virtude da presença de compostos como o xantohumol e isoxantohumol [Stevens et al., 1999; Ceh et al., 2007]. Esses compostos possuem atividade antioxidante comparável ao resveratrol do vinho [Vinson et al., 2003; Pinto et al., 2012]. Devido a presença de iso-alfa-ácidos o lúpulo possui ainda propriedades antibióticas e bacteriostáticas [Botelho, 2009].

O conteúdo total de antioxidantes depende do tipo de cerveja, das matérias-primas e do tipo de fabricação utilizado. Cerca de 70-80 % dos polifenóis da cerveja provém do malte e 20-30 % do lúpulo [Humberstone & Briggs 2000]. Os polifenóis do malte passam por alterações químicas durante a malteação e no processo cervejeiro, sendo menos caracterizados do que os fenólicos do lúpulo. Sem falar dos metabólitos das leveduras muito pouco conhecidos. O ácido ferúlico é o principal ácido fenólico encontrado na cerveja [Siqueira, Bolini, Macedo, 2008]. Ele provém das paredes celulares do malte de cevada, também conferindo propriedades antioxidantes para a cerveja, porém não se sabe o quanto é perdido ao longo do processo cervejeiro [Humberstone & Briggs 2000].

Estudos indicam que as concentrações de antioxidantes em cervejas especiais europeias estão diretamente relacionadas com as quantidades de lúpulo utilizadas para cada receita. Considerando a cerveja a única fonte alimentar significativa de lúpulo, os benefícios à saúde em relação a este ingrediente tornam-se, quase que exclusivos, desta bebida. Outros estudos indagam o possível efeito aditivo/sinérgico dos compostos presentes na matriz complexa dessa bebida [Monteiro et al., 2006].

A parte fermentativa da cerveja é realizada comumente por dois tipos de leveduras, as de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*, do tipo Ale), que fermentam mais rápido e em temperaturas mais altas entre 18 – 22 °C; e as de baixa fermentação (*Saccharomyces uvarum*, anteriormente denominada *carlsbergensis*, do tipo Lager) que fermentam mais devagar a temperaturas mais baixas entre 07 -15 °C [Stewart & Russel, 1996].

A diferença bioquímica entre tipos de leveduras (Lager e Ale) é a capacidade de fermentar o dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). O transporte, a hidrólise e a fermentação da maltose (que corresponde a cerca de 50 a 60% dos açúcares fermentáveis no mosto) e da maltotriose são fundamentais na fabricação cervejeira [Nogueira, 2006]. Ao entrarem no interior da célula, os açúcares são convertidos pela via glicolítica a piruvato (Fig. I).

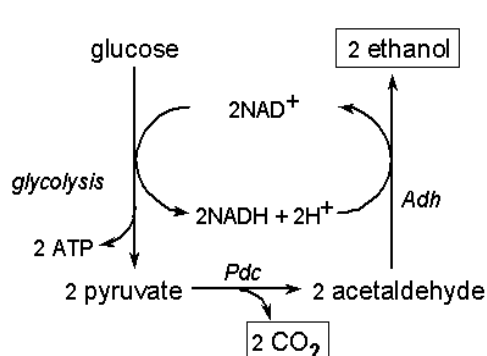


Fig. I: Via metabólica da fermentação alcoólica. [Flikweert 1999].

Esta conversão irá gerar duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP). A etapa de fermentação passa por uma etapa aeróbea seguida por uma etapa anaeróbea. Somente na segunda etapa ocorre a formação de etanol. Quando a

levedura está em condições anaeróbicas (estado fermentativo), o  $\text{NAD}^+$  é regenerado, sendo utilizado o hidrogênio, tornando o meio mais ácido. O ácido pirúvico é convertido a dióxido de carbono e acetaldeído e este, posteriormente, a etanol. [Stewart & Russel, 1996]. Fatores como a cepa da levedura utilizada, a temperatura de fermentação, o tipo e a quantidade de adjunto adicionado, o pH do mosto e os compostos voláteis formados na fermentação contribuem para a variedade de compostos da bebida. Entre os compostos voláteis destacamos ácidos orgânicos, alcoois superiores, ésteres, carbonilas, compostos sulfúricos, aminas e fenois [Stewart & Russel, 1996; Hughes & Baxter, 2001].

A variedade de maltes utilizados; o processo de malteação; a(s) temperatura(s) e pH durante a mosturação; o método de aspersão dos grãos após a mostura; a variedade, a quantidade e o tempo de lúpulo adicionado durante a fervura; o método de resfriamento; a fermentação (tipo de fermento, temperatura, tempo); enfim, tudo isso influencia no tipo e na qualidade da cerveja [Gerhauser, 2005].

### **1.5 Espécies reativas e estresse oxidativo**

Um radical livre é uma espécie química com um ou mais elétrons desemparelhados, sendo considerado uma espécie reativa. O alto potencial reativo deve-se a grande tendência de perder ou adquirir um segundo elétron (Halliwell 2007, Bittencourt Pasquali et al., 2013). Em condições celulares normais aeróbicas, existe um equilíbrio tênue entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes [Negi et al., 2013]. O estresse oxidativo é considerado um desequilíbrio redox celular, causado pelo aumento da produção de ERO e/ou diminuição das defesas antioxidantes

[Schnorr et al., 2011]. Esse desequilíbrio é relacionado: à causa de doenças do envelhecimento [Valko et al., 2007]; à disfunção celular [Halliwell 2007,]; ao exercício físico [Pinho et al., 2006] e a diversas outras doenças [Ikawa et al., 2011, Uttara et al., 2009]. A superprodução de ERO resulta em um processo nocivo, embora o estresse oxidativo medie danos às estruturas celulares, como lipídios de membrana, proteínas e DNA [Keisari et al., 1983]. As ERO ainda podem atuar na inativação de enzimas, como as de reparo ao DNA, devido a sua alta reatividade oxidante [Keisari et al., 1983; Valko et al., 2007; Saugstad 2001]. Os efeitos benéficos de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) ocorrem em concentrações moderadas, envolvendo funções fisiológicas para respostas celulares diversas, na defesa contra infecções, na modulação de vias de sinalização celular e na indução de resposta mutagênica [Valko et al., 2007]. Além disso, em condições fisiológicas, as ERO são conhecidas por estimularem a ativação de segundos mensageiros, aumentarem a produção de interleucina-2 em células T, ativarem fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, controlarem a concentração de oxigênio agindo como sensores e contribuir para a transdução de sinal de vários receptores de membrana. Já as ERN agem como moléculas regulatórias do relaxamento do músculo liso e na inibição da adesão de plaquetas [Droge, 2002].

