

**Amanda Dupas de Matos**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA NUTRICIONAL DE CULTIVARES DE ARROZ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS  
Área de concentração: Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Cristina de Souza Ramos

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lídia Mariana Fiúza

**SÃO LEOPOLDO**

**2014**

Ficha catalográfica

M433a Matos, Amanda Dupas de

Avaliação bioquímica nutricional de cultivares de arroz / por  
Amanda Dupas de Matos. – 2014.  
70 f. : il., 30 cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos  
Sinos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos,  
2014.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Cristina de Souza Ramos;  
Coorientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lídia Mariana Fiúza.

1. *Oryza sativa*. 2. Compostos fenólicos. 3. Atividade  
antioxidante. I. Título.

CDU 633.18

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

**Amanda Dupas de Matos**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA NUTRICIONAL DE CULTIVARES DE ARROZ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

**Aprovado em 24/07/2014**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Renata Cristina de Souza Ramos – Universidade do Vale do Rio dos Sinos**

---

**Juliano Garavaglia – Universidade do Vale do Rio dos Sinos**

---

**Alessandro de Oliveira Rios – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Dedico essa conquista os meus amados pais Armando e Maria Ivone, e irmãos Renan e Larissa. Vocês são o alicerce da minha vida. Ao meu padrinho Odilon Dupas (*in memoriam*) que muito contente ficaria se estivesse vivenciando essa vitória de perto.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por Ele ser sempre fiel e iluminar todos os meus passos durante minha vida.

À minha família por todo amor, carinho, força, dedicação, diálogo e apoio que sempre tiveram comigo mesmo distantes.

Ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, pela oportunidade de aprendizado através do Mestrado Profissional. Ao Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde, por permitir com que essa pesquisa acontecesse e por toda a infraestrutura oferecida.

À minha professora e orientadora, Renata Ramos, pela atenção, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, além da amizade e companheirismo que me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente. Aos professores, pelo conhecimento transmitido e agregado, sempre com atenção e paciência.

Às bolsistas queridas Cecília Müller, Vitória Mottin, Roberta Ströher e Bruna Pedroso, pois durante essa jornada todas nós aprendemos juntas.

Às minhas grandes amigas Tamiris, Thayse, Anelise, Jomara, Vanessa e Milena Fernanda que, mesmo de longe, sempre acompanharam o meu desenvolvimento acadêmico e torcem pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Às minhas amigas de estudo Paula Fengler, Flávia Silveira e Maristela Dalmagro pelo companheirismo e amizade verdadeira, principalmente nos momentos difíceis ao longo da pesquisa.

Ao IRGA, especialmente ao pesquisador Carlos Alberto Alves Fagundes, pelo fornecimento dos materiais genéticos utilizados no trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O arroz é um cereal reconhecido pelas suas propriedades funcionais devido principalmente aos compostos bioativos presentes nas camadas mais externas do grão. Embora exista grande variedade fenotípica de arroz, a maior parte apresenta pigmentação de pericarpo marrom-claro, podendo ser consumida na forma integral ou polida. Trabalhos científicos têm demonstrado que o arroz pode apresentar diferenças nutricionais e funcionais relacionadas à pigmentação do pericarpo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a quantidade de compostos fenólicos totais (CFST), atividade antioxidante (AAO) e teor proteico de diferentes cultivares de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado, bem como avaliar CFST e AAO de infusões de arroz cru. A AAO foi determinada a partir da concentração de CFST e expressa em diferentes unidades. Os resultados mostraram diferença na quantidade de CFST e AAO (g grão/g DPPH) entre as cultivares de arroz analisadas (intra grupo cru e intra grupo cozido) com destaque para o arroz preto e vermelho. Após o cozimento, houve diferença nos grãos de arroz vermelho e marrom-claro quanto aos teores de CFST e no arroz integral marrom-claro quanto a AAO (g/g DPPH). Quanto à capacidade de sequestro do radical (%Inibição), não houve diferença entre os grãos de arroz vermelho e marrom-claro crus e cozidos e entre os grãos de arroz marrom-claro e polido cozidos. No ensaio de infusões, o arroz vermelho foi o grão de maior liberação de CFST para a água de embebição. Quanto à %Inibição das infusões, houve diferença nos grãos de arroz preto e vermelho quando comparados com os grãos de arroz marrom-claro e polido. Na caracterização proteica, não houve diferença entre as cultivares (intra grupo base úmida e intra grupo base seca), contudo os grãos de arroz preto, vermelho e marrom-claro diferiram quando comparados entre grupos (base úmida vs base seca). O grão de arroz preto foi o que apresentou maior estabilidade dos compostos bioativos sendo menos suscetíveis à degradação térmica. O conhecimento dos potenciais químicos e funcionais dos grãos de arroz permitirá o desenvolvimento de novas possibilidades de utilização desses grãos como veículo de substâncias antioxidantes visando a promoção da saúde.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Rice is a cereal recognized by its functional properties mainly due to the bioactive compounds present in the outer layers of the grain. Although there is great phenotypic variety of rice, most part of has light brown pericarp and can be consumed in the whole or polished form. Researchers have reported that rice can provide nutritional and functional differences related to pigmentation of the pericarp. Therefore, the aim of this study was to analyze the amount of total soluble phenolic compounds (TSPC), antioxidant activity (AOA) and protein content of different rice cultivars with pigmented and non-pigmented pericarp and evaluate TSPC and AOA raw rice infusions. The AOA was determined from the concentration of TSPC and expressed in different units. The results showed differences in the quantity of TSPC and AOA (g/g DPPH) between the analyzed rice cultivars (raw and cooked intragroup) with emphasis on the black and red rice. After cooking, red and light brown rice differed in levels of TSPC and light brown rice in the AOA (g/g DPPH). Regarding the capacity to radical sequester (%Inhibition), there was no difference between the red and light brown rice, cooked and raw, and between cooked light brown and polished rice. In infusions, red rice was the one with most released TSPC to soaking water. As to %Inhibition of infusions, there were differences in the black and red rice compared to the light brown and polished rice. In protein characterization, there was no difference between cultivars (dry and wet basis intragroup), however black, red and light brown grains differed when compared between groups (dry vs wet basis). The black rice showed stability of bioactive compounds such as less susceptibility to thermal degradation. The knowledge of the chemical and functional potential of the rice will allow the development of new possibilities using these grains as means for antioxidants aimed to health promotion.

Keywords: *Oryza sativa*. Phenolic compounds. Antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte longitudinal de um grão de arroz.....	18
Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.....	22
Figura 3 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin- Ciocalteu.....	24
Figura 4 - Estabilização do radical livre DPPH•.....	28
Figura 5 - Cubetas com solução de DPPH• 0,06mM antes da estabilização (cor violeta) e depois da estabilização (cor amarela) do radical.....	29
Figura 6 - Curva padrão de ácido gálico 0,28mg/mL.....	35
Figura 7 - Curva de calibração de DPPH• 0,06mM.....	36
Figura 8 - Curva de calibração de trolox 2mM.....	39
Figura 9 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico e aquoso de arroz preto (IAC 600) com os três sobrenadantes juntos (3S).....	43
Figura 10 - Quantidade de compostos fenólicos solúveis totais em extrato metanólico de arroz preto (IAC 600) e branco polido (IRGA 426-P) com os três sobrenadantes juntos (3S).....	44
Figura 11 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato aquoso e metanólico de arroz preto (IAC 600) no 1º, 2º e 3º sobrenadante.....	45
Figura 12 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado submetidos ou não à cocção. Barra de erro indica o desvio padrão de triplicata com duas repetições.....	47
Figura 13 - Quantidade de DPPH remanescente de grãos de arroz cru e cozido. A: IAC 600, B: MNA 902, C: IRGA 426-I e D: IRGA 426-P.....	52
Figura 14 - A: concentração de compostos fenólicos solúveis totais da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C), B: atividade antioxidante da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C). Barra de erro indica o desvio padrão de triplicata com duas repetições.....	55
Figura 15 - Quantidade de DPPH remanescente da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C) durante 120 minutos de cinética.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico e aquoso de arroz preto (IAC 600) com os três sobrenadantes juntos (3S).....	42
Tabela 2 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico de arroz preto (IAC 600) e branco polido (IRGA 426-P) com os três sobrenadantes juntos (3S).....	44
Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato aquoso e metanólico de arroz preto (IAC 600) no 1º, 2º e 3º sobrenadante.....	45
Tabela 4 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de grãos de arroz cru e cozido.....	46
Tabela 5 - Atividade antioxidante (g/g DPPH) de grãos de arroz cru e cozido.....	49
Tabela 6 - Valores de EC <sub>50</sub> (mg/L) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.....	50
Tabela 7 - Atividade antioxidante (mmol ET/100g) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.....	51
Tabela 8 - Atividade antioxidante (%Inibição e %DPPH <sub>R</sub> ) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.....	51
Tabela 9 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C) e atividade antioxidante (%Inibição e %DPPH <sub>R</sub> ).....	54
Tabela 10 – Quantidade de proteína bruta de cultivares de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado.....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.2 Objetivos .....	15
<b>1.2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
2.1 Estrutura e beneficiamento do grão .....	17
2.2 Compostos fenólicos.....	20
<b>2.2.1 Método de Folin-Ciocalteu .....</b>	<b>24</b>
2.3. Capacidade antioxidante.....	25
<b>2.3.1 Método do DPPH•.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MEDOTOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
3.1 Material experimental.....	31
3.2 Beneficiamento dos grãos de arroz.....	31
3.3 Cozimento dos grãos de arroz .....	32
3.4 Obtenção de extrato aquoso e metanólico.....	32
3.5 Extrato aquoso de arroz cru e cozido.....	33
3.6 Infusões de grãos de arroz cru .....	33
3.7 Compostos fenólicos do arroz.....	34
3.8 Atividade antioxidante do arroz.....	35
3.9 Análise de nitrogênio total e conteúdo proteico.....	39
3.10 Análise estatística .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1 Padronização das metodologias analíticas .....	42
4.2 Teores de CFST e AAO: arroz cru e cozido.....	46
4.3 Teores de CFST e AAO: infusão de grãos de arroz cru.....	53
4.5 Teores de proteína bruta: arroz cru.....	57
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma espécie de ciclo anual pertencente a família das poáceas (*Poaceae*), classificada no grupo de plantas com sistema fotossintético C3, e adaptada ao ambiente aquático. (SOSBAI, 2010). Os ecótipos de arroz cultivados no mundo pertencem principalmente a dois tipos: *Oryza glaberrima* L., limitado a África Ocidental, e *Oryza sativa* L., mais comum na Ásia e na Europa. *Oryza sativa* L. tem duas subespécies principais: *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, consumido principalmente no Sudeste da Ásia, Japão, Europa e Estados Unidos e *Oryza sativa* L. ssp. *indica*, que é consumido principalmente na Índia e sul da China. (BORDIGA et al., 2014). É uma gramínea cultivada e consumida em todos os continentes, sendo que o Asiático tem a maior concentração, com destaque para China, Índia, Indonésia, Vietnã e Tailândia, responsáveis por 30,2%, 21,3%, 8,2%, 5,6% e 4,5% da produção mundial, respectivamente. (EPAGRI, 2011).

Esse cereal se destaca pela produção e área de cultivo, além de desempenhar um papel estratégico tanto no aspecto social quanto econômico. (EPAGRI, 2011). Quanto ao aspecto social, a importância do arroz é representada pela possibilidade de ser cultivado tanto em pequenas como em médias e grandes áreas, o que permite a utilização do arroz como alternativa para geração de renda e empregos tanto pela agricultura familiar como pela empresarial. Quanto ao aspecto econômico, uma possibilidade de ampliação desse potencial relacionado à exploração de terras de várzea é o uso da rotação de culturas, com apoio das estruturas de irrigação e drenagem já implantadas para a cultura de arroz irrigado. (SOSBAI, 2010).

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. (EMBRAPA, 2005). O oitavo levantamento de safra de arroz realizado pela Conab (2014) aponta um crescimento de 1,1% na área plantada brasileira, saindo de 2,399,6 mil para 2.425,3 mil hectares. Para a atual safra brasileira 2013/2014 de arroz, a produção média deverá ser 6,9% superior em relação à safra anterior, atingindo 12.632,3 mil toneladas. Esse aumento de produção ocorre principalmente devido às boas condições de plantio e à expansão de área em função do elevado patamar de preços do grão que estão superando os custos de produção. Nesse contexto, o estado do Rio Grande do Sul

se destaca com 66,16% da produção brasileira de arroz e 45,91% do total de área plantada do grão no país. Dessa forma, podemos entender a grande importância para o estado do Rio Grande do Sul, que é o maior produtor brasileiro de arroz, conhecer de forma completa as características de suas cultivares, não só pelos aspectos agrônômicos, como também pela composição química do grão, aspectos nutricionais e funcionais, compreendendo e relacionando os seus potenciais benefícios para a saúde humana.

O arroz é considerado pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) como um dos alimentos mais importantes para a segurança alimentar do mundo, pois além de fornecer um excelente balanceamento nutricional, é uma cultura extremamente rústica, podendo ser considerada a espécie de maior potencial para o combate da fome no mundo. Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a média anual de consumo de arroz por habitante no Brasil foi de 26,5 quilogramas por habitante (kg/hab) em 2011. Ainda, o arroz é considerado o principal componente da dieta básica da população mundial e possui grande importância nutricional e, em função disso, aspectos relacionados à sua produção devem ser continuamente avaliados para que o seu suprimento seja garantido ao longo dos anos.

De acordo com *Dietary Guidelines for Americans* (2010), aumentar a ingestão de grãos integrais, legumes, frutas, particularmente aqueles com alto teor de fibra, pode proteger contra o ganho de peso corporal em comparação aos adultos que comem menos cereais integrais. Embora o total de calorias consumidas seja importante para o equilíbrio calórico e controle de peso, é importante considerar os nutrientes e outras propriedades saudáveis intrínsecas dos alimentos na alimentação. No caso dos carboidratos, a recomendação é que a fonte de consumo seja aquela oriunda de cereais integrais limitando o consumo de grãos refinados.