Diante disso, compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos são empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e na medicina, atenuando assim os efeitos dos radicais livres [Valko et al., 2007]. Apesar da excelente capacidade do sistema antioxidante endógeno em sustentar a homeostase redox, nosso organismo requer outras fontes de antioxidantes, normalmente adquiridas pela dieta [Pietta, 2000]. Os

antioxidantes agem de forma a inibir, retardar ou diminuir o dano oxidativo, protegendo as células, reestabelecendo ou mantendo a homeostase redox [Valko et al., 2007].

Em termos gerais, os sistemas antioxidantes são divididos em dois principais grupos: enzimático e não-enzimático. Entretanto, Halliwell e Gutteridge [2000] apresentam o sistema antioxidante dividido em duas etapas: a) interceptação das espécies reativas e b) reparo dos danos causados pelas espécies reativas. A primeira etapa ocorreria através de substâncias enzimáticas e/ou não enzimáticas, como vitaminas e compostos antioxidantes; a segunda etapa aconteceria através de enzimas de reparo, as quais atuam em danos causados pelos radicais livres no DNA, esses danos desempenham um importante papel nos processos de mutagênese e carcinogênese [Poulsen et al. 1998].

Assim sendo, pesquisadores buscam nos alimentos efeitos protetores em órgãos alvos de estresse oxidativo (como fígado e sangue, por exemplo). No contexto do processo cervejeiro, considerando as cervejarias como laboratórios, a bioquímica foi fundada como ferramenta de estudo, controle e melhoramento do produto. Evidenciando o alto potencial de ensino de bioquímica no processo cervejeiro.

### **1.6 Defesas antioxidantes não enzimáticas**

Muitos alimentos de origem vegetal são considerados ricos em defesas antioxidantes não enzimáticas que podem ser absorvidas, dependendo de sua biodisponibilidade, pelos animais que as consomem. Entre os antioxidantes mais conhecidos, estão os polifenóis. Estes são um grupo de moléculas muito presente nos vegetais, sendo que suas características físico-químicas

conferem proteção contra patógenos e contra radiação ultravioleta [Kumazawa et al., 2006; Rudnicki et al., 2007]. Os flavonoides são os polifenóis mais estudados, e apresentam uma estrutura comum de difenilpropano, com dois anéis aromáticos unidos por três carbonos (Fig. II). A ação bioquímica dos

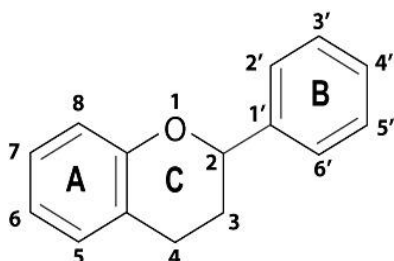


Fig. II: Estrutura química dos flavonoides. [Lillo, Lea & Ruoff, 2008].

polifenóis deve-se a sua capacidade de reação com radicais livres e/ou espécies reativas, eliminando-as ou reagindo com elas, impedindo que reajam com outras biomoléculas [Bravo 1998]. Os compostos fenólicos se apresentam como a principal classe de antioxidantes presentes nas plantas com funções redutoras e sequestradoras de radicais livres, estando associadas a capturar ERO [Craveiro, 2006].

As cervejas, por serem produzidas a partir de vegetais como o malte de cevada e o lúpulo, possuem uma matrix complexa rica em polifenóis, nos quais já foram atribuídas diversas propriedades benéficas para a saúde humana [Gerhauser, 2005]. A estimativa do consumo de polifenóis é incerta e varia na literatura, pois nos sistemas biológicos, os compostos não agem isolados ou como nos tubos de ensaio, havendo um sinergismo entre eles e o meio em que se encontram, além de uma possível interação com a microbiota particular de cada animal [Possemiers et al., 2005]. A cerveja artesanal, por não ser filtrada e conter células de leveduras, é considerada uma boa fonte alimentar desse tipo de moléculas, fornecendo diversos compostos tanto para a microbiota, quanto para o nosso organismo [Possemiers et al., 2005; Bamforth, 2002].

## 1.7 Modelo de indução de dano com tetracloreto de carbono

O  $\text{CCl}_4$ , quando administrado em um animal, é metabolizado no fígado e transformado no radical  $\text{CCl}_3\cdot$ , desencadenando uma série de reações e respostas nos biosistemas [Pinto et al., 2012; Van de Bovenkamp et al., 2006]. Uma substância potencialmente antioxidante é investigada através de um modelo com um dano prévio ou uma indução de dano. O modelo de indução oxidativa com tetracloreto de carbono é um dos mais utilizados na literatura em testes para moléculas com atividade hepatoprotetora [Al-Yahya et al., 2013; Rudinicki et al., 2007; Dani et al., 2009]. A disponibilidade de substâncias antioxidantes através da dieta rica em compostos fenólicos pode reduzir o dano causado pelo tetracloreto de carbono [Parise et al., 1992; Neves et al., 2003; Chehter et al., 1987]. Além disso, o Legalon<sup>®</sup>, um medicamento dito hepatoprotetor, é geralmente utilizado na literatura como controle interno do modelo de indução [Al-Yahya et al., 2013; Nasiri Bezenjani et al., 2012]. Esse é um fitoterápico obtido a partir da planta *Silybum marianum*, que contém grandes quantidades de silimarina (cerca de 80 % do extrato seco das folhas), seu componente ativo, que proporciona uma melhora nos sintomas clínicos de hepatite, cirrose e lesões do fígado. A silimarina é um flavonoide que age protegendo as membranas celulares dos hepatócitos, mantendo sua integridade [Vargas-Mendoza et al., 2014].

## 2. JUSTIFICATIVA

Por ser uma bebida amplamente consumida, pesquisas relevantes para a saúde humana contribuem para o conhecimento científico e popular. Além disso, pouco se conhece sobre os efeitos benéficos da cerveja. Wright e colaboradores [2008] mostraram em sua pesquisa que a cerveja é no mínimo equivalente ao vinho sob a ótica nutricional no combate a doenças cardiovasculares. Uma dieta rica em polifenóis contribui para o sistema antioxidante do nosso organismo [Pietta, 2000]. Sabemos que as cervejas possuem uma grande quantidade de compostos como os polifenóis [Gerhauser, 2005], porém não sabemos se esses são absorvidos pelo nosso organismo e nem se são capazes de prevenir algum tipo de estresse induzido.

Sabe-se que para observação de efeitos antioxidantes em biosistemas é necessário que haja um desequilíbrio redox, o estresse oxidativo. Para isso foi utilizado o modelo de indução de dano com  $\text{CCl}_4$ , por ser bem estabelecido e aceito na literatura [Van de Bovenkamp et al., 2006; Rudinicki et al., 2007; Dani et al., 2009; Pinto et al., 2012; Al-Yahya et al., 2013; Gasparotto et al., 2014]. Dentro desse modelo, como controle positivo, é utilizado um hepatoprotetor (silimarina do medicamento Legalon<sup>®</sup>) [Nasiri Bezenjani et al., 2012].



### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi investigar o impacto do consumo de cerveja artesanal e se o pré-tratamento crônico com essa bebida poderia prevenir ou atenuar o dano hepático induzido por CCl<sub>4</sub> em ratos Wistar machos.

Para atingir a este objetivo geral, desenvolveram-se os seguintes objetivos específicos:

- 1) Comparar o potencial antioxidante das cervejas artesanais, das cervejas comerciais e dos extratos de lúpulo *in vitro*.
- 2) Observar se o tratamento com cerveja altera parâmetros basais fisiológicos em animais.
- 3) Verificar o efeito do consumo de cerveja em modelo animal de dano hepático induzido por tetracloreto de carbono.

#### **4. RESULTADOS**

Nessa parte do trabalho, os resultados, bem como os materiais e métodos, serão apresentados em forma de artigo científico. Esse artigo será submetido ao periódico Journal of Food and Chemical Toxicology, intitulado:

Could craft beer really be efficient as hepatoprotector?

## 5. DISCUSSÃO

A cerveja é uma fonte única de diversos compostos conhecidos por seus efeitos benéficos [Gerhauser, 2005]. Comparando as cervejas sob a ótica antioxidante, encontramos variação em seu potencial devido à forma de fabricação. Quando analisamos a resposta que as cervejas desencadearam no modelo animal, percebemos que houve uma diferença de resultados entre a cerveja artesanal e a comercial.

A produção de cerveja é realizada em tanques de aço inoxidável, sendo essa liga metálica passível de contaminação por metais pesados, decidiu-se analisar se havia presença de Pb, Cd e Cr, nas cervejas. Metais pesados podem causar danos a sistemas biológicos, acumulando-se no organismo, já que não são metabolizados. Apesar de todas as concentrações de metais estarem abaixo dos níveis críticos para a saúde humana [Directive, 1998], os maiores níveis foram encontrados na cerveja comercial. Esses metais são absorvidos e acumulados pelas plantas, podendo provir da cevada, do lúpulo, mas também da água, dos equipamentos ou dos adjuntos cervejeiros utilizados na fabricação da cerveja. As diferenças dos níveis de metais entre as cervejas artesanais ocorrem provavelmente pela variedade de maltes utilizados, já que os equipamentos e a água utilizada foram os mesmos.

Todos os compostos encontrados nas cervejas testadas já foram encontrados em outros estudos com cervejas [Gerhauser, 2005], mas com uma pequena diferença de concentrações. Os fenólicos da cevada passam por mudanças durante a malteação e fervura e são pouco conhecidos, o que acaba variando muito nas concentrações de cervejas. Já o xantohumol e isoxantohumol provindos do lúpulo normalmente são os compostos mais

presentes na cerveja, descritos nas concentrações de aproximadamente 0,04 mL/g e 0,73 mL/g, respectivamente [Walker et al., 2003; Wunderlich et al., 2003]. As catequinas são potentes antioxidantes capazes de ajudar na sobrevivência celular, conhecidas como quelantes de ferro [Kuwabara et al., 2008]. Alguns compostos podem ser metabolizados pela microbiota entérica, ativando os efeitos benéficos desses compostos, por exemplo, a esterificação do ácido cafeico torna-o eficiente contra o dano induzido por peróxido de hidrogênio [Nakayama et al., 1992].

As cervejas testadas apresentaram potentes efeitos antioxidantes *in vitro*, mas se tinha dúvidas se elas poderiam agir como próoxidantes em sistemas biológicos, uma vez que o teor de álcool das cervejas poderia ser um agravante ou atenuante em situações fisiológicas e/ou patológicas [Halliwell, 2007]. Por isso, fez-se alguns testes prévios e o consumo de cerveja artesanal não acarretou em nenhum tipo de dano ou prejuízo em ratos. Como existe uma vasta literatura sobre os efeitos benéficos de componentes presentes no lúpulo, testou-se *in vitro*, através do ensaio TRAP, os respectivos extratos de lúpulo das cervejas artesanais. Os extratos apresentaram um menor potencial antioxidante quando comparados às respectivas cervejas. Provavelmente isso ocorreu por que: existam potentes antioxidantes provenientes dos metabólitos da levedura e/ou os compostos fenólicos possam ser ativados pelo metabolismo fermentativo; os compostos fenólicos presentes na cevada podem ser importantes e não são totalmente eliminados no processo cervejeiro; o álcool auxiliaria os compostos fenólicos, solubilizando-os; ou talvez exista um sinergismo entre todos os componentes da cerveja.

Para uma interpretação dos resultados de consumo para humanos, calculou-se o quanto os animais beberam em média, levando em conta a área e o volume corporal [Reagan-Shaw, Nihal, Ahmad, 2008]. O consumo equivalente para um humano de 70 kg foi de 1134 mL para a cerveja artesanal e 1474 mL para cerveja comercial, por noite. A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere um máximo de 750 mL por dia [OMS, 2015].

Apesar do consumo dessa quantidade de cerveja por 30 noites não causar dano oxidativo nos animais, o consumo de álcool aumentou os níveis de TBARS no soro, indicando uma possível lipoperoxidação. A cerveja artesanal possui a mesma porcentagem de álcool (6,7 %), entretanto ela não afetou nenhum parâmetro oxidativo, e talvez, os ingredientes da cerveja possam proteger o efeito danoso do álcool, quando em baixas concentrações [Gasbarrini et al., 1998].

Assim como os humanos, os animais preferiram a cerveja comercial, provavelmente por ser mais diluída e suave ao paladar. Esse resultado corrobora com estudos de alcoolismo e alto consumo de etanol [Hargreaves et al., 2011] que utilizam cerveja para conseguirem um aumento no consumo de etanol, por essa bebida ser mais agradável ao paladar. O quão fácil uma bebida é consumida serve como um parâmetro de paladar que os cervejeiros chamam de “dringabilidade” (“drinkability”). Apesar de estar descrito que a ingestão de álcool aumenta os níveis de HDL [Chiva-Blanch et al., 2013], somente a cerveja artesanal aumentou esse parâmetro, corroborando com outros trabalhos em que a cerveja apresentou efeitos positivos no perfil lipídico plasmático e na capacidade antioxidante plasmática [Gasowski et al., 2004]. Isso reforça a ideia de que a cerveja artesanal possui uma matriz mais

complexa que exerça efeitos sinérgicos em sistemas biológicos. O álcool (6,7 %) por si foi capaz de aumentar os níveis de lipoperoxidação no soro. Embora a cerveja artesanal tenha a mesma concentração de álcool (6,7 %), essa apresentou um aumento dos níveis de HDL. Por outro lado, a cerveja é gaseificada, o que aumentaria a absorção dos nutrientes e de álcool e, além disso, a cerveja é descrita na literatura por aumentar a absorção de nutrientes [Gasowski et al., 2004]. Então, os componentes presentes na cerveja acabam agindo sinergisticamente e atenuando possíveis danos que componentes isolados poderiam ter.

O  $\text{CCl}_4$  é descrito por ser metabolizado pelo sistema citocromo P-450 que compõe o sistema microssomal hepático, formando o verdadeiro composto tóxico [Mclean & Mclean, 1966], o radical triclorometil, que reage rapidamente com oxigênio formando um radical peroxil [Recknagel et al., 1989]. Essa molécula é semelhante ao radical gerado *in vitro* na técnica TRAP, reforçando a ideia de que a cerveja poderia ser eficiente como hepatoprotetora. O  $\text{CCl}_4$  pode induzir estresse oxidativo, elevando níveis de TBARS, níveis de carbonilas e outros parâmetros oxidativos [Dani et al., 2008; 2009, Gasparotto et al., 2014]. Entretanto, no presente experimento, observou-se um dano hepático nas imagens histológicas, um aumento dos níveis de ALT e AST, mas nenhum aumento de parâmetros oxidativos no fígado. Provavelmente isso ocorreu porque a lipoperoxidação é muitas vezes um evento tardio, acompanhando ao invés de causando a morte celular [Halliwell & Gutteridge, 1984; Halliwell & Chirico, 1993]. Outros estudos também relatam para essa mesma dose de  $\text{CCl}_4$  um aumento nos níveis de ALT e AST, caracterizando o dano hepático [Wang & Li et al., 2014; Rudnicki et al., 2007]

Além disso, o  $\text{CCl}_4$  também é capaz de inibir as bombas de cálcio, o que acarreta em um aumento intracelular de cálcio livre, que conseqüentemente ativa uma grande variedade de enzimas hidrolíticas como nucleases e proteases [Schanne et al., 1979; Orrenius et al., 1989; Srivastava, Chen, Holtzman, 1990]. Isso leva a um influxo celular de água, ocasionando degeneração hidrópica e desaparecimento do núcleo, como observado nas imagens histológicas (Fig. 2 do artigo). Esse fato confirma a efetividade da injeção de  $\text{CCl}_4$  como indutor de dano hepático. Tendo em vista o mecanismo de ação do  $\text{CCl}_4$ , aumentando o influxo de cálcio, compostos quelantes de cálcio, propriedade observada em muitos polifenóis [Radhakrishnan & Sivaprasad, 1980; Mcdonald, Mila, Scalbert, 1996] sugeririam que estes poderiam exercer um efeito protetor contra o dano induzido por  $\text{CCl}_4$ .

O aumento de peso do fígado nos animais que receberam o  $\text{CCl}_4$  pode ter ocorrido devido a um influxo celular de água. Um dos efeitos conhecidos da silimarina é a diminuição do metabolismo de cálcio [Vargas-Mendoza et al., 2014], o que poderia ser a explicação para a redução do peso das gorduras gonadal e retroperitoneal nos animais tratados com esse medicamento. Corroborando com o efeito de depleção dos estoques energéticos ocasionados pelo  $\text{CCl}_4$  [Krahenbuhl, Weber, Brass 1991], observou-se uma diminuição do glicogênio presente no fígado, bem como uma diminuição nos níveis de glicose no soro dos animais que receberam a injeção com  $\text{CCl}_4$ .

Assim como descrito na literatura (Halliwell & Gutteridge, 1984), o  $\text{CCl}_4$  diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD e a GPX. Contudo, a cerveja artesanal e a silimarina, na presença de  $\text{CCl}_4$ , apresentaram um aumento no imunoconteúdo da enzima SOD3 presente no

soro, indicando uma resposta adaptativa ao insulto. A cerveja comercial aumentou a atividade da SOD2, aparentemente revelando certa proteção ao CCl<sub>4</sub>. em um nível baixo, esses extratos podem ser considerados como hepatoprotetores pois eles ajudaram o organismo a diminuir o superóxido no meio. Isso concorda com resultados da literatura que descreveram proteção mitocondrial para a cerveja com o indutor de dano mitocondrial adriamicina [Valls-Belles et al., 2010]. Provavelmente, o CCl<sub>4</sub> afeta as coenzimas das enzimas antioxidantes como cobre, zinco e manganês [Halliwell & Gutteridge, 84; Dröge 2002]. Remover o excesso de superóxido pelas enzimas SOD é um importante mecanismo fisiológico de defesa antioxidante em organismos aeróbicos. Esse superóxido pode ser redutor ou oxidante, dependendo do meio que se encontra. No caso do CCl<sub>4</sub>, o superóxido pode reduzi-lo, retirando um íon cloreto e transformando-o no radical triclorometil (Roberts & Sawyer, 1981).

Entretanto, uma maior atividade da SOD pode ser danoso, pois o peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa capaz de desencadear cascatas de oxidações lipídicas e de outras biomoléculas. Altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem inativar enzimas da via glicolítica [Hyslop et al., 1988]. Apesar disso, o peróxido de hidrogênio desempenha um papel importante na sinalização celular [Halliwell, 2007], tornando a razão SOD/peroxidases fundamental para a homeostase celular e proteção contra o CCl<sub>4</sub>.

A atividade da CAT diminuiu com CCl<sub>4</sub>, mas a cerveja artesanal e a silimarina puderam aumentar a atividade dessa enzima, provavelmente para balancear a homeostase redox. Todavia a expressão da CAT não teve



diferenças entre os grupos. A razão entre a atividade das enzimas SOD/peroxidases exibe um resultado para uma possível explicação de oxidação à biomoléculas [Pinho et al., 2006]. O álcool apresentou a maior razão, indicando mais atividade da SOD do que das peroxidases e por isso gerando um excedente de peróxido de hidrogênio. Isso poderia explicar o aumento dos níveis de TBARS no soro desse grupo, mesmo sendo em outro órgão. É conhecido que a depleção de defesas antioxidantes e/ou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio podem desequilibrar o balanço ERO/antioxidantes e causar estresse oxidativo [Sies, 1997].