Na sua forma natural, o arroz é um alimento rico em carboidratos, mas pode ser também uma importante fonte de proteínas, fósforo, ferro, cálcio e vitaminas, além de ser considerado uma excelente fonte de energia e nutrientes fazendo parte de uma dieta saudável. (HEINEMANN et al., 2005). Segundo a FAO, o arroz fornece 20% da energia e 15% de proteínas necessárias ao homem se destacando pela sua digestibilidade. Pelo fato de ser um produto de origem vegetal, o arroz é um alimento isento de colesterol e com baixo teor de gordura. Embora o teor de proteína no arroz

seja um dos menores quando comparado ao teor de outros cereais, a composição de aminoácidos das proteínas do arroz é significativamente mais balanceada e apresenta uma das maiores concentrações de lisina. (JULIANO, 1993).

O consumo alimentar do arroz ocorre basicamente na forma de grãos inteiros, sofrendo pequena transformação na agroindústria. No Brasil, esse cereal é consumido principalmente na forma de arroz polido, arroz parboilizado e arroz integral (SUJATHA; AHMAD; BHAT, 2004) e a sua composição nutricional sofre variações em função das diferentes formas de processamento antes de ser oferecido ao consumidor. As vitaminas e sais minerais desse cereal estão concentrados na sua película e germe, e a remoção dessas camadas, durante o processo de beneficiamento, causa uma grande redução do seu valor nutricional, pois o endosperma é formado basicamente por amido. (AMATO; CARVALHO; SILVEIRA FILHO, 2002).

O arroz normalmente cultivado para consumo é o que apresenta pericarpo marrom-claro, mas também existem grãos com pericarpo vermelho e preto. A forma mais conhecida dos grãos de pericarpo vermelho e preto é a espontânea, considerada uma planta daninha pelos prejuízos ocasionados na lavoura devido a competição por água, luz e nutrientes, afetando o desenvolvimento do arroz tradicionalmente cultivado. Entretanto, os grãos de pericarpo pigmentado são utilizados na alimentação em diversos países, principalmente nos Asiáticos como também no Nordeste do Brasil, onde o consumo de arroz vermelho é um hábito alimentar local. Devido essa utilização pela população, nos últimos anos os programas de melhoramento genético vêm desenvolvendo pesquisas para obter genótipos melhorados, ampliando a disponibilidade desses grãos para consumo humano. (WALTER, 2009; WALTER; MARCHESAN, 2011; WALTER et al., 2013).

Estudos relatam que a coloração do pericarpo dos grãos, uma das principais características que os diferenciam visualmente, está vinculada ao acúmulo de compostos fenólicos. Os polifenóis têm sido relacionados a efeitos benéficos à saúde como as propriedades antioxidantes, potencial efeito antiproliferativo de células de leucemia, colo do útero e cancro do estômago, além de efeito imunomodulador. (CHEN et al., 2012). Ácidos felúrico, p-cumárico e siríngico estão presentes tanto nos grãos de arroz branco como nos grãos de pericarpo vermelho e preto. (SHAO et al., 2014a). Ainda, numerosos estudos têm mostrado que os

compostos fenólicos em frutas, vegetais e grãos de cereais, incluindo o arroz, estão significativamente associados a um risco reduzido de desenvolver doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer. (LIU, 2007; YAWADIO; TANIMORI; MORITA, 2007). Além disso, a eliminação de radicais livres pelos fitoquímicos bioativos, como os compostos fenólicos que são ricos nos grãos integrais, pode ser um mecanismo pelo qual esses grãos possuem os efeitos protetores. (MIN et al., 2012).

O arroz preto ou negro, conhecido por ser um grão exótico, contém muitos componentes benéficos, incluindo os polifenóis, flavonoides, vitamina E, ácido fólico,  $\gamma$ -orizanol (ICHIKAWA et al., 2001; NAM; NAM; KANG, 2008), carboidratos, óleos, proteínas, fibras, cobalto, vitaminas A, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, pró-vitaminas C e E. (BASSINELLO et al., 2008). Efeitos protetores desses compostos estão relatados na literatura, como a investigação por Ling, Wang e Ma (2002), em que uma suplementação dietética com o pigmento do arroz preto diminuiu a formação de placas ateroscleróticas em coelhos.

O arroz vermelho possui substâncias antioxidantes denominadas proantocianidinas que estão principalmente distribuídas no farelo (OKI et al., 2002). Quimicamente, as proantocianidinas são compostos fenólicos constituídos principalmente de catequina, epicatequina, galocatequina e unidades de epigalocatequina. (CHEN et al., 2012). Essa substância é responsável pela alta digestibilidade e ação antioxidante, sendo capaz de reduzir a formação de placas ateroscleróticas, um fator de risco associado a doenças cardiovasculares, atuando ainda como importante repelente contra alguns patógenos e predadores da própria cultura do arroz. (SWEENEY et al., 2006).

Em relação ao arroz integral de pericarpo marrom-claro, sabe-se que a quantidade de fibras dietéticas é quatro vezes superior em comparação ao arroz branco polido (BENNO et al., 1986), e pesquisas têm mostrado que algumas das fibras, como arabinoxilano e  $\beta$ -glucano, são consideradas substratos para o crescimento de bactérias benéficas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. (CHARALAMPOPOULOS et al., 2002). Ainda, recentes estudos mostraram a relação entre a composição da microbiota intestinal com a obesidade e diabetes, sugerindo que os efeitos antiobesidade e antidiabéticos de arroz integral estão relacionados com o perfil e a atividade da microbiota intestinal. (TREMAROLI; BACKHED, 2012).

Vários estudos têm sido conduzidos para verificar a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante de chás e ervas, mas a ênfase tem sido atribuída a compostos fenólicos solúveis em solventes orgânicos. Pouco se sabe sobre os perfis fenólicos e atividade antioxidante em infusões preparadas com água (TRANTAPHYLLOU; BLEKAS; BOSKOU, 2001) e nenhum estudo, até o momento, observou essa relação em infusões obtidas a partir de grãos de arroz com pericarpo pigmentado. Nesse contexto, diante da importância do arroz na nutrição de grande parte da população e devido à falta de dados em relação ao efeito do tratamento térmico no conteúdo de compostos fenólicos de diferentes cultivares de arroz, torna-se importante desenvolver um estudo abordando esse aspecto, uma vez que os trabalhos ainda são muito limitados sobre a capacidade antioxidante e demais atividades biológicas dos grãos de arroz cozido.

As determinações de compostos fenólicos totais em alimentos produzidos no Brasil são essenciais para identificar os principais alimentos-fonte de compostos bioativos e estimar sua ingestão pela população. (FALLER; FIALHO, 2009). Logo, a quantificação do teor de polifenóis em arroz gera conhecimento científico sobre a composição do grão e seus potenciais benefícios na prevenção de doenças, além de reforçar a importância do consumo desse cereal. Portanto, destaca-se a importância do Rio Grande do Sul, maior produtor brasileiro de arroz, conhecer de forma completa as características funcionais de diferentes cultivares de arroz, uma vez que o mercado está cada vez mais crescente com a abordagem dos alimentos funcionais e nutracêuticos.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar bioquimicamente diferentes cultivares de arroz, com pericarpo pigmentado e não pigmentado.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

a) Analisar a quantidade de compostos fenólicos solúveis totais dos grãos de arroz de pericarpo pigmentado e não pigmentado que foram submetidos ou não à cocção;

b) analisar a capacidade antioxidante de diferentes cultivares de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado que foram submetidos ou não à cocção;

c) analisar a quantidade de compostos fenólicos solúveis totais na infusão dos grãos de arroz de pericarpo pigmentado e não pigmentado;

d) analisar a capacidade antioxidante da infusão dos grãos de arroz de pericarpo pigmentado e não pigmentado;

e) quantificar o teor de proteína total dos grãos de arroz de pericarpo pigmentado e não pigmentado cru.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Estrutura e beneficiamento do grão

Morfologicamente, a semente do arroz é idêntica ao grão comercial, entretanto, semente é aquela produzida com a finalidade de plantio, sob cuidados especiais e obedecendo a normas técnicas, procedimentos e padrões estabelecidos pela legislação. (EMBRAPA, 2006). Considerado um fruto indeiscente, isto é, que não se abre, e que está totalmente ligado ao pericarpo, o grão de arroz é o ovário maduro fecundado (BOTTINI, 2008), sendo constituído pelos tecidos de cobertura externa (casca) e núcleo interior (cariopse). A casca é composta por duas folhas modificadas, a pálea (parte ventral) e a lema (parte dorsal). (JULIANO, 2003).

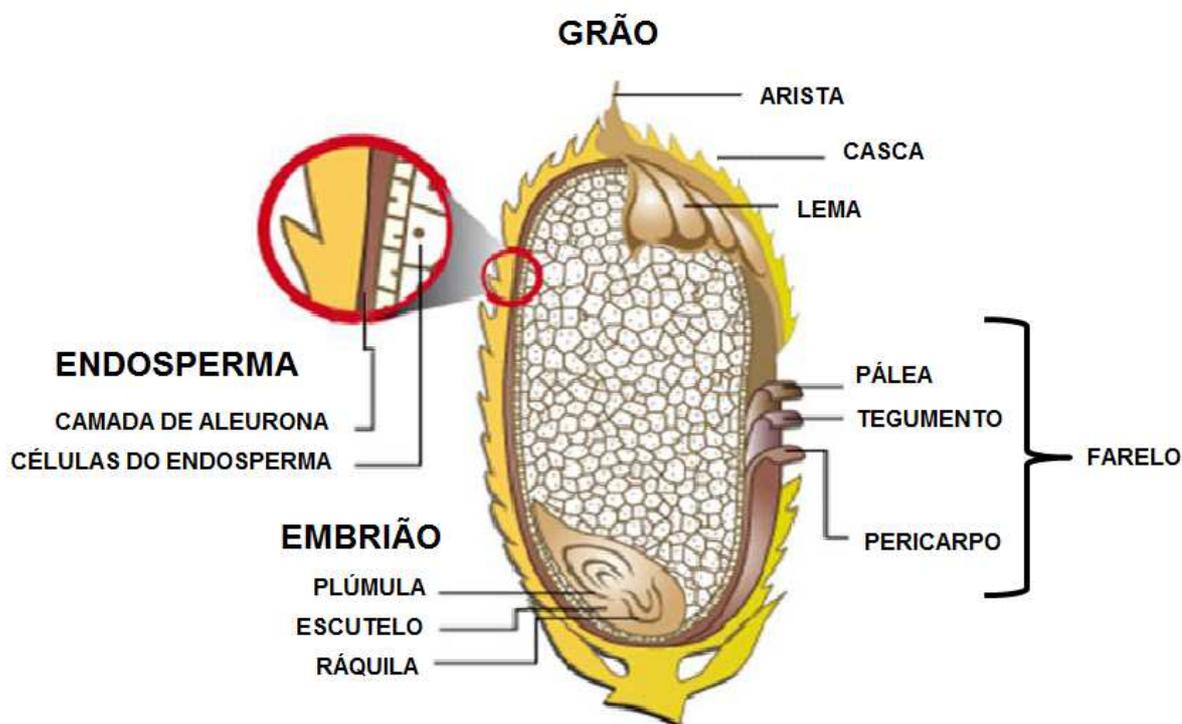
A cariopse, vulgarmente conhecida como grão, é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, tegumento e camada de aleurona. (Figura 1). O pericarpo (1 a 2% da massa do grão integral) é composto pelo epicarpo (formado por seis ou sete camadas de textura esponjosa, de células parenquimatosas parcialmente destruídas), mesocarpo, camada média, testa e exosperma (MATSUO; HOSHIKAWA, 1993) e, é no pericarpo principalmente que estão localizados os polifenóis responsáveis pela pigmentação do grão sendo a maior parte removida com o beneficiamento. (TIAN; NAKAMURA; KAYAHARA, 2004). O tegumento é uma camada protetora que delimita a semente e serve como barreira à entrada de microrganismos, além de proteger a semente contra choques e abrasões. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos proteicos) e os corpos lipídicos. Já no lado ventral na base do grão, encontra-se o embrião ou gérmen, que é rico em proteínas e lipídios. A maior parte do grão é formada pelo endosperma (89 a 94% do arroz integral), constituído por células ricas em grânulos de amido e alguns corpos proteicos. (JULIANO; BECHTEL, 1985).

O conteúdo de proteínas no arroz é em média 7%, entretanto, observa-se uma grande variação com valores entre 4,3 e 18,2% que pode ser afetada por características genóticas, adubação nitrogenada, radiação solar e temperatura durante o desenvolvimento do grão. (JULIANO; BECHTEL, 1985). As proteínas presentes no grão (endosperma e embrião) são classificadas como de reserva, e

são acumuladas em grandes quantidades durante o desenvolvimento da semente. (SILVEIRA et al., 2010). As proteínas no arroz estão divididas em quatro frações principais, de acordo com a solubilidade: albuminas, solúveis em água; globulinas, solúveis em sais; prolaminas, solúveis em álcool; e glutelinas, solúveis em soluções ácidas ou básicas (SHOTWELL; LARKINS, 1989; SILVEIRA et al., 2010) e são consideradas produtos de valor agregado em função da quantidade de aminoácidos essenciais como a lisina, além de possuir características hipoalergênicas e hipocolesterolêmicas (CHEN et al., 2013; CHANDI; SOGI, 2007).

Através do beneficiamento, os grãos de arroz são submetidos à retirada da casca (20 – 22% do peso total) obtendo-se o arroz integral. (CASTRO et al., 1999). Essa operação será mais eficaz se não for realizada logo após a colheita e secagem do cereal, pois pesquisas têm demonstrado que o comportamento do arroz, tanto no processamento quanto no cozimento, melhora com a armazenagem. (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2007).

Figura 1 – Corte longitudinal de um grão de arroz.



Fonte: Adaptado de Encyclopedia Britannica (2014).