O resultado obtido na técnica do TRAP/TAR revelou um potencial antioxidante maior no soro dos animais que receberam a injeção de CCl<sub>4</sub>. Provavelmente esse resultado demonstra uma mobilização de glutathione de outros órgãos para reparar as bombas de cálcio danificadas no fígado [Srivastava et al., 1990]. Apesar da atividade da GST no fígado diminuir com o CCl<sub>4</sub>, a cerveja artesanal e a silimarina aumentaram-na, indicando uma possível proteção para a detoxificação do CCl<sub>4</sub>. Porém, um aumento da atividade dessa enzima pode depletar a glutathione disponível, prejudicando vias fisiológicas onde essa molécula é essencial.

A diferença dos teores de álcool entre as cervejas pode ser desconsiderada, pois existe, também, uma diferença de consumo. Apesar de alguns tratamentos revelarem uma interessante interação com o CCl<sub>4</sub>, nenhum deles pode ser eficiente como hepatoprotetor

## **6. CONCLUSÕES**

O tratamento com cerveja por 30 noites não apresentou elevação nos níveis de danos oxidativos do fígado e do soro analisados nessa pesquisa, bem

como se verificou que não houve aumento do peso das gorduras abdominais. O consumo moderado de cerveja artesanal (aproximadamente 40 mL por noite, por animal, com 6,7 % de álcool), apesar de conter álcool, aumentou os níveis de HDL, e da capacidade antioxidante do soro. A cerveja comercial foi mais consumida pelos animais e acredita-se que isso tenha se dado por esta ser menos calórica que a artesanal, já que os animais normais possuem um controle regulatório endógeno para ingestão de calorias. O grupo que consumiu etanol 6,7 % em água foi o único que apresentou algum tipo de dano oxidativo. Nenhum tratamento foi capaz de atenuar o dano hepático induzido por CCl<sub>4</sub>.

## **7. PERSPECTIVAS**

Estudar a biodisponibilidade dos compostos da cerveja, identificando possíveis metabólitos e relacionando com o efeito do consumo dessa bebida na microbiota intestinal.

Identificar qual o mecanismo de ação desses metabólitos nas nossas células e determinar modificações em vias de sinalização.

Fazer os estudos com humanos, analisando sua história e cultura com a cerveja e relacionando com a microbiota intestinal.

Investigar se o medicamento que continha a silimarina (Legalon) pode ser considerado termogênico, pois ele foi capaz de diminuir o peso da gordura abdominal sem alterar outros parâmetros fisiológicos do animal e nem mesmo aumentar os danos oxidativos.

## **8. REFERÊNCIAS**

Akbaraly, T. N., Brunner, E. J., Ferrie, J. E., Marmot, M. G., Kivimaki, M., & Singh-Manoux, A. (2009). Dietary pattern and depressive symptoms in middle age. *The British Journal of Psychiatry*, 195(5), 408-413.

Al-Yahya, M., Mothana, R., Al-Said, M., Al-Dosari, M., Al-Musayeb, N., Al-Sohaibani, M. & Rafatullah, S. (2013). Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress and hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr honey in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., & Lima, U. D. A. (2001). *Biotechnology Industrial: Biotechnology na produção de alimentos*, Vol. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher.
- Bamforth, C. W. (2002). Nutritional aspects of beer—a review. *Nutrition Research*, v. 22, n. 1, p. 227-237.
- Beer Judge Certification Program (BJCP). 2008. Style Guideline. Disponível em: <[http://www.bjcp.org/docs/2008\\_Guidelines.pdf](http://www.bjcp.org/docs/2008_Guidelines.pdf)> Acesso em: 12 fevereiro. 2016.
- Bernstein, L., Willox, J.C. (1977). Água. Em: BRODERICK, H.M. *El cervecero en La pratica*. Lima: Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza. Cap. 4, p.53-82.
- Bittencourt Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Zeidán-Chuliá, F., Pires, A. S., Gasparotto, J., Terra, S. R., & Moreira, J. C. F. (2013). Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF-κB in human lung cancer A549 cells. *Cellular Signalling*, 25(4), 939-954.
- Botelho, B. G. (2009). Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Brasília, D. F. (2006). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a pesquisa clínica no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*, 52(1), 60-2.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Brewers Association, 2011. <https://www.brewersassociation.org> Acesso em: 15/02/2016.
- Brigido, R.V.; Netto, M.S. (2006). *Produção de Cerveja*. Universidade Federal de Santa Catarina. Monografia Departamento de Eng. Química e Eng. de alimentos. Florianópolis, Santa Catarina.
- Ceh, B., Kac, M., Košir, I. J., & Abram, V. (2007). Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 989-1000.
- Chehter, L., Mor, M., Silva, M. R. R., Barbosa, V. P., Vilela, M. P., & Parise, E. R. (1988). Alteração da fibrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono, pela administração prévia de vitamina A. *Rev. Paul. Med*, 106(4), 185-9.
- Chen, W., Becker, T., Qian, F., & Ring, J. (2014). Beer and beer compounds: Physiological effects on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(2), 142-150.
- Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2013). Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol and Alcoholism*, 48(3), 270-277.
- Cohen, J. D., Duncan, D., Snyder, D., Cooper, J., Kumar, S., Hahn, D., Graettinger, J. (2004, December). iClay: Digitizing Cuneiform. In VAST (pp. 135-143).
- Colgrave, M. L., Goswami, H., Howitt, C. A., & Tanner, G. J. (2013). Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International*, 54(1), 1001-1012.

Cooper, T. J. (1994). Medical considerations of moderate alcohol consumption. In *Proceedings Of The Convention-Institute Of Brewing Australia And New Zealand Section* (Vol. 23, pp. 32-32).

Coutinho, C. A. T., Quintella, C., & Panzani, M. (2008). A história da cerveja no brasil. v. 5. Cervesia. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/72-a-historia-da-cerveja-no-brasil.html>>. Acesso em: 03 março. 2016.

Craveiro, a. C. (2006). As cores da longevidade - a batalha antioxidante contra o envelhecimento. 1. Ed. Fortaleza: Padetec. V. 1. 140p.

Cravo, M. L., Gloria, L. M., Selhub, J., Nadeau, M. R., Camilo, M. E., Resende, M. P., ... & Mira, F. C. (1996). Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(2), 220-224.

Cruz, J. M. M., Pinheiro, J. L., de Amorim, S. M., & Kuglin, V. B. (2007). Produção de Cerveja. *Reactores Biológicos-Fundamentos e Aplicações*, 277-305.

Dani, C., Oliboni, L. S., Umezu, F. M., Pasquali, M. A., Salvador, M., Moreira, J. C. F., & Henriques, J. A. P. (2009). Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice—organic and conventional—in adult rats. *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1111-1118.

Dani, C., Pasquali, M. A., Oliveira, M. R., Umezu, F. M., Salvador, M., Henriques, J. A., & Moreira, J. C. (2008). Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 55-61.

Darby, W. J., Ghalioungui, P., Grivetti, L., & Darby, W. J. (1977). *Food: the gift of Osiris* (Vol. 2, pp. 691-695). London: Academic Press.

Devi, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., & Priyadarisini, V. B. (2014). Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1021-1040.

Dimmitt, S. B., Rakic, V., Puddey, I. B., Baker, R., Oosttryck, R., Adams, M. J., ... & Beilin, L. J. (1998). The effects of alcohol on coagulation and fibrinolytic factors: a controlled trial. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 9(1), 39-46.

Directive, C. (1998). On the quality of water intended for human consumption. *Brussels, Belgium: Council Directive*, 98, 83.

Dorn, C., Weiss, T. S., Heilmann, J., & Hellerbrand, C. (2010). Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology*, 36(2), 435-441.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.

Dufour, M. C., Archer, L., & Gordis, E. (1992). Alcohol and the elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*, 8(1), 127-141.

Ferreira, A. B. D. H. (1986). *Novo dicionário da língua portuguesa*. 2ª edição. Rio de Janeiro. Nova Fronteira. 1986. p. 385.

Flikweert M.T. (1999) Physiological roles of pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, Delft University of Technology, Delft. ISBN 90-9013020-9.

Gallate, J. E., Morley, K. C., Ambermoon, P., & McGregor, I. S. (2003). The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 166(1), 51-60.

- Garcia, C.C. (2012). *Retórica e Cenário Microcervejeiro nas Regiões Sul e Sudeste*. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Araçatuba, SP.
- Gasbarrini, A., Addolorato, G., Simoncini, M., Gasbarrini, G., Fantozzi, P., Mancini, F., Scaccini, C. (1998). Beer affects oxidative stress due to ethanol in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(6), 1332-1338.
- Gasowski, B., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Katrich, E., Lojek, A., Číž, M., ... & Gorinstein, S. (2004). The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 527-533.
- Gasparotto, J., Somensi, N., Bortolin, R. C., Girardi, C. S., Kunzler, A., Rabelo, T. K., ... & Vizzotto, M. (2014). Preventive supplementation with fresh and preserved peach attenuates CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress, inflammation and tissue damage. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(12), 1282-1295.
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoлова, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415.
- Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941-1954.
- González-Gros, M., Lebrón, M. R., & Marcos, A. (2000). *Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud*. Ed. Centro de Información cerveza y salud. Madrid. Disponível em: < <http://www.cervezaysalud.org> >. Acesso em: 25 dezembro. 2015
- Gutteridge, J., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.
- Halliwell, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 23(Suppl. 1), 118-126.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-724S.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet*, 323(8391), 1396-1397.
- Hargreaves, G. A., Wang, E. Y., Lawrence, A. J., & McGregor, I. S. (2011). Beer promotes high levels of alcohol intake in adolescent and adult alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 45(5), 485-498.
- Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular Research*, 73(2), 341-347.
- Hendriks, H. F., Veenstra, J., Velthuis-te Wierik, E. J., Schaafsma, G., & Kluit, C. (1994). Effect of moderate dose of alcohol with evening meal on fibrinolytic factors. *BMJ*, 308(6935), 1003-1006.
- Hendriks, H. F., Veenstra, J., Van Tol, A., Groener, J. E., & Schaafsma, G. (1998). Moderate doses of alcoholic beverages with dinner and postprandial high density lipoprotein composition. *Alcohol and Alcoholism*, 33(4), 403-410.

- Ho, Y., Liu, C., Chen, C., Duan, K., & Lin, M. (2008). Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytotherapy Research*, 22(11), 1465-1468.
- Hornsey, I.S. (1999). *Brewing. The Royal Society of Chemistry*, Cap. 2: Malting.
- Hughes, P. S.; Baxter, E. D. (2001). *Beer-quality, safety and nutritional aspects*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. Cap. 5: Nutricional Aspects of Beer.
- Humberstone, F. J., & Briggs, D. E. (2000). Extraction and Assay of Ferulic Acid Esterase From Malted Barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(1), 21-30.
- Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Halsey, W. A., Schraufstatter, I. U., Sauerheber, R. D., Spragg, R. G., ... & Cochrane, C. (1988). Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 263(4), 1665-1675.
- Ikawa, M., Okazawa, H., Kudo, T., Kuriyama, M., Fujibayashi, Y., & Yoneda, M. (2011). Evaluation of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using [62 Cu] ATSM PET. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(7), 945-951.
- Imhof, A., Froehlich, M., Brenner, H., Boeing, H., Pepys, M. B., & Koenig, W. (2001). Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *The Lancet*, 357(9258), 763-767.
- Jiménez, D., Cervantes, M., Castillo, M., Romeo, J., & Marcos, A. (2009). Idoneidad de la cerveza en la recuperación del metabolismo de los deportistas. *Centro de Información Cerveza y Salud (CISC)*. Madrid. Disponível em: < <http://www.cervezaysalud.org>>. Acesso em: 25 dezembro. 2015
- Joshiyura, K. J. Ascherio, A., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E. & Willett, W. C. (1999). Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *Jama*, 282(13), 1233-1239.
- Karatzis, K., Rontoyanni, V. G., Protogerou, A. D., Georgoulia, A., Xenos, K., Chrysou, J., ... & Sidossis, L. S. (2013). Acute effects of beer on endothelial function and hemodynamics: A single-blind, crossover study in healthy volunteers. *Nutrition*, 29(9), 1122-1126.
- Keisari, Y., Braun, L., & Flescher, E. (1983). The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*, 165(1), 78-89.
- Kimura, T., Iwasaki, N., Yokoe, J. I., Haruta, S., Yokoo, Y., Ogawara, K. I., & Higaki, K. (2000). Analysis and prediction of absorption profile including hepatic first-pass metabolism of N-methyltyramine, a potent stimulant of gastrin release present in beer, after oral ingestion in rats by gastrointestinal-transit-absorption model. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(5), 577-581.
- Kirin Beer University. Report Global Beer Consumption. Disponível em: <<http://www.kirinholdings.co.jp/>>. Acesso em: 15 fevereiro. 2016.
- Koenig, W., Sund, M., Fröhlich, M., Fischer, H. G., Löwel, H., Döring, A., ... & Pepys, M. B. (1999). C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, 99(2), 237-242.
- Koenig, W., & Wanner, C. (1999). C-reactive protein and coronary artery disease—what is the link?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(12), 2798-2800.
- Krahenbuhl, S., Weber, F. L., & Brass, E. P. (1991). Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*, 14(6), 1189-1195.