Em seguida, o grão de arroz integral passa pelas etapas de brunição (conhecido como branqueamento) e é completada com a etapa do polimento, cujo processo ocasiona a perda das camadas de pericarpo, aleurona, subaleurona, embrião e um pouco do endosperma, restando apenas o endosperma amiláceo, comumente conhecido como arroz branco. (CASTRO et al., 1999). As frações que são perdidas com o polimento formam o farelo, que compreende 6 a 10% do peso do grão integral. O objetivo do polimento é melhorar a aparência e o sabor do arroz, contudo ocasiona fatores negativos do ponto de vista nutricional, visto que através desse processo são perdidas parte de minerais, fibra dietética e vitaminas (MATSUO; HOSHIKAWA, 1993; JAVIER, 2004) sendo, então, removidas cerca de 80% da tiamina, 70% da riboflavina e 68% da niacina. (JAVIER, 2004).

Os grãos, ainda, também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico seguido de resfriamento e lenta secagem, através do qual se obtém o arroz parboilizado, podendo ser consumido na forma integral ou polido. (JULIANO; BECHTEL, 1985). O termo é derivado da expressão em inglês *partial* (parcial) e *boiled* (cozido), também denominado de pré-cozimento. É um processo que foi criado com o objetivo de aumentar a renda no beneficiamento, reduzir a adesividade do arroz, esterilizar o grão e aumentar a vida de prateleira. (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2007). Esse processo deixa o endosperma mais duro, sendo necessária maior pressão durante o polimento. Além disso, os grãos ficam menos viscosos, mais soltos e menos sujeitos a desintegração. (JULIANO, 1993). Trabalhos demonstram que o arroz parboilizado apresenta um valor nutricional superior em relação ao arroz polido, principalmente devido à retenção de minerais e vitaminas solúveis em água. Teoricamente, a maior retenção de micronutrientes em arroz parboilizado tem sido atribuída à sua solubilização e migração para o centro do grão, além de sua configuração durante o processo de gelatinização do amido. (AMATO; CARVALHO; SILVEIRA FILHO, 2002).

Nesse contexto, essas são as três principais formas que o arroz beneficiado é consumido: branco, integral e parboilizado. Tendo em vista que o arroz é constituído principalmente por amido, tem-se observado que a composição do grão está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, manejo da cultura, processamento e armazenamento dos grãos (ZHOU et al., 2002), produzindo grãos com características diferenciadas. Embora o arroz mais consumido seja na forma polida,

principalmente no Brasil, há uma crescente tendência pelo consumo de arroz integral em função de suas propriedades funcionais assim como pelas reivindicações de saúde nutricional, uma vez que os compostos bioativos não estão distribuídos uniformemente no grão e sim concentrados no farelo, seja ele com pigmentação ou não.

## **2.2 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são um grupo de substâncias químicas incluindo uma grande diversidade de estruturas simples e complexas presentes em plantas e produtos de origem vegetal. Podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos incluindo seus grupos funcionais. (MALACRIDA; MOTTA, 2005). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal, no entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático. Então, esses compostos são produzidos em pequena quantidade pelos mesmos, que utilizam o anel benzênico de substâncias presentes na dieta alimentar. Por outro lado, os vegetais e a maioria de microrganismos possuem a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e a partir dele, principalmente os compostos fenólicos. (SIMÕES et al., 2003).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados apenas como produtos de excreção dos vegetais, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Entretanto, sabe-se, atualmente, que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas na defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra os raios ultravioleta (UV), atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes. (SIMÕES et al., 2003). Diversas funções plausíveis e claramente funcionais para alguns destes compostos têm sido documentadas como: a) coloração das flores que atrai os animais polinizadores; b) proteção contra a radiação UV prejudicial; c) intimidação para animais de pasto e insetos em função de sua adstringência; d) fornecimento de um mecanismo de aprisionamento para os insetos que se alimentam; e) resistência aos agentes patogênicos e f) compostos voláteis que afetem o crescimento de outras plantas vizinhas. (BECKMAN, 2000).

Esses compostos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal ou ainda podem estar relacionados com a ocorrência desses compostos no Reino Vegetal. Assim, podem ser divididos em: a) compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização (taninos e ligninas); b) compostos fenólicos de distribuição restrita, abrangendo outras classes de substâncias. (SIMÕES et al., 2003). Estudos associam os compostos fenólicos com a atividade antioxidante e, dentre os compostos com capacidade antioxidante, destacam-se os flavonoides, que podem ser encontrados em uma ampla diversidade de alimentos, tais como maçã, amora, cereja, uva, framboesa, frutas cítricas, cebola, espinafre, pimenta, aveia, trigo, chá preto, vinho, entre outros. (HOLDEN et al., 2005; DIMITRIOS, 2006). A atividade antioxidante desses compostos é, principalmente, em função de suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na neutralização de diferentes espécies de radicais livres. (FINOCCHIARO et al., 2007).

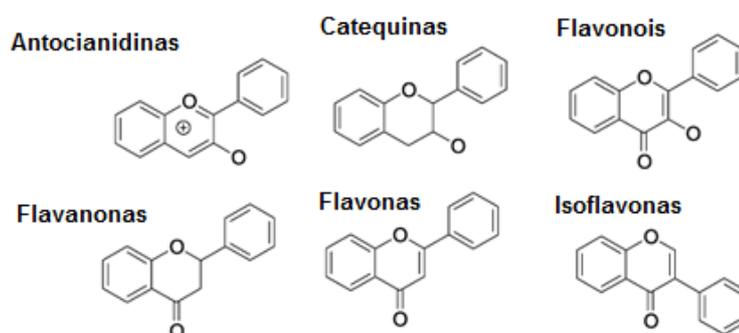
Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos e distribuídos de metabólitos secundários de plantas, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas. (SOOBRAATTEE et al., 2005). Os polifenóis naturais podem variar a partir de moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) até os compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos), sendo o subgrupo dos flavonoides o mais comum e amplamente distribuído. (BRAVO, 1998). Geralmente os compostos fenólicos são subdivididos em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos. No arroz integral, os principais compostos fenólicos pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos e flavonoides. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e pelo menos uma hidroxila e/ou metoxila na molécula, e são encontrados no farelo remanescente do grão integral podendo estar na forma livre e conjugada (solúvel) ou esterificada aos componentes da parede celular (insolúvel). (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares (BECKMAN, 2000) e estão na forma livre ou conjugada, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes

pécticos ou hemicelulósicos. (FAULDS; WILLIAMSON, 1999). Os ácidos fenólicos livres são solúveis em soluções aquosas-orgânicas, tais como metanol, etanol ou acetona, e representam a menor parte dos compostos fenólicos. Já os compostos fenólicos conjugados incluem compostos de baixo peso molecular e solúveis em água, presentes no citosol, ou em formas lipossolúveis, que são associadas às ceras presentes na superfície da planta. (KARAKAYA, 2004). Em grãos de arroz com pericarpo não pigmentado, os compostos fenólicos solúveis contribuem com cerca de 60% do total de compostos fenólicos, enquanto que nos grãos de pericarpo pigmentado, devido à presença de grande quantidade de flavonoides, a contribuição corresponde aproximadamente 80%. (MIRA et al., 2009).

Os flavonoides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal e estão presentes em diversas partes dos vegetais concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001) nas formas de glicosídeos ou agliconas. De forma geral, são compostos de baixo peso molecular, consistindo em quinze átomos de carbono, organizados na disposição C6-C3-C6. A estrutura química básica dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono (difenílpropano) que formam um anel heterocíclico oxigenado. A substituição desse anel heterocíclico oxigenado padrão resulta em importantes classes de flavonoides, como flavonois, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanois (catequinas e proantocianidinas). (HOLLMAN; KATAN, 1999). (Figura 2). São metabólitos secundários de plantas que exercem funções de desenvolvimento e fisiológicas importantes (TAYLOR; GROTEWOLD, 2005) para a biologia da planta e nutrição humana. (BRUCE et al., 2000).

Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.



Fonte: Adaptado de Março, Poppi e Scarminio (2008).

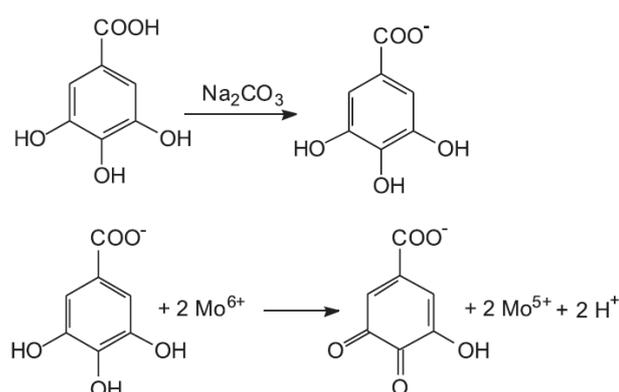
No arroz preto, a maioria dos flavonoides são as antocianinas e em algumas cultivares, proantocianidinas também podem ser encontradas. No arroz vermelho, os flavonoides mais abundantes são as proantocianidinas com diferentes graus de polimerização, seguido por quantidades variáveis de antocianinas. (MASSARETTO et al., 2011). O arroz, além do  $\gamma$ -orizanol e homólogos da vitamina E, contém uma gama de compostos fenólicos, que complementam aqueles consumidos através de frutas e vegetais. Diversos compostos fenólicos já foram identificados, destacando-se no arroz integral de pericarpo não pigmentado (marrom claro) os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos ferúlico e *p*-cumárico. (ZHOU et al., 2004). Já nas cultivares de pericarpo pigmentado (preto e vermelho) predominam as antocianinas e proantocianidinas, pertencentes ao grupo dos flavonoides que são responsáveis pela coloração dos grãos. (FINOCCHIARO et al., 2007).

Além de suas já conhecidas funções nos vegetais, trabalhos mostram o efeito benéfico na saúde humana de compostos fenólicos de diferentes fontes, inclusive do arroz. Esse efeito ocorre em função de sua ação antioxidante que pode auxiliar na prevenção de danos celulares e doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, envelhecimento, diabetes, câncer (XIA et al., 2003; HYUN; CHUNG, 2004) e hipertensão (CHEN et. al, 2013). Recentemente, maior atenção tem sido dada ao farelo de arroz vermelho e preto devido às elevadas quantidades de compostos fenólicos, incluindo antocianinas e proantocianidinas. Entretanto, há grande variação no conteúdo de compostos fenólicos encontrado em diferentes cultivares, ou até entre as mesmas cultivares avaliadas por diferentes estudos. Essas diferenças podem ser em função da complexidade desses compostos, dos métodos de extração ou da própria metodologia empregada para quantificação dessas substâncias. Além disso, o conteúdo de polifenóis de vegetais depende de fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (condições ambientais, de cultivo, de manejo e de armazenamento). (TOMÁS-BARBERAN; ESPÍN, 2001). Mesmo assim, todas essas substâncias têm recebido atenção pelos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde humana.

### 2.2.1 Método de Folin-Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de métodos; contudo, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é o mais empregado. (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; DASTMALCHI et al., 2007). Esse reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, na qual o molibdênio se encontra em estado de oxidação (cor amarela no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); porém, em presença de certos agentes redutores, como por exemplo os compostos fenólicos, ocorre a formação dos chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ , cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A Figura 3 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos. Dessa forma, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente Folin, na qual, o molibdênio sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Quanto maior for o conteúdo de compostos fenólicos, maior será a intensidade da coloração azul.

Figura 3 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin- Ciocalteu.



Fonte: Oliveira et al. (2009).

Os resultados que são encontrados durante as análises devem ser interpolados em uma curva de calibração como, por exemplo, o padrão ácido gálico, sendo os resultados expressos como equivalentes de ácido gálico. (PÉREZ-

JIMÉNEZ, 2007). Existe diferentes formas de expressar esse resultado, como equivalentes de catequina, ácido clorogênico, caféico, protocateico, vanilínico ou ferrúlico, o que dificulta muito a comparação dos resultados. No método original, a reação era medida a 745-750nm, mas o comprimento de onda utilizado para as análises do presente estudo foi 765nm, conforme descrito por Folin e Ciocalteu (1927) e Moyer et al. (2002).

### **2.3. Capacidade antioxidante**

O termo antioxidante pode ser definido de múltiplas formas por diversos autores. De acordo com Halliwell et al. (1995), antioxidantes são substâncias que em pequenas concentrações, comparado ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. Outra definição do termo seria qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo na molécula alvo. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A origem dos antioxidantes vem desde a antiguidade, e particularmente, o conhecimento técnico dos antigos Egípcios foi notável na preservação de cadáveres, em parte devido ao uso de extratos vegetais obtidos a partir de plantas ricas em polifenóis. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Quando Harman e Eddy (1979) propuseram que o envelhecimento era o resultado de mudanças progressivas causadas por danos acumulativos de radicais livres, imediatamente levantou-se a possibilidade de que as moléculas antioxidantes poderiam retardar o processo de envelhecimento e prolongar a vida do ser humano. No entanto, isso tem sido difícil de ser aplicado pois, provavelmente, os antioxidantes estão sendo utilizados na alimentação humana para corrigir uma deficiência relacionada ao hábito alimentar. Dessa forma, acredita-se que esses experimentos foram os que nortearam as primeiras ideias nas mentes dos cientistas e do público em geral de que os antioxidantes poderiam ser a "fórmula da juventude", que todos estavam buscando. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; GRUBER; SCHAFFER; HALLIWELL, 2008).

Assim, torna-se importante destacar que as células do organismo humano estão expostas continuamente a situações oxidantes e que a produção de radicais livres faz parte do metabolismo normal, como também o organismo produz

compostos antioxidantes que participam da manutenção do balanço oxidativo. (HEIM et al., 2002). O desequilíbrio desse balanço é chamado estresse oxidativo e resulta em alterações nas células e tecidos de várias formas: danificando biomoléculas, originando produtos tóxicos, alterando a expressão gênica e atividade de enzimas (STANNER et al., 2004) e ocasionando a ruptura de membrana levando à morte celular. (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Por esses motivos, o estresse oxidativo tem sido relacionado a diversas doenças crônicas, incluindo problemas cardiovasculares, diabetes, câncer (STANNER et al., 2004), danos causados às moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico), envelhecimento, patologias como o mal de Alzheimer, artrite reumatoide, síndrome metabólica e processos neurodegenerativos. (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005). Desse modo, considera-se que os antioxidantes estão de encontro ao processo de envelhecimento orgânico, contribuindo para que a população envelheça de forma mais saudável.

As substâncias antioxidantes podem ser classificadas como depressoras de radicais livres, quelantes de íons metálicos ou sequestrantes de oxigênio. Além disso, podem atuar na redução dos radicais livres (antioxidante primário) ou por outro mecanismo que não envolva a redução direta dos radicais livres (antioxidante secundário). (CAVA, 2007). Os antioxidantes primários, como por exemplo os compostos fenólicos, atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Alguns componentes naturais dos alimentos agem como antioxidantes primários e são comumente adicionados no desenvolvimento de produtos alimentícios. Dentro dessa ação oxidativa, os antioxidantes primários serão consumidos no meio reacional durante a fase de iniciação atuando na remoção dos radicais livres do organismo. Já os antioxidantes secundários podem atuar através de uma série de mecanismos, incluindo a ligação com íons metálicos, reduzindo ou retardando a taxa de iniciação da oxidação por sua ação no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos (GIADA, 2014) ou pela desativação do oxigênio singlete. (MELO; GUERRA, 2002).

Os antioxidantes também podem ser classificados como antioxidantes não enzimáticos (exógenos) e enzimáticos (endógenos). Os exógenos são aqueles compostos que são sintetizados pelo organismo humano (hormônios sexuais,

melatonina, ácido úrico) ou ingeridos através da dieta regular ou via suplementação (tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides, polifenóis). Já dentro do grupo de antioxidantes endógenos estão inseridas as enzimas como catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). (OLIVEIRA, 2011). Dessa forma, o consumo de antioxidantes se faz necessário a fim de prevenir ou retardar a oxidação de substratos potencialmente oxidáveis, como os lipídios (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004) e, conseqüentemente, reduzir o risco de diversas doenças. Esse fato se deve pela capacidade dessas substâncias de capturar e reativar ou reduzir danos causados pelos radicais livres.

Nesse contexto, sabe-se que os vegetais são ricos em vários tipos de antioxidantes, como vitaminas C e E, alfa-tocoferol, beta-caroteno e compostos fenólicos, os quais constituem a maioria dos compostos com atividade antioxidante. (MOURE et al., 2001). Diversos autores relacionam à saúde derivada do consumo de vegetais e, em grande parte, pelas propriedades biológicas do conteúdo de compostos fenólicos dos alimentos, que incluem atividades antioxidante, antiinflamatória, antihistamínica, antiviral, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, anticariogênica e antimutagênica. (GOMIS; PALOMINO; ALONSO, 2001).

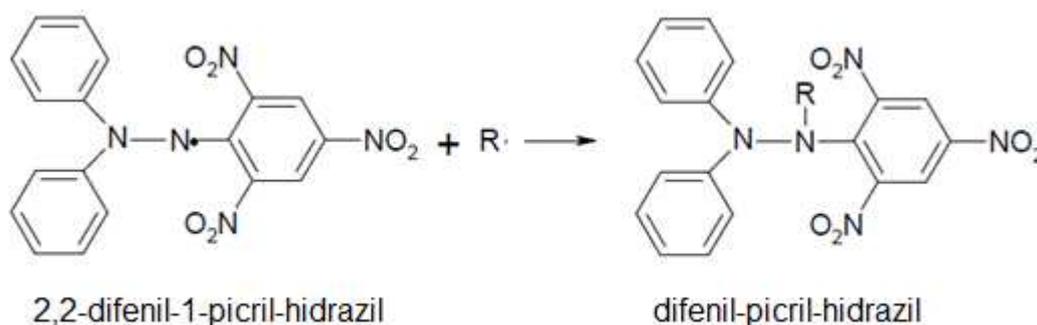
Estudos *in vivo* têm relatado o benefício da utilização dos grãos de arroz devido seu potencial antioxidante, através da administração de um extrato obtido a partir do farelo de arroz em modelo animal. Essa alimentação foi relacionada com a melhora nas alterações associadas com a síndrome metabólica vascular em ratos Zucker. Os autores verificaram que a dieta suplementada com o farelo de arroz melhorou o estado inflamatório característico de gordura visceral, atenuando o aumento de fatores pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (CANDIRACCI et al., 2014), além de melhorar o comprometimento vascular relacionado à obesidade, restaurando a disfunção endotelial através da neutralização do TNF- $\alpha$ . (LUISA JUSTO et al., 2013). Esses benefícios estão fortemente relacionados com a atividade antioxidante do grão de arroz. Portanto, mais pesquisas são necessárias para confirmar o potencial benefício *in vivo* do consumo humano de arroz.

### 2.3.1 Método do DPPH•

O DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico estável que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A molécula de DPPH• é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocalizar-se por toda a sua estrutura. (ALVES et al., 2010). Ainda conforme Neves, Alencar e Carpes (2009), o DPPH• pode ser definido como um radical que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, ser reduzido na presença de um antioxidante.

Esse efeito de ressonância que a molécula de DPPH• apresenta resulta em uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção no comprimento de onda de 515 a 520nm quando em solução de etanol ou metanol. (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004). Na presença de uma substância antioxidante, o DPPH é reduzido perdendo sua coloração violeta para uma coloração amarela, típica do grupo picril (Figura 4). (MOLYNEUX, 2004). Assim, a alteração na coloração violeta característica para amarelo (Figura 5) resulta da captura do radical através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante. (ESPÍN; SOLER-RIVAS; WICHERS, 2000). Portanto, quanto mais rapidamente decresce a absorvância, maior será a atividade antioxidante da amostra analisada, em termos de capacidade doadora de átomos de hidrogênio.

Figura 4 – Estabilização do radical livre DPPH•.



Fonte: Adaptado de Molyneux (2004).

O método do DPPH• foi modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998) que introduziu os seguintes parâmetros cinéticos: o  $EC_{50}$ , que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical; e  $t_{EC50}$ , que é o tempo que essa concentração necessita para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical e a eficiência anti-radical ( $EA = 1/(EC_{50} * t_{EC50})$ ) que leva em consideração os outros dois fatores. (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007). Esse método tem sido exaustivamente utilizado por vários autores, devido principalmente a sua simplicidade, rapidez (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995; ESTEVINHO et al., 2008, FERREIRA et al. 2009) e pela possibilidade de aquisição do radical comercialmente. Dessa forma, esse método tem sido muito utilizado em diversos estudos, o que resulta na diversidade de protocolos seguidos e divergências de resultados interlaboratoriais. (SHARMA; BHAT, 2009).

Figura 5 – Cubetas com solução de DPPH• 0,06mM antes da estabilização (cor violeta) e depois da estabilização (cor amarela) do radical.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados dos testes realizados com o radical livre DPPH• podem ser apresentados de diferentes formas entre os quais estão o  $EC_{50}$ , um dos mais utilizados (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995); porcentagem de descoloração =  $(1 - (\text{absorbância do extrato} / \text{absorbância do branco}) * 100)$  (AK; GULÇIN, 2008); eficiência antiradical ( $AE = 1/EC_{50} * t_{EC50}$ ) (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998); atividade de sequestro de radical ou inibição (%) =  $((\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do$

controle)\*100) (ATMANI et al., 2009), entre outros. Nesse contexto, destaca-se a importância do cuidado na interpretação dos dados e parâmetros para melhor avaliar a atividade antioxidante do alimento em estudo, pois como os resultados têm sido expressos de maneiras distintas, sua comparação tem se tornado cada vez mais dificultada.

A cinética de reação depende da natureza do antioxidante que está sendo testado. São conhecidos três comportamentos cinéticos: rápido, em que os compostos antioxidantes reagem imediatamente com os radicais livres DPPH•, atingindo o estado estacionário em menos de um minuto; intermediário, em que este comportamento ocorre entre 5 e 30 minutos; e lento, em que o tempo necessário para alcançar o estado estacionário se encontra entre 1 e 6 horas. (BRANDWILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). Neste último caso, a determinação da atividade antioxidante dos compostos num intervalo de tempo de até 30 minutos pode comprometer a veracidade dos resultados, pois a reação ainda pode estar progredindo após esse período.

### **3 METODOLOGIA**

O capítulo que segue apresenta a metodologia aplicada nessa pesquisa com a descrição de todos os procedimentos de coleta e análise de dados.

#### **3.1 Material experimental**

Os grãos utilizados no presente trabalho foram adquiridos através do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA). Foram analisadas três cultivares de arroz, com pigmentação e sem pigmentação do pericarpo. São elas: IRGA 426 (polido) e IRGA 426 (integral marrom-claro), desenvolvida pelo IRGA, cultivadas na Estação Experimental do IRGA em Cachoeirinha, RS, safra 2011/2012, denominadas IRGA-P 426 e IRGA-I 426; IAC 600 (preto), desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cultivada na Estação Experimental do IRGA em Cachoeirinha, RS, safra 2009/2010, denominada IAC 600; e EMBRAPA MNA 902 (vermelho), desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA MEIO-NORTE) e cultivada no Campo Experimental da EMBRAPA MEIO-NORTE em Teresina, PI, safra 2012/2013, denominada MNA 902. Os reagentes utilizados foram de grau analítico: Folin-Ciocalteu e azul de metileno (Merck), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Sigma-Aldrich), ácido gálico, hidróxido de sódio e metanol P.A. (Nuclear), carbonato de sódio e vermelho de metila (Vetec Química Fina), ácido sulfúrico (Panreac), ácido bórico (Synth), antiespumante silicone (Proton), sulfato de potássio (Cromoline – Química Fina), sulfato de cobre (Delaware).

#### **3.2 Beneficiamento dos grãos de arroz**

Os grãos avaliados foram de dois tipos diferentes de processamento (integral e polido) submetidos ou não à cocção. Para a obtenção dos grãos integrais vermelhos, os mesmos foram descascados em um Simulador de Beneficiamento de Arroz (Modelo MT 2012/4523-8, Máquinas Suzuki S/A) na Mini Usina de Cereais do Laboratório da Engenharia de Alimentos da UNISINOS. O restante dos grãos (integral preto, integral marrom-claro e polido) foi adquirido já descascado pelo IRGA.

### 3.3 Cozimento dos grãos de arroz

Os grãos foram submetidos à cocção por imersão em panela inox com diferentes proporções grãos/água (p/v) e tempos de acordo com o tipo de grão buscando mimetizar a situação caseira até a completa evaporação da água, no Laboratório de Gastronomia da UNISINOS. Para o arroz polido, a proporção foi de 1/4 (p/v) por aproximadamente 10min; para o arroz integral marrom-claro, a proporção foi de 1/6 (p/v) por aproximadamente 20min; para o arroz integral preto e vermelho, a proporção foi de 1/5 (p/v) por aproximadamente 20min. Posteriormente, os grãos cozidos foram congelados a fim de conservar as características até o momento da preparação dos extratos.

### 3.4 Obtenção de extrato aquoso e metanólico

A extração das amostras foi realizada conforme a metodologia de Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2005) e Walter et al. (2013) com as alterações do Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde (itt Nutrifor). Para a obtenção do extrato metanólico, os grãos de arroz cru foram triturados em moinho (AnalySensmühle A10 Störung Janke & Kunkel - Ika® Labor Technik) durante 1min, e em seguida, um grama de cada amostra foi homogeneizado com 20mL de metanol 80% e agitado por 1h a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R – Eppendorf) por 10min a 3000 x g e o sobrenadante foi separado. Ao resíduo, foi adicionado 20mL de metanol 80% pH 4,0 e realizado o mesmo procedimento de agitação, centrifugação e separação do sobrenadante. Novamente, adicionou-se 20mL de acetona 70% ao resíduo seguindo os mesmos procedimentos e o sobrenadante foi separado, obtendo-se assim três sobrenadantes. Para a obtenção do extrato aquoso, seguiram-se os mesmos procedimentos de agitação, centrifugação e separação do sobrenadante, contudo utilizando apenas água nas etapas obtendo-se, assim, também três sobrenadantes. Os produtos finais foram utilizados nas análises de compostos fenólicos totais (mg EAG/100g) em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device) por cubeta. O experimento de foi conduzido em duplicata, obtendo-se a média desses resultados.

### 3.5 Extrato aquoso de arroz cru e cozido

Os grãos de arroz cru foram triturados em moinho (AnalySensmühle A10 Störung Janke & Kunkel - Ika® Labor Technik) durante 1min, e em seguida, um grama de cada amostra foi homogeneizado com 20mL de água destilada em Agitador Magnético (Athiktechnology – Multitec) por 1h a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (Multi Purpose Centrifuge Combi – 514R) por 20min a 3000 x g (18°C) e o sobrenadante foi separado. Os grãos de arroz cozido foram triturados em moinho sendo posteriormente homogeneizados com 20mL de água destilada seguindo os mesmos procedimentos de agitação, centrifugação e separação do sobrenadante. Os produtos finais foram utilizados nas análises de compostos fenólicos totais (mg EAG/100g) e atividade antioxidante (g grão/g DPPH, mmol ET/100g, %Inibição e %DPPH<sub>R</sub>) em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device) por cubeta. O experimento de compostos fenólicos solúveis totais foi conduzido em triplicata com duas repetições e o experimento de atividade antioxidante em duplicata, obtendo-se a média desses resultados.

### 3.6 Infusões de grãos de arroz cru

As infusões foram obtidas através da embebição de 1,6g (quantidade equivalente ao sachê de chá comercial) de grãos de arroz cru inteiros em 200mL de água deionizada (inicial aquecida a 90°C) durante 12h. A quantidade de grão/água (p/v) foi utilizada conforme consta nas indicações de embalagens comerciais de chás. Posteriormente, essa infusão foi analisada quanto aos teores de compostos fenólicos solúveis totais (mg EAG/100g) e capacidade antioxidante (%Inibição e %DPPH<sub>R</sub>) em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2600) por cubeta. Foi realizada também a cinética com o padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) 0,4mM em conjunto com as amostras. O experimento de compostos fenólicos solúveis totais (mg EAG/100g) foi conduzido em triplicata com duas repetições e o experimento de atividade antioxidante em duplicata, obtendo-se a média desses resultados.

### 3.7 Compostos fenólicos do arroz

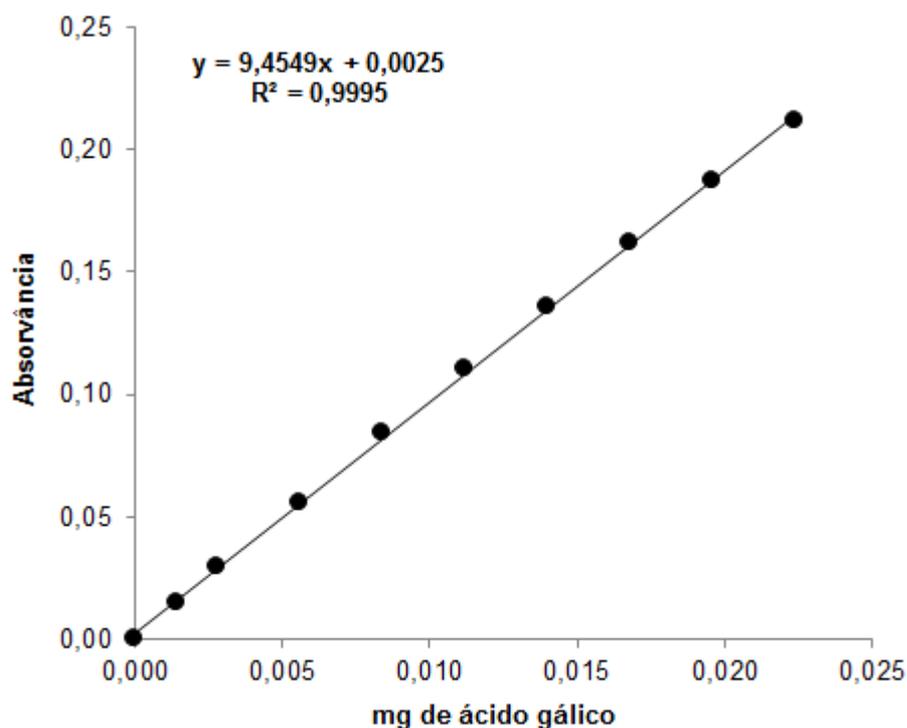
A concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) foi avaliada conforme descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), Walter (2009) e Walter et al. (2013) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 80µL de extrato foi diluída com 2000µL de água destilada, adicionando-se 200µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,25N. Após esse procedimento, aguardou-se 3 minutos antes de adicionar 1000µL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura de reação foi incubada por 2h a 23°C, no escuro, para completar a reação. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device (item 3.4 e 3.5) e UV-2600 Shimadzu (item 3.6)) a 765nm por cubeta. Para o branco, foram utilizados os mesmos reagentes, porém utilizando água (quando aquoso) e metanol (quando metanólico) ao invés de amostra. Para o cálculo da quantidade de compostos fenólicos, uma curva padrão de ácido gálico (Figura 6) foi construída e substituiu-se o valor da absorvância no y na equação da reta encontrando a quantidade em mg de ácido gálico (no volume total da cubeta). Após esse primeiro cálculo, fez-se uma regra de três para encontrar a quantidade de mg de ácido gálico no volume total de extrato obtido:

mg de ácido gálico -----	0,08mL
x	----- 20mL

onde 0,08mL representa a alíquota pipetada de amostra e 20mL é o volume total do extrato aquoso de arroz. Na sequência, fez-se outra regra de três para encontrar a unidade final a ser expressa em mg EAG/100g como o esquema representado abaixo:

mg EAG -----	1g grão
x	----- 100g grão

Figura 6 - Curva padrão de ácido gálico 0,28mg/mL.

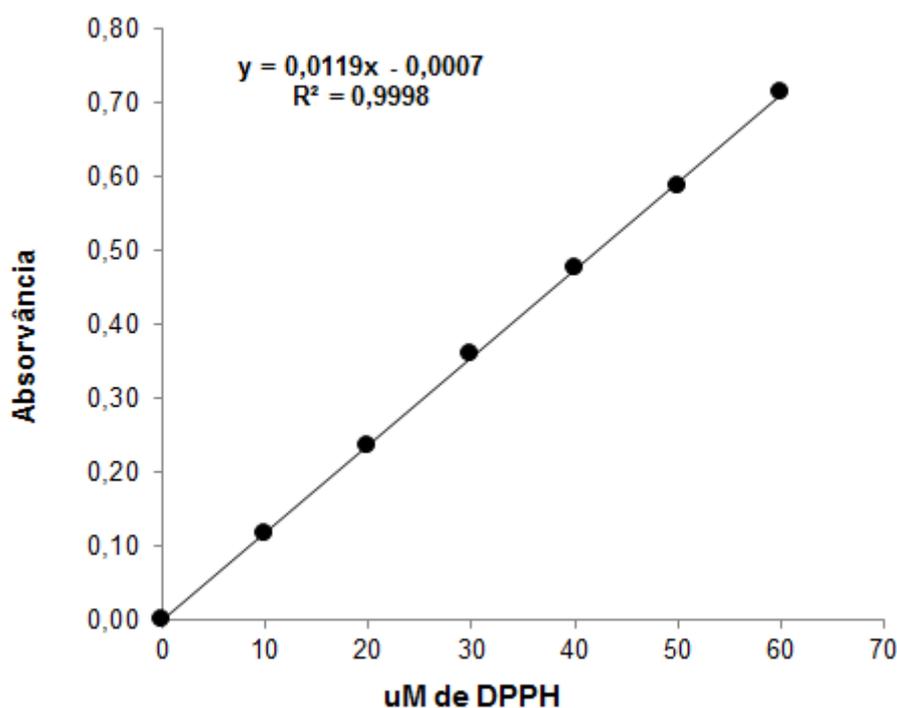


### 3.8 Atividade antioxidante do arroz

A atividade antioxidante (AAO) foi avaliada através da atividade sequestrante do radical DPPH• conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier; Berset (1995); Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998); Walter (2009) e Walter et al. (2013). 175µL de extrato foram combinados com 3325µL de solução de DPPH• 0,06mM. A mistura de reação foi incubada por 2h para infusão e 5h para extrato aquoso de arroz cru e cozido a 23°C, no escuro, até completar a reação. A redução do radical de DPPH• foi medida pelo monitoramento do decréscimo da absorção a 515nm em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device (item 3.5) e UV-2600 Shimadzu (item 3.6)) por cubeta de quartzo. Para o extrato aquoso de arroz, a cinética foi avaliada no tempo de 5h (300min) e a capacidade antioxidante foi expressa como g grao/g DPPH visto que, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes, inibição do radical (% Inibição), quantidade de DPPH remanescente (% DPPH<sub>R</sub>) e mmol equivalente trolox (mmol ET) por 100g; e para as infusões, a cinética foi avaliada no tempo de 2h (120min) e a capacidade antioxidante foi expressa como % Inibição e % DPPH<sub>R</sub>.

Para o cálculo do  $EC_{50}$  (RUFINO et al., 2007), primeiramente foi construída uma curva de calibração de DPPH (Figura 7) para se obter a equação da reta ( $y = 0,0119x - 0,0007$ ) (Eq. 1) que foi gerada a partir do gráfico.

Figura 7 – Curva de calibração de DPPH• 0,06mM.



Após a leitura, substituiu-se o valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle (175 $\mu$ L metanol + 3325 $\mu$ L solução de DPPH 0,06mM) pelo y da equação (Eq. 1) da curva do DPPH• para encontrar o consumo em  $\mu$ M DPPH e, em seguida, transformou-se para g DPPH.

$$y = 0,0119 \times x - 0,0007 \quad (\text{Eq. 1})$$

(Equação da curva do DPPH• representada na Fig. 7),

onde y é a metade do valor da absorvância inicial da solução controle e x é o resultado em  $\mu$ M DPPH•. Para converter o resultado para g DPPH, fez-se o seguinte cálculo:

$$g \text{ DPPH} = \left( \frac{\mu\text{M DPPH}}{1000000} \right) \times 394,3$$

onde 394,3 é o peso molecular do DPPH.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos encontradas no momento de estabilização, plotou-se a absorvância estabilizada no eixo Y e diluição (mg/L) no eixo X e determinou-se a próxima equação da reta (Eq. 2). Assim, para calcular a atividade antioxidante total (AAO) substituiu-se a absorvância equivalente a 50% da concentração da solução do DPPH• 0,06mM pelo y (Eq. 2) e encontrou-se o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• (EC<sub>50</sub>).

$$y = -a \times x + b \text{ (Eq. 2)}$$

onde y é a metade da absorvância inicial da solução controle e x é o EC<sub>50</sub> (mg/L). A partir do valor (mg/L) encontrado na Eq. 2, o resultado foi dividido por 1.000 para obter o valor em g e, em seguida, dividido pelo valor encontrado em g DPPH• (Eq. 1) para obter o resultado final (Eq. 3) que é expresso em g grão (arroz descascado) / g DPPH.

$$g \text{ grão} / g \text{ DPPH} = \left( \frac{EC50}{1000} \right) / g \text{ DPPH} \text{ (Eq. 3)}$$

Após essa sequência de cálculos, a atividade antioxidante foi estimada como EC<sub>50</sub> expresso em g grão/g DPPH•. Para o cálculo da atividade de sequestro do radical ou inibição (%) (SOUZA et al., 2011), a fórmula utilizada foi:

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{Abs_c - Abs_a}{Abs_c} \right) \times 100$$

onde Abs<sub>c</sub> é a absorvância inicial da solução controle e Abs<sub>a</sub> é a absorvância da amostra após 2h de cinética.

Para expressar a quantidade de DPPH remanescente ( $DPPH_R$ ) (ATOUI et al., 2005), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% DPPH_R = 100 \times \left( \frac{DPPH_T}{DPPH_{T0}} \right)$$

onde o  $DPPH_T$  é quantidade de DPPH no tempo de equilíbrio (120 min) e  $DPPH_{T0}$  é a quantidade de DPPH no tempo zero.

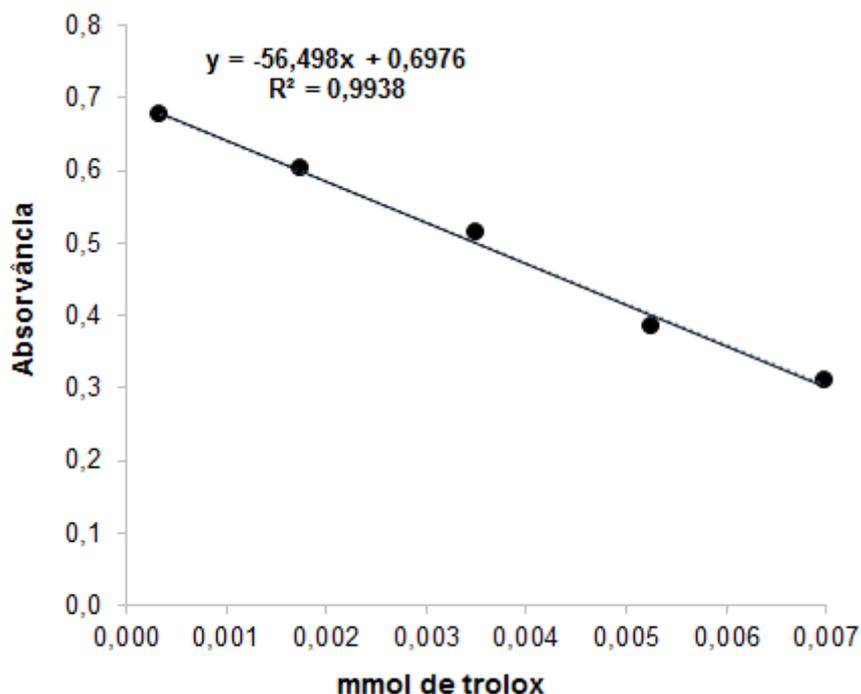
Para expressar a atividade antioxidante como mmol de equivalente trolox (mmol ET) por 100g grão, primeiramente uma curva padrão de trolox foi construída. (Figura 8). Para o cálculo, substituiu-se o valor da absorvância após a cinética no y na equação da reta encontrando a quantidade em mmols de ET (no volume total da cubeta). Após esse primeiro cálculo, fez-se uma regra de três para encontrar a quantidade de mmols ET no volume de extrato total:

mmols ET -----	0,175mL
x -----	20mL

onde 0,175mL é a alíquota pipetada de amostra e 20mL é o volume total do extrato aquoso de arroz. Na sequência, fez outra regra de três para encontrar a quantidade na unidade final de mmols ET/100g como o esquema representado abaixo:

mmols ET -----	1g grão
x -----	100g grão

Figura 8 – Curva de calibração de trolox 2mM.



### 3.9 Análise de nitrogênio total e conteúdo proteico

A análise de nitrogênio total e conteúdo proteico foi analisado pelo método de Kjeldahl, que é baseado sempre em três etapas: digestão, destilação e titulação. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Na digestão, a matéria orgânica existente na amostra (1g de cada cultivar de arroz triturado) foi decomposta com 20mL de ácido sulfúrico PA ( $H_2SO_4$ ), 7g de catalisador ( $K_2SO_4:CuSO_4 - 10:1$ ) e 1mL de antiespumante 50% a cerca de  $420^\circ C$  por 45min, onde o nitrogênio da proteína foi reduzido em sulfato de amônia ( $(NH_4)_2SO_4$ ) através do digestor (DK 6 Heating Digester – VELP Scientifica). Após a digestão iniciou-se o processo de destilação que pode ser feito por aquecimento direto ou por arraste de vapor. O  $(NH_4)_2SO_4$  gerado foi tratado com 70mL de hidróxido de sódio (NaOH) e 50mL de água destilada por 8min no destilador (UDK 130A - VELP Scientifica) ocorrendo a liberação de amônia ( $NH_3$ ). Antes de iniciar a destilação, os erlenmeyers foram preparados com 25mL de ácido bórico 4% ( $H_3BO_3$ ) e 0,2mL de solução indicadora mista (vermelho de metila:azul de metileno – 2:1). Na destilação, ocorreu adição de 50mL de água destilada e 70mL de NaOH liberados pelo próprio destilador. Considera-se terminado o processo, quando toda a amônia se desprende e a

solução, que no início apresentava coloração rosada, adquire a cor esverdeada (GALVANI; GAERTNER, 2006). Para finalizar, com a titulação determinou-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra utilizando-se o  $H_2SO_4$  para atingir o ponto de viragem (coloração laranja-rosado). Dessa forma, a matéria orgânica foi decomposta e o nitrogênio existente finalmente transformado em amônia.

Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25, que representa um fator médio para o alimento a ser analisado, utilizado para transformar o número de g de nitrogênio em proteína. Para cada alimento emprega-se um fator diferenciado de 6,25 como por exemplo 5,95 para o arroz; 5,83 para farinha de trigo, farinha de centeio e cevada; 5,18 para amêndoas, entre outros. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A fórmula utilizada para calcular a porcentagem de proteína bruta em base úmida das cultivares de arroz (%Proteína *b.u.*) foi a seguinte:

$$\%Proteína_{b.u.} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 5,95 \times 0,014 \times 100}{P}$$

onde  $V_a$  é o volume da titulação da amostra,  $V_b$  é o volume da titulação do branco,  $N$  é a normalidade do ácido sulfúrico (0,1942), 5,95 é o fator arbitrário utilizado para arroz, 0,014 é o miliequivalente grama do nitrogênio e  $P$  é o peso da amostra (g). Para encontrar a porcentagem de proteína em base seca das cultivares de arroz (%Proteína *b.s.*) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\%Proteína_{b.s.} = \frac{\%Proteína_{b.u.} \times 100}{\%Sólidos}$$

onde %Sólidos é a divisão entre o peso da amostra final pelo peso da amostra inicial multiplicado por 100 para expressar em porcentagem.

### 3.10 Análise estatística

Para a avaliação da influência do cozimento dos grãos de arroz no teor de CFST e AAO, as amostras foram divididas em dois grupos: cru e cozido. Para a análise entre os grãos de arroz cru versus cozido, os dados foram analisados pelo

teste-*t* pareado. Para a análise entre as cultivares cru e entre as cultivares cozidas (intra grupo), os dados foram analisados pela ANOVA, seguido do teste de comparação de médias de Tukey. Para a análise de CFST da infusão de grãos de arroz cru com pericarpo pigmentado e não pigmentado e da AAO as amostras foram analisadas pela ANOVA, seguido do teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade de erro, através do software estatístico SPSS versão 21.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização das metodologias analíticas

Diferentes métodos são descritos na literatura científica para a extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em alimentos de origem vegetal. O metanol, etanol e acetona são os solventes mais utilizados na obtenção dessas substâncias. (JU, HOWARD, 2003). Ainda, a possibilidade de combinar os solventes em diferentes proporções tem sido amplamente utilizada. (LI et al., 2013; JU, HOWARD, 2003; ANTOLOVICH et al., 2000). Porém, poucos autores relatam a utilização somente de água como solvente no isolamento dos CFST de diversas matrizes alimentares. Dessa forma, buscando compreender a influência do tipo de solvente utilizado na obtenção dos CFST, foram realizadas extrações de CFST de amostra de grãos de arroz preto (IAC 600) e branco polido (IRGA 426-P), utilizando a combinação de metanol e acetona ou somente água como solventes.

Os resultados (Tabela 1 e Figura 9) mostram que o extrato metanólico de grão de arroz preto (3SM) foi capaz de extrair um valor médio 1,7 vezes maior em relação ao extrato aquoso (3SA). Esses dados sugerem uma maior solubilidade dos CFST de grãos de arroz preto em meio hidrofóbico. Vale ressaltar, que esses resultados estão relacionados à mistura dos três sobrenadantes (3S) em extrato metanólico (3SM) e aquoso (3SA), conforme descrito na metodologia.

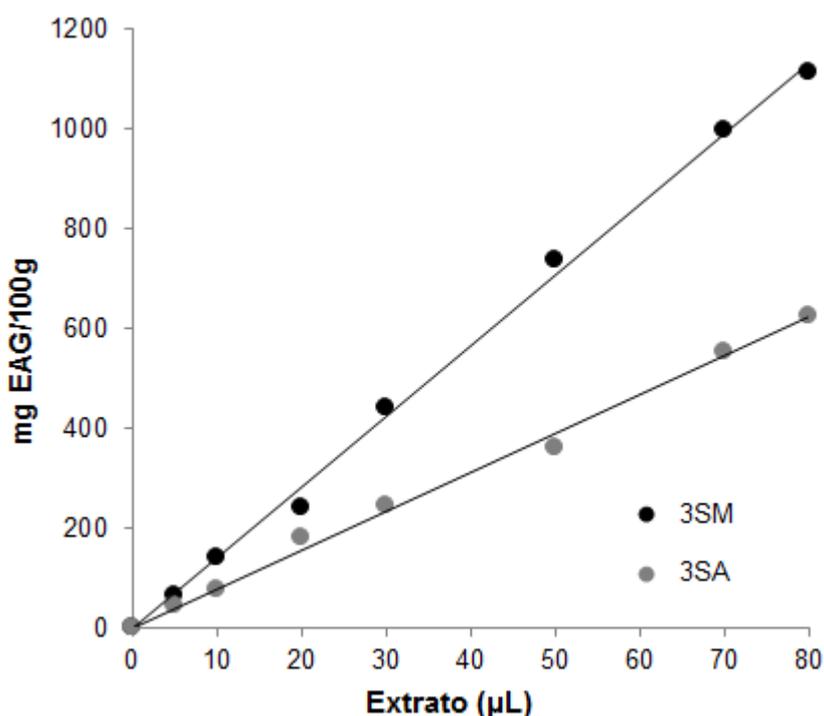
Tabela 1 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico e aquoso de arroz preto (IAC 600) com os três sobrenadantes juntos (3S).

Extrato (uL)	mg EAG/100g	
	3SM	3SA
5	63,47	43,63
10	138,83	75,36
20	241,96	182,46
30	440,29	245,93
50	737,78	360,96
70	995,61	551,35
80	1114,61	626,72

3SM: três sobrenadantes metanólicos juntos; 3SA: três sobrenadantes aquosos juntos.

Diversos autores relacionam a pigmentação dos grãos de arroz com a camada do pericarpo. Nesse sentido, com processo de beneficiamento dos grãos, como o polimento, os CFST podem ser removidos. Os resultados do presente trabalho sugerem que, embora as cultivares analisadas sejam diferentes, o polimento afeta na quantidade dos CFST. Como mostrado na Tabela 2 e Figura 10, o extrato metanólico de arroz preto obteve um valor médio de 41 vezes superior quando comparado ao extrato metanólico de arroz branco polido (MATOS; OLIVEIRA; RAMOS, 2013), obtidos através da junção dos três sobrenadantes.

Figura 9 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico e aquoso de arroz preto (IAC 600) com os três sobrenadantes juntos (3S<sup>A</sup>).



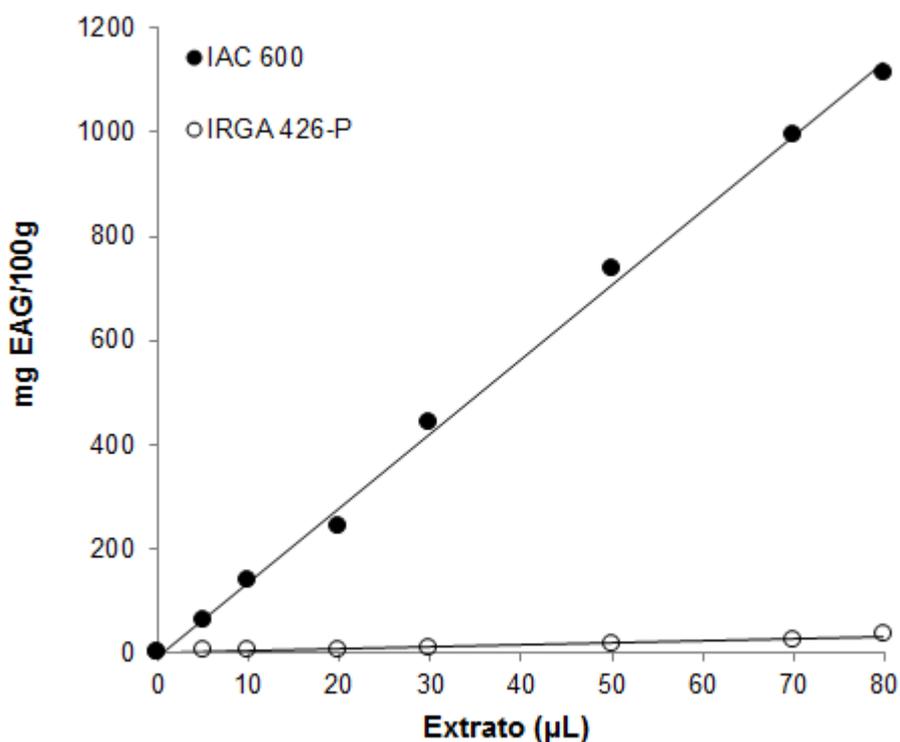
<sup>A</sup>3SM: três sobrenadantes metanólicos juntos; 3SA: três sobrenadantes aquosos juntos.

Verificou-se também que o 1<sup>o</sup> sobrenadante do extrato metanólico (S1M) de arroz preto obteve um valor médio somente de 1,3 vezes mais compostos fenólicos em relação ao 1<sup>o</sup> sobrenadante do extrato aquoso (S1A). Ainda nessa investigação, os resultados mostraram uma variação no teor de CFST em cada sobrenadante obtido, sendo que os S1 (metanólico e aquoso) apresentaram uma quantidade média 5,4 vezes superior em relação aos S3 (metanólico e aquoso) (MATOS; OLIVEIRA; RAMOS, 2013) conforme representados na Tabela 3 e Figura 11.

Tabela 2 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato metanólico de arroz preto (IAC 600) e branco polido (IRGA 426-P) com os três sobrenadantes juntos (3S).

Extrato ( $\mu\text{L}$ )	mg EAG/100g	
	IAC 600	IRGA 426-P
5	63,47	3,97
10	138,83	3,97
20	241,96	3,97
30	440,29	7,93
50	737,78	15,87
70	995,61	23,80
80	1114,61	35,70

Figura 10 – Quantidade de compostos fenólicos solúveis totais em extrato metanólico de arroz preto (IAC 600) e branco polido (IRGA 426-P) com os três sobrenadantes juntos (3S).



Como a proposta no presente trabalho é compreender a quantidade de compostos fenólicos que permanecem em meio aquoso e o que possivelmente está sendo consumido através da alimentação, uma vez que a cocção ocorre através da imersão em água, optou-se por padronizar a extração em meio aquoso. Tendo em vista que o 1º sobrenadante foi o de maior extração dos compostos, padronizou-se a

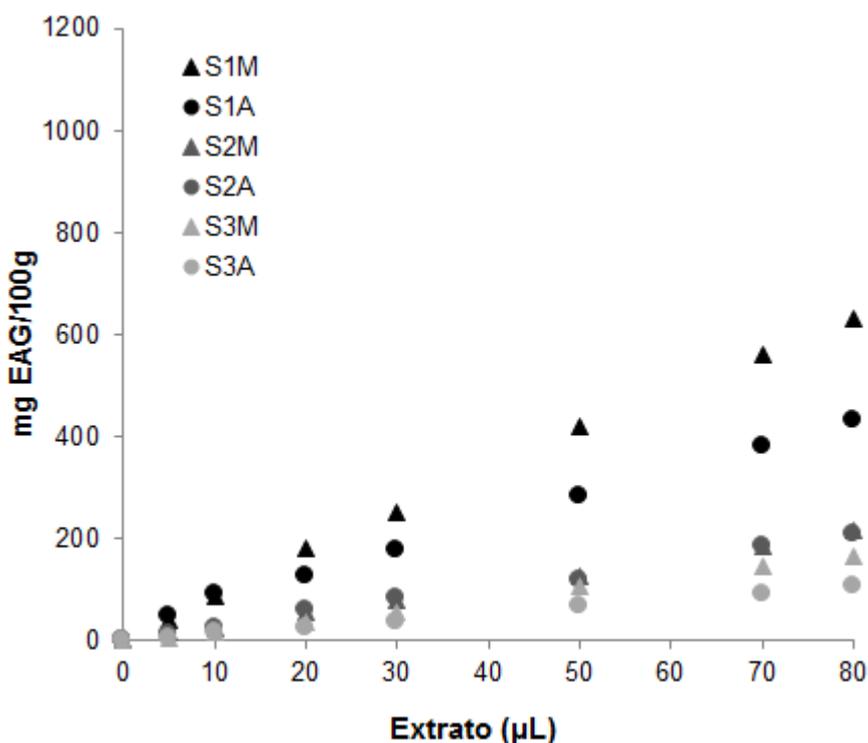
metodologia analítica com apenas uma centrifugação, obtendo-se, assim, somente um sobrenadante.

Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato aquoso e metanólico de arroz preto (IAC 600) no 1º, 2º e 3º sobrenadante<sup>A</sup>.

Extrato (µL)	mg EAG/100g					
	S1A	S1M	S2A	S2M	S3A	S3M
5	47,60	38,34	14,54	15,87	3,97	3,97
10	92,55	87,26	25,12	26,44	18,51	15,87
20	128,25	181,14	60,82	56,85	23,80	34,38
30	175,85	249,89	81,98	80,65	37,02	56,85
50	281,63	419,13	120,32	128,25	66,11	105,78
70	380,79	559,29	183,78	183,78	92,55	145,44
80	432,36	630,69	208,91	215,52	105,78	166,60

<sup>A</sup>S1A: 1º sobrenadante aquoso, S1M: 1º sobrenadante metanólico, S2A: 2º sobrenadante aquoso, S2M: 2º sobrenadante metanólico, S3A: 3º sobrenadante aquoso, S3M: 3º sobrenadante metanólico.

Figura 11 - Teores de compostos fenólicos solúveis totais de extrato aquoso e metanólico de arroz preto (IAC 600) no 1º, 2º e 3º sobrenadante<sup>A</sup>.



<sup>A</sup>S1A: 1º sobrenadante aquoso, S1M: 1º sobrenadante metanólico, S2A: 2º sobrenadante aquoso, S2M: 2º sobrenadante metanólico, S3A: 3º sobrenadante aquoso, S3M: 3º sobrenadante metanólico.

## 4.2 Teores de CFST e AAO: arroz cru e cozido

O arroz destinado ao consumo humano necessita passar pelo processo de cozimento úmido e esse processo hidrotérmico pode afetar na quantidade de compostos fenólicos totais do grão. Todavia, pouco se sabe sobre o real impacto provocado pela cocção sobre os teores finais de polifenóis no arroz. Nesse sentido, destaca-se a importância de compreender mais sobre a influência do cozimento na quantidade de compostos fenólicos de alimentos. Os teores de compostos fenólicos solúveis totais encontrados nas cultivares pigmentadas e não pigmentadas, submetidas ou não ao cozimento, estão listados nas Tabela 4 e Figura 12.

O extrato de arroz polido cru apresentou a menor média de compostos fenólicos (31,73mg EAG/100g), em comparação ao integral marrom-claro (278,54mg EAG/100g), preto (427,51mg EAG/100g) e vermelho (546,95mg EAG/100g). O extrato aquoso de arroz vermelho cru apresentou 17 vezes mais compostos fenólicos em comparação ao extrato aquoso de arroz branco polido, e o extrato aquoso de arroz preto cru apresentou aproximadamente 14 vezes mais compostos fenólicos em relação ao de arroz branco polido cru. Não houve diferença estatisticamente significativa entre arroz preto cru e cozido e entre o branco polido cru e cozido. Já os grãos de arroz vermelho e marrom-claro sofreram perdas estatisticamente significativas desses compostos após a cocção, indicando que o processo hidrotérmico afeta a quantidade de compostos fenólicos do grão.

Tabela 4 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de grãos de arroz cru e cozido.

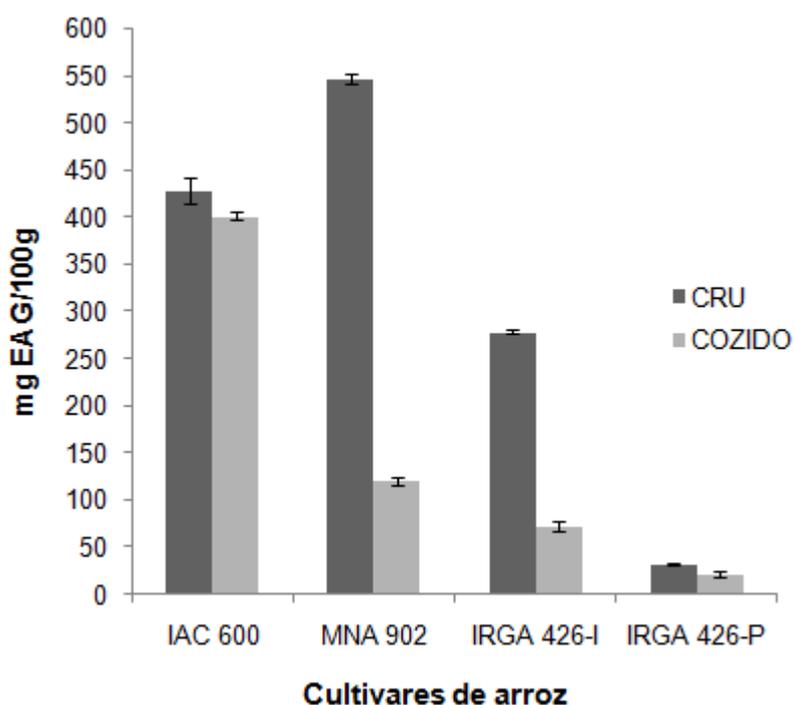
Cultivares	mg EAG/100g de grão <sup>a</sup>		p-valor <sup>b</sup>
	Cru	Cozido	
IAC 600	427,51 ± 13,71 <sup>B</sup>	401,51 ± 4,36 <sup>A</sup>	0,291
MNA 902	546,95 ± 5,61 <sup>A</sup>	119,88 ± 3,74 <sup>B</sup>	0,010
IRGA 426-I	278,54 ± 2,49 <sup>C</sup>	72,72 ± 5,61 <sup>C</sup>	0,018
IRGA 426-P	31,73 ± 1,25 <sup>D</sup>	20,71 ± 3,12 <sup>D</sup>	0,174

<sup>a</sup>Dados apresentados por média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Teste-*t* pareado cru vs cozido.

A literatura relata uma grande variação nos teores desses compostos em grãos de arroz. Alguns autores identificaram que nos grãos de pericarpo vermelho as concentrações de polifenóis variaram de 34 a 424mg EAG/100g (GOFFMAN;

BERGMAN, 2004), de 478,72 a 972,99mg EAG/100g (WALTER et al., 2013) e de 69,6 a 74,80mg EAG/100g (SHAO et al., 2014a; SHAO et al., 2014b), o que sugere uma grande variação dentro de um mesmo grupo de pigmentação. Já outros autores encontraram as concentrações variando de 165,8 a 731,8mg EAG/100g (SHEN et al., 2009), de 56 a 158mg EAG/100g (GUNARATNE et al., 2013) através da técnica ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Essa variação também pode ser observada em grãos de pericarpo preto, com concentrações que variaram de 69 a 535mg EAG/100g (GOFFMAN; BERGMAN, 2004), de 841 a 1244,9mg EAG/100g (SHEN et al., 2009), 943,98mg EAG/100g (WALTER et al., 2013) e 42,2 a 73,63mg EAG/100g (SHAO et al., 2014a; SHAO et al., 2014b), assim como nos grãos de arroz integral marrom-claro com variação na ordem de 25 a 246mg EAG/100g (GOFFMAN; BERGMAN, 2004), de 108,1 a 251,4mg EAG/100g (SHEN et al., 2009) e de 13,03 a 14,4mg EAG/100g (SHAO et al., 2014a; SHAO et al., 2014b). Importante destacar que em virtude da existência de diferentes metodologias para obtenção dos extratos vegetais e das diferentes possibilidades de uso de solventes orgânicos, torna-se difícil a comparação dos resultados encontrados na literatura.

Figura 12 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado submetidos ou não à cocção. Barra de erro indica o desvio padrão de triplicata com duas repetições.



Segundo Walter (2009) e Walter et al (2013), as maiores concentrações de compostos fenólicos foram observadas para os grãos com pericarpo vermelho e preto, as quais a relação foi 7 a 15 vezes maiores em relação aos grãos com pericarpo marrom-claro, contudo a extração foi com metanol. Já Massaretto (2009) e Mira et al. (2009) observaram que essa relação foi 6 vezes superior entre o grupo de pigmentação vermelha e sem pigmentação de pericarpo, e Shao et al. (2014a) encontrou a relação entre o grão preto e marrom-claro 5 vezes superior. Nesse contexto, os elevados teores de compostos fenólicos totais na fração solúvel das cultivares pigmentadas podem ser devido a presença de antocianidinas e proantocianidinas, compostos fenólicos responsáveis pela coloração dos grãos. (MIRA et al., 2008).

Após o cozimento, os resultados mostram que houve uma significativa redução desses compostos no grão na ordem de 73,89% no arroz integral marrom-claro e 78,08% no arroz vermelho, sugerindo que o processo térmico afeta na concentração final desses compostos no grão. Porém, esses dados diferem dos encontrados por Walter (2009) em que os grãos integrais e polidos foram os mais afetados pelo processo de cozimento, com redução de 20,9 a 72% na concentração de compostos fenólicos nos grãos de arroz integral marrom-claro e redução de 39,6 a 62,2% para os grãos de arroz branco polido. Ainda, diferem de Massaretto (2009) e Massaretto et al. (2011), cuja redução foi de 42% dos fenólicos solúveis nos genótipos não pigmentados, e de 83% nos genótipos de pigmentação vermelha, indicando que a fração solúvel, principalmente composta por proantocianidinas, foi a mais afetada pelo processamento térmico.

A redução desses compostos com o cozimento pode ser explicada por fatores como degradação térmica ou alterações na reatividade química dos fenólicos que pode diminuir a reação com o Folin-Ciocalteu. Estudos mostram que a estrutura dos compostos fenólicos tem relação direta no processo de ligação destes às proteínas, sendo mais forte a ligação quanto maior for o peso molecular do composto, uma vez que moléculas maiores apresentam mais grupos ligantes (SOARES; MATEUS; FREITAS, 2007). Pressupõe-se que, por esse motivo, nas cultivares com pericarpo pigmentado, especialmente a de pericarpo vermelho, houve uma redução muito mais pronunciada dos fenólicos solúveis do que no grupo sem pigmentação.

Portanto, torna-se importante abordar que essas diferentes porcentagens de redução dos compostos fenólicos em função do cozimento podem variar por diversos fatores, entre eles temos a cultivar, safra, métodos de cocção, quantidade de grão para o volume de água utilizado, tempo de cocção, temperatura da água de cocção, recipiente utilizado, entre outros. Tendo em vista que, obrigatoriamente o arroz para consumo humano precisa passar pelo cozimento úmido, esse processo térmico ocasionará a redução na quantidade de polifenóis presentes no grão.

Como descrito anteriormente, a atividade antioxidante pode ser expressa de diferentes formas. Nesse estudo, os resultados foram expressos por diferentes unidades para facilitar a compreensão dos resultados. A normalização dos valores é necessária para ser possível a comparação dos resultados, pois as amostras iniciaram com valores numericamente diferentes. A atividade antioxidante (g grão/g DPPH) encontrada nas cultivares pigmentadas e não pigmentadas, submetidas ou não ao cozimento, estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade antioxidante (g/g DPPH) de grãos de arroz cru e cozido.

Cultivares	g grão/g DPPH <sup>a</sup>		p-valor <sup>b</sup>
	Cru	Cozido	
IAC 600	3596,84 ± 276,00 <sup>A</sup>	4757,57 ± 71,19 <sup>A</sup>	0,132
MNA 902	10547,89 ± 620,74 <sup>B</sup>	20336,15 ± 701,69 <sup>B</sup>	0,061
IRGA 426-I	13539,66 ± 283,73 <sup>C</sup>	24418,95 ± 328,20 <sup>C</sup>	0,002
IRGA 426-P	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup>Dados apresentados por média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Teste-*t* pareado cru vs cozido. <sup>c</sup>Atividade antioxidante não detectada.

Os resultados mostram que o extrato aquoso de arroz preto apresentou maior atividade antioxidante (3596,84g/g DPPH), seguido do vermelho (10547,89g/g DPPH), integral marrom-claro (13539,66g/g DPPH) e polido. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o extrato aquoso de arroz preto e vermelho, indicando que sua atividade antioxidante foi mantida mesmo após o processo de cocção. Já com o extrato aquoso de arroz integral marrom-claro houve redução da atividade antioxidante estatisticamente significativa após o cozimento. O extrato aquoso de arroz branco polido não apresentou atividade antioxidante, ou seja, não foi detectado o sequestro do radical DPPH• após as 5h de cinética capaz de construir uma curva de diluições para ser expresso na unidade g/g DPPH em função

da redução no valor da absorvância sendo, então, expresso como não detectado (ND).

Os valores de  $EC_{50}$ , descritos na Tabela 6, representam a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH•. Conforme descrito na metodologia, para a obtenção do extrato de arroz, 1g (1000mg) foi adicionado em 20mL (0,02L) de água, resultando em uma concentração final do extrato de 50000mg/L. Uma vez que a concentração do extrato aquoso de todas as amostras é igual (50000mg/L), pode observar que os extratos aquosos de arroz vermelho e integral marrom-claro precisariam estar mais concentrados para que esse sequestro de 50% do radical inicial fosse possível ao longo da cinética. Portanto, somente o extrato aquoso de arroz preto, tanto cru como cozido, conseguiu sequestrar a metade da quantidade inicial do radical ( $EC_{50 \text{ cru}} = 38409\text{mg/L}$  e  $EC_{50 \text{ cozido}} = 49636,3\text{mg/L}$ ).

Tabela 6 – Valores de  $EC_{50}$  (mg/L) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.

Cultivares	$EC_{50}$ (mg/L)	
	Cru	Cozido
IAC 600	38409,00 ± 1483,51	49636,30 ± 742,74
MNA 902	110047,40 ± 6476,25	182465,15 ± 49328,97
IRGA 426-I	141260,85 ± 2960,16	254765,75 ± 3424,16
IRGA 426-P	-	-

As atividades antioxidantes (mmol ET/100g, %Inibição e %DPPH<sub>R</sub>) encontradas nas cultivares pigmentadas e não pigmentadas, submetidas ou não ao cozimento, estão listadas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Os gráficos das cinéticas com a quantidade de DPPH remanescente no extrato aquoso dos grãos de arroz cru e cozido estão representados na Figura 13. Devido a existência de diversas metodologias de extração e uso de diferentes solventes observa-se uma discrepância de valores quando realiza-se a comparação dos resultados, principalmente na unidade de equivalente trolox. Além disso, a cultivar, safra, armazenamento do grão, métodos de cocção, entre outros podem afetar na atividade antioxidante do grão.

Tabela 7 – Atividade antioxidante (mmol ET/100g) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.

Cultivares	mmol ET/100g <sup>a</sup>		
	Cru	Cozido	p-valor <sup>b</sup>
IAC 600	70,31 ± 2,86 <sup>A</sup>	67,28 ± 7,15 <sup>A</sup>	0,742
MNA 902	34,91 ± 7,15 <sup>B</sup>	11,65 ± 5,72 <sup>B</sup>	0,237
IRGA 426-I	20,75 ± 1,43 <sup>B</sup>	9,63 ± 2,86 <sup>B</sup>	0,057
IRGA 426-P	3,56 ± 0,00 <sup>C</sup>	-	-

<sup>a</sup>Dados apresentados por média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Teste-*t* pareado cru vs cozido

Os resultados, quando expressos em mmol ET/100g, mostram que o extrato aquoso de arroz preto cru apresentou aproximadamente 20 vezes mais potencial de sequestro de radical em comparação ao extrato aquoso de arroz branco polido cru, 3 vezes mais que o extrato aquoso de arroz integral marrom-claro cru e 2 vezes mais que o extrato aquoso de arroz vermelho cru. Após o cozimento, a redução da AAO é de aproximadamente 66% para o arroz vermelho e 54% para o arroz marrom-claro.

Alguns autores identificaram que no arroz preto os valores encontrados foi 6004mmol ET/100g (WALTER et al., 2013), 0,19mmol ET/100g (SHAO et al., 2014a) e 0,17mmol ET/100g (SHAO et al., 2014b). No arroz vermelho a atividade antioxidante encontrada foi 0,25mmol ET/100g (SHAO et al., 2014a) e 0,45mmol ET/100g (SHAO et al., 2014b) e no grão integral marrom-claro os valores foram de 0,03mmol ET/100g a 0,28mmol ET/100g (SHAO et al., 2014a; SHAO et al., 2014b). Diante dos resultados encontrados na literatura, observa-se que entre os próprios autores citados também há uma grande variação da atividade antioxidante assim como comparando com os resultados desse trabalho.

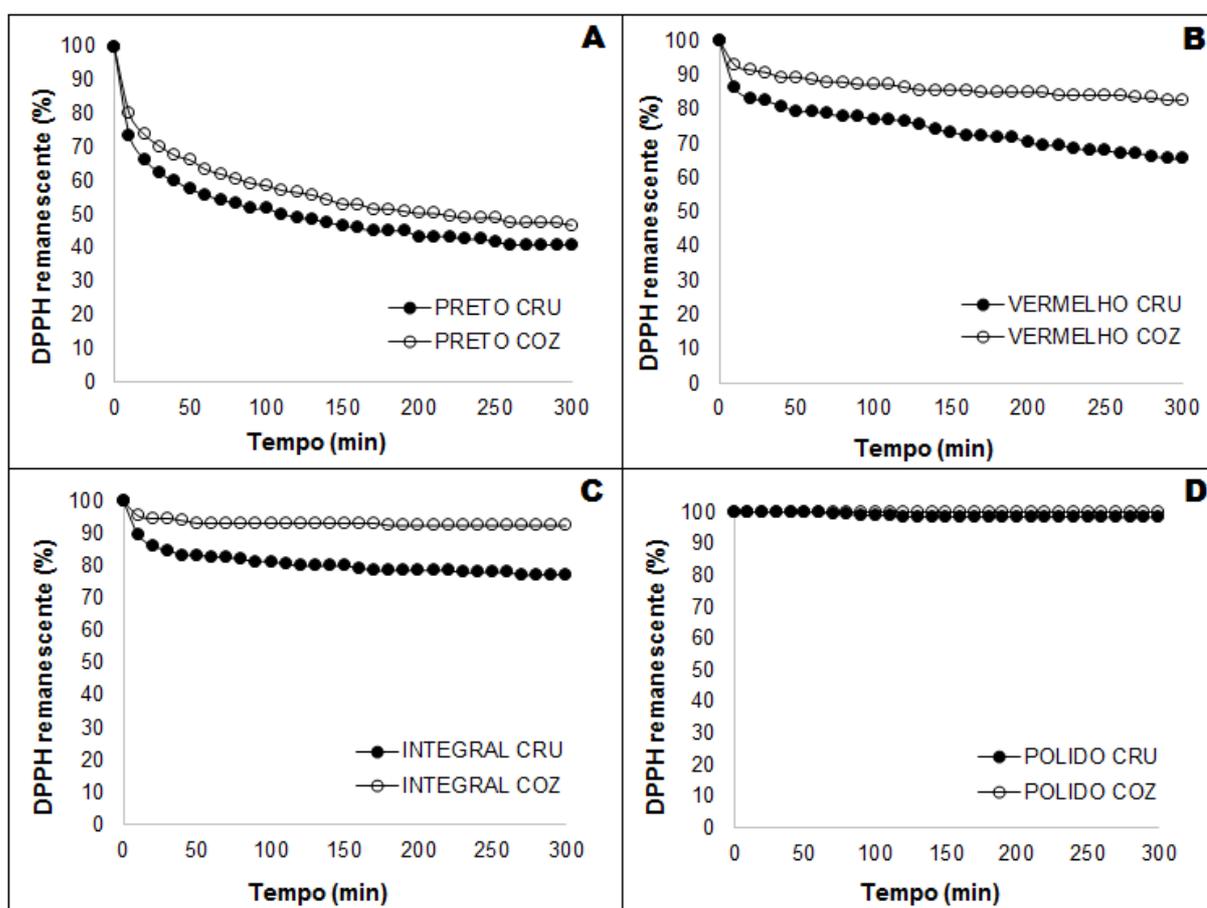
Tabela 8 – Atividade antioxidante (%Inibição e %DPPH<sub>R</sub>) dos extratos aquosos de grãos de arroz cru e cozido.

Cultivares	%Inibição <sup>a</sup>		%DPPH <sub>R</sub> <sup>a</sup>		p-valor <sup>b</sup>
	Cru	Cozido	Cru	Cozido	
IAC 600	51,39 ± 1,96 <sup>A</sup>	51,33 ± 4,71 <sup>A</sup>	48,61 ± 1,96 <sup>A</sup>	48,67 ± 4,71 <sup>A</sup>	0,993
MNA 902	30,00 ± 4,71 <sup>B</sup>	15,91 ± 3,90 <sup>B</sup>	70,00 ± 4,71 <sup>B</sup>	84,09 ± 3,90 <sup>B</sup>	0,260
IRGA 426-I	21,71 ± 0,93 <sup>B</sup>	7,14 ± 2,02 <sup>BC</sup>	78,29 ± 0,93 <sup>B</sup>	92,86 ± 2,02 <sup>BC</sup>	<b>0,034</b>
IRGA 426-P	2,14 ± 1,01 <sup>C</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>C</sup>	97,86 ± 1,01 <sup>C</sup>	100 ± 0,00 <sup>C</sup>	0,205

<sup>a</sup>Dados apresentados por média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Teste-*t* pareado cru vs cozido.

Os resultados mostram, na Tabela 8, que o extrato aquoso de arroz preto cru obteve a maior capacidade de sequestro do radical com 51,39%, seguido do vermelho (30,00%) e marrom-claro (21,71%), e branco polido (2,14%). Após o cozimento, observou-se a diminuição da atividade antioxidante para todas as amostras (Figura 13), contudo, somente o extrato aquoso de grão integral marrom-claro diferiu estatisticamente, mostrando que houve perda significativa da atividade antioxidante. Vale ressaltar, que embora o teste estatístico não tenha identificado significância na amostra MNA 902 (grão vermelho) após a cocção, observou-se uma diminuição da porcentagem de inibição de 30% para 15,91%, após o processo térmico.

Figura 13 - Quantidade de DPPH remanescente de grãos de arroz cru e cozido. A: IAC 600, B: MNA 902, C: IRGA 426-I e D: IRGA 426-P.



Sabe-se que a atividade antioxidante está relacionada com a quantidade de compostos fenólicos, mas não necessariamente um maior teor desses compostos determinará uma maior atividade antioxidante. Isso ocorre pelo fato de existir várias

classes de compostos fenólicos em que cada composto possui uma capacidade de sequestro de radical. Logo, a atividade antioxidante não depende somente da quantidade de compostos fenólicos, como também do tipo de compostos bioativos (taninos, flavonoides, ácidos carboxílicos, dentre outros) redutores de radicais livres presentes na amostra. (KORUS; GUMUL; CZECHOWSKA, 2007).

Quanto à redução da atividade antioxidante dos extratos de arroz após o cozimento, transformações químicas podem ocorrer em virtude do tratamento término como a decomposição de compostos fenólicos e a formação de complexos entre polifenóis e outras substâncias. (XU; CHANG, 2008). Assim, sugere-se posteriormente a identificação através de ensaios cromatográficos das moléculas bioativas presentes a fim de caracterizar o extrato de arroz cru e cozido com o objetivo de compreender quais são, de fato, as moléculas responsáveis pela atividade antioxidante encontrada ao longo das análises.

Embora estudos *in vitro* possam fornecer informações sobre a atividade antioxidante e possíveis efeitos biológicos dos compostos fenólicos presentes nos grãos de arroz, a relevância dessa informação para a efetividade antioxidante no organismo se torna limitada (COLLINS, 2005) sem dados de bioacessibilidade e biodisponibilidade desses compostos. (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Deve-se considerar que a bioacessibilidade é apenas dependente da digestão e liberação a partir da matriz dos alimentos, já a biodisponibilidade depende da digestão, liberação do nutriente a partir do alimento, absorção pelas células intestinais e transporte para as células do corpo. (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

#### **4.3 Teores de CFST e AAO: infusão de grãos de arroz cru**

Segundo a RDC 277 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), chá é definido como “o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, podendo ser adicionado de aroma e/ou especiaria para conferir aroma e/ou sabor”. (ANVISA, 2005). Tradicionalmente, o chá é preparado com o despejar de água quente sobre as folhas já processadas. Nesse contexto, o modo de preparo e as recomendações de uso pelo Informe Técnico nº 45 da ANVISA

podem ocorrer através do processo de infusão (adição de água fervente à planta e abafado por 2 a 3 minutos) ou decocção (fervura da planta por 2 a 5 minutos) em água. (ANVISA, 2010). Assim, a valorização do chá é atribuída ao sabor, aroma, benefícios para a saúde, além de fazer parte de algumas práticas culturais.

Vários estudos tem buscado associar o consumo de chá aos efeitos benéficos para a saúde humana, em função de seus constituintes químicos. Logo, a maioria dos efeitos de promoção da saúde de diferentes chás tem sido atribuído aos compostos polifenólicos e atividade antioxidante. (YU et al., 2014; KUZUHARA; SUGANUMA; FUJIKI, 2008). Estudos clínicos sugerem que substâncias derivadas de plantas possuem o potencial para tratar vários tipos de câncers devido sua ação e ampla diversidade química. (ZLOTOGORSKI et al., 2013). Ainda, diversos trabalhos relatam os benefícios do chá verde por conter polifenóis com propriedades antioxidantes e tem sido associado também com propriedades antitumorais. (ZLOTOGORSKI et al., 2013; KUZUHARA; SUGANUMA; FUJIKI, 2008).

A Figura 12 mostra uma quantidade significativa de CFST das diferentes amostras (cru e cozido) obtidas de grãos de arroz. Dessa forma, tornou-se interessante investigar a utilização dos grãos de arroz no método de infusão, além da quantificação dos CFST e avaliação da AAO no produto final obtido a partir da embebição em água das diferentes cultivares de arroz preto (IAC 600), vermelho (MNA 902), integral marrom-claro (IRGA 426-I) e branco polido (IRGA 426-P). As concentrações de CFST e AAO das infusões preparadas com os grãos de arroz cru estão representadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais de infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C) e atividade antioxidante (%Inibição e %DPPH<sub>R</sub>).

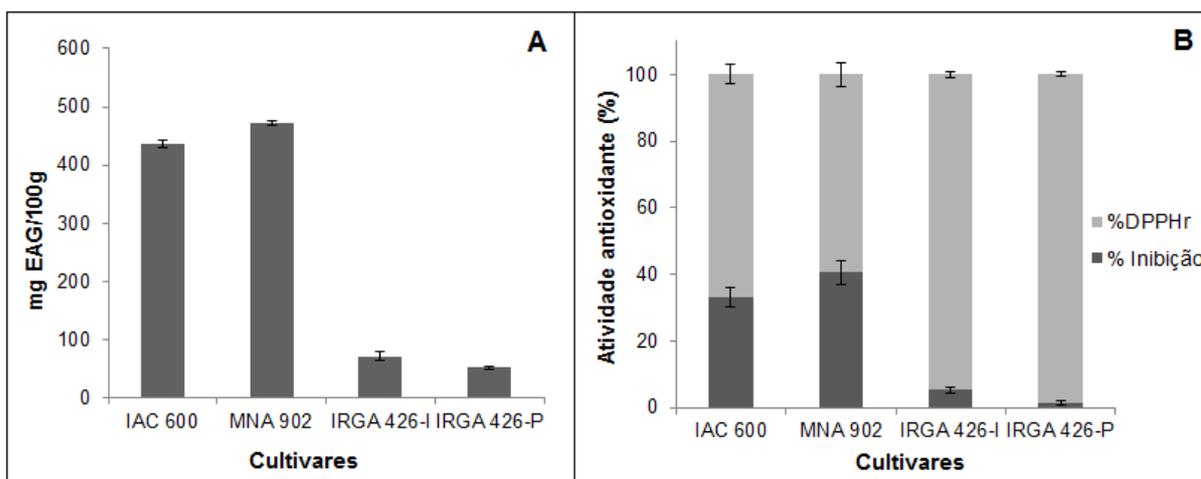
<b>Cultivares</b>	<b>mg EAG/100g de grão<sup>a</sup></b>	<b>%Inibição<sup>b</sup></b>	<b>%DPPH<sub>R</sub><sup>c</sup></b>
IAC 600	436,84 ± 6,20 <sup>B</sup>	33,00 ± 2,92 <sup>A</sup>	67,00 ± 2,92 <sup>A</sup>
MNA 902	471,91 ± 3,10 <sup>A</sup>	40,52 ± 3,66 <sup>A</sup>	59,48 ± 3,66 <sup>A</sup>
IRGA 426-I	71,89 ± 7,75 <sup>C</sup>	5,26 ± 0,90 <sup>B</sup>	94,74 ± 0,90 <sup>B</sup>
IRGA 426-P	52,17 ± 1,15 <sup>C</sup>	1,54 ± 0,68 <sup>B</sup>	98,46 ± 0,68 <sup>B</sup>

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados por média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Os resultados mostram que a infusão de grão de arroz vermelho (471,91mg EAG/100g) apresentou maior quantidade de CFST, seguidos pelo preto (436,84mg EAG/100g), integral marrom-claro (71,89mg EAG/100g) e branco polido (52,17mg

EAG/100g). Em relação à atividade antioxidante (%Inibição e %DPPH