- Kumazawa, Y., Kawaguchi, K., & Takimoto, H. (2006). Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Current Pharmaceutical Design*, 12(32), 4271-4279.
- Kuwabara, M., Asanuma, T., Niwa, K., & Inanami, O. (2008). Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(2), 51-57.
- Lillo, C., Lea, U. S., & Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 587-601.
- McDonald, M., Mila, I., & Scalbert, A. (1996). Precipitation of metal ions by plant polyphenols: optimal conditions and origin of precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 599-606.
- McLean, A. E. M., & McLean, E. K. (1966). The effect of diet and 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis-(p-chlorophenyl) ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochemical Journal*, 100(2), 564-571.
- Monteiro, R., Becker, H., Azevedo, I., & Calhau, C. (2006). Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2938-2943.
- Morado, R. (2009). *Larousse da cerveja*. 1ª Ed. São Paulo: Larousse do Brasil,. 357p.
- Motyl, M. (2013). *The absorption of xanthohumol in in vitro and in vivo studies and the investigation of the biological activity of structurally related chalcones* (Doctoral dissertation). Disponível em: [http://epub.uni-regensburg.de/26572/1/Magdalena\\_Motyl\\_Dissertation\\_BibExemplar.pdf](http://epub.uni-regensburg.de/26572/1/Magdalena_Motyl_Dissertation_BibExemplar.pdf). Acesso em: 02 fevereiro. 2016
- Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1992). The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutation Research Letters*, 281(2), 77-80.
- Nasiri Bezenjani, S., Pouraboli, I., Malekpour Afshar, R., & Mohammadi, G. (2012). Hepatoprotective effect of *Otostegia persica* Boiss. shoot extract on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1235-1241.
- Negi, R., Pande, D., Karki, K., Kumar, A., Khanna, R. S., & Khanna, H. D. (2014). Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Chemico-Biological Interactions*, 208, 77-83.
- Negrão, R., Costa, R., Duarte, D., Gomes, T. T., Coelho, P., Guimarães, J. T., ... & Soares, R. (2012). Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 100-109.
- Nelson, M. L., Dinardo, A., Hochberg, J., & Armelagos, G. J. (2010). Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American Journal of Physical Anthropology*, 143(1), 151-154. DOI: [10.1002/ajpa.21340](https://doi.org/10.1002/ajpa.21340)
- Neves, L. B., Catarino, R. M., Silva, M. R. R., & Parise, E. R. (2003). Increased serum levels of laminin in the experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Arquivos de Gastroenterologia*, 40(3), 173-176.

Nogueira, L. C. (2006). *Estudo comparativo de caracterização e bioatividade de cerveja com e sem álcool*. Tese (Doutorado), Instituto de Química. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro Campinas.

Oliveira, Maria Helena de. Cerveja: um mercado em expansão. BNDES. (1996). Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes\\_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta\\_Expressa/Setor/Bebidas/199609\\_14.html](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Setor/Bebidas/199609_14.html)> Acesso em: 25 dezembro. 2015.

Organização mundial da saúde. OMS (2015). Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 12 dezembro. 2015.

Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., & Nicotera, P. (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(7), 281-285.

Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Quaglia, M., Gregotti, C., & Gazzani, G. (2006). Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1209-1216.

Parise, E. R., Chehter, L., Nogueira, M. D., Leite-Mor, M. M., Tersariol, I. L., Michelacci, Y. M., & Nader, H. B. (1992). Effects of vitamin A administration on collagen and sulfated glycosaminoglycans contents in the livers of rats treated with carbon tetrachloride. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6), 676-681.

Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., & Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142-8160.

Pavón, D. J., Cervantes-Borunda, M., Romeo, J., & Garzón, M. J. C. (2008). Utilidad de la cerveza en la recuperación del metabolismo mineral, hormonal e inmunológico de deportistas tras realizar un esfuerzo físico en un ambiente caluroso. In *IV Congreso Internacional y XXV Nacional de Educación Física (Córdoba, 2-5 de abril de 2008): "los hombres enseñando aprenden"*. Séneca (Epst. 7, 8) (p. 730).

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.

Pinho, R. A., Andrades, M. E., Oliveira, M. R., Pirola, A. C., Zago, M. S., Silveira, P. C. & Moreira, J. C. F. (2006). Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*, 30(10), 848-853.

Pinto, C., Duque, A. L., Rodríguez-Galdón, B., Cestero, J. J., & Macías, P. (2012). Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3405-3412.

Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., De Keukeleire, D., & Verstraete, W. (2005). Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6281-6288.

Poulsen, H. E., Loft, S., Prieme, H., Vistisen, K., Lykkesfeldt, J., Nyssonen, K., & Salonen, J. T. (1998). Oxidative DNA damage in vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Radical Research*, 29(6), 565-571.

Radhakrishnan, M. R., & Sivaprasad, J. (1980). Tannin content of sorghum varieties and their role in iron bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(1), 55-57.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661.

Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A., & Waller, R. L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 43(1), 139-154.



Reidy, J., McHugh, E., & Stassen, L. F. A. (2011). A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon*, 9(5), 278-283.

Rio, R. F. (2013). Desenvolvimento de uma cerveja formulada com gengibre (*Zingiber officinalis*) e hortelã do Brasil (*Mentha arvensis*): avaliação de seus compostos bioativos e comparação com dois estilos de cerveja existentes no mercado. Tese de mestrado do Instituto Federal do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.ifrj.edu.br/sites/default/files/webfm/proppi/Rafaela.pdf>>. Acesso em: 12 dezembro. 2015.

Roberts Jr, J. L., & Sawyer, D. T. (1981). Facile degradation by superoxide ion of carbon tetrachloride, chloroform, methylene chloride, and p, p'-DDT in aprotic media. *Journal of the American Chemical Society*, 103(3), 712-714.

Roy, P. & Kulkarni, A. P. (1996). Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 34(6), 563-570.

Rudnicki, M., de Oliveira, M. R., da Veiga Pereira, T., Reginatto, F. H., Dal-Pizzol, F., & Moreira, J. C. F. (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, 100(2), 719-724.

Saugstad, O. D. (2001). Update on oxygen radical disease in neonatology. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 13(2), 147-153.

Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., & Farber, J. L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 206(4419), 700-702.

Schnorr, C. E., da Silva Morrone, M., Simões-Pires, A., da Rocha, R. F., Behr, G. A., & Moreira, J. C. F. (2011). Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Research*, 1369, 60-73.

Sierksma, A., Van Der Gaag, M. S., Kluff, C., & Hendriks, H. F. (2002). Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(11), 1130-1136.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.

Sindicato Nacional Da Indústria Da Cerveja (SINDICERV). Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/default.php>> Acesso em: 02 fevereiro. 2016.

Siqueira, P. B., Bolini, H. M. A., & Macedo, G. A. (2008). Beer production and its effects on the presence of polyphenols/O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição (Brazilian Journal of Food and Nutrition)*, 19(4), 491-499.

Srivastava, S. P., Chen, N., & Holtzman, J. L. (1990). The in vitro NADPH-dependent inhibition by CCl<sub>4</sub> of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic microsomes from male rats. Studies on the mechanism of the inactivation of the hepatic microsomal calcium pump by the CCl<sub>3</sub> radical. *Journal of Biological Chemistry*, 265(15), 8392-8399.

Stahl, W., & Sies, H. (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46(Supplement 2), S14-S18.

Stevens, J. F., Taylor, A. W., Clawson, J. E., & Deinzer, M. L. (1999). Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2421-2428.

Stewart, G. G., & Russell, I. (1996). An introduction to brewing science and technology series III. *Brewers' yeast*, Institute of Brewing: London, England.

- Teyssen, S., Lenzing, T., Gonzalez-Calero, G., Korn, A., Riepl, R. L., & Singer, M. V. (1997). Alcoholic beverages produced by alcoholic fermentation but not by distillation are powerful stimulants of gastric acid secretion in humans. *Gut*, *40*(1), 49-56.
- Unger, R. W. (2004). *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*. University of Pennsylvania Press. 319 p. ISBN: 0812237951, 9780812237955.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, *7*(1), 65-74.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44-84.
- Valls-Belles, V., Torres, C., Muñoz, P., & Codoñer-Franch, P. (2010). Effect of beer consumption on levels of complex I and complex IV liver and heart mitochondrial enzymes and coenzymes Q9 and Q10 in adriamycin-treated rats. *European Journal of Nutrition*, *49*(3), 181-187.
- Van de Bovenkamp, M., Groothuis, G. M. M., Meijer, D. K. F., Slooff, M. J. H., & Olinga, P. (2006). Human liver slices as an in vitro model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a multicellular milieu. *Chemico-Biological Interactions*, *162*(1), 62-69.
- Van der Gaag, M. S., van Tol, A., Scheek, L. M., James, R. W., Urgert, R., Schaafsma, G., & Hendriks, H. F. (1999). Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*, *147*(2), 405-410.
- Van der Gaag, M. S., Ubbink, J. B., Sillanaukee, P., Nikkari, S., & Hendriks, H. F. (2000). Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *The Lancet*, *355*(9214), 1522.
- Van der Gaag, M. S., Van Tol, A., Vermunt, S. H. F., Scheek, L. M., Schaafsma, G., & Hendriks, H. F. J. (2001). Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, *42*(12), 2077-2083.
- Vargas-Mendoza, N., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, A., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., García-Luna, Y., ... & Morales-González, J. A. (2014). Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol*, *6*(3), 144-9.
- Vinson, J. A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. R., & Bose, P. (2003). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5528-5533.
- Walker, C. J., Lence, C. F., & Biendl, M. (2003). Studies on xanthohumol levels in stout/porter beer. *Brauwelt Int*, *143*, 1709-1712.
- Wang, W. Li, J. Wang, Z., Gao, H., Su, L., Xie, J. & Han, Y. (2014). Oral hepatoprotective ability evaluation of purple sweet potato anthocyanins on acute and chronic chemical liver injuries. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *69*(3), 539-548.
- Warder, G. (2011). A Review of "Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages" McGovern, Patrick E., Berkeley: University of California Press 348 pp., ISBN 978-0-520-25379-7 Publication Date: October 2009. *History: Reviews of New Books*, *39*(2), 64-64.
- Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet*, *344*(8925), 793-795.

Wright, C. A., Bruhn, C. M., Heymann, H., & Bamforth, C. W. (2008). Beer consumers' perceptions of the health aspects of alcoholic beverages. *Journal of Food Science*, 73(1), H12-H17.

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

Yokoo, Y., Kohda, H., Kusumoto, A., Naoki, H., Matsumoto, N., Amachi, T., ... & Nukaya, H. A. (1999). Isolation from beer and structural determination of a potent stimulant of gastrin release. *Alcohol and Alcoholism*, 34(2), 161-168.

Zhao, F., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K., & Kitanaka, S. (2003). Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), 61-65.

## ANEXO I



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27632

Título: Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal

Vigência: 01/08/2014 à 28/02/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JOSE CLAUDIO FONSECA MOREIRA - coordenador desde 01/08/2014

Carlos Eduardo Schnorr - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014

LUCAS BRAMBILLA HILBIG FEISTAUER - Aluno de Mestrado desde 01/08/2014

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 27/10/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 145 ratos, Wistar, 60 dias, machos, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica/ICBS-UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 27 de Novembro de 2015

BRUNO CASSEL NETO  
Vice Pró-Reitor de Pesquisa

## ANEXO II

### GUIDE FOR AUTHORS

#### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

#### INTRODUCTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, aspires to publish original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived products, and nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**. The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following: Physiological, biochemical, or pathological changes induced by specific substances Techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability Manuscripts concerning materials/substances of only local interest for which the chemical composition of the material/substance is **not clearly defined** will **not** be considered. manuscripts addressing only pharmacological properties, or only potentially beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems, are not within the scope of the journal. FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the paper is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Papers pending in other journals will not be considered. Coauthors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers.

#### *Types of paper*

The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Short Communications will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. All Letters to the Editor should be submitted to the Editor in Chief, A. Wallace Hayes at the following address: awallacehayes@comcast.net.

#### BEFORE YOU BEGIN

##### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.  
AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 6

##### *Conflict of interest*

*Food and Chemical Toxicology* follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All thirdparty financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made

payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work. As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information Will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here, or at [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

#### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), 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, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects (i.e. animals and human subjects), and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

#### ***Changes to authorship***

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

#### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

#### ***Copyright***

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail Will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 7 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). 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: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article,

authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

#### **Role of the funding source**

You are required to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: *Creative Commons Attribution (CC BY)* Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)* For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 8

##### **Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of Green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 12 months.

##### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site

(<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Referees**

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 9 Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

## **REVISED SUBMISSIONS**

### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with a n editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*



Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016  
[www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 10

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the Best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

#### **Highlights**

Please amend your research highlights so that they consist of 3 to 5 brief bullet points which convey the core findings of your work. Please ensure EACH bullet point does NOT exceed 125 characters (including spaces). An example is given below: RESEARCH HIGHLIGHTS EXAMPLE: \* Research highlights are a mandatory field of a submitted paper & therefore should not exceed 85 characters including spaces.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Nomenclature and units**

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many Word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 11

• For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

• Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

## **References**

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016  
[www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 12

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from

these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-and-chemical-toxicology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
  3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....' *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. *Examples:* Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of*

Style, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Reference to a website: Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016 [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 13 usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Data in Brief**

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

#### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

**Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations AUTHOR INFORMATION PACK 16 Feb 2016  
[www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox) 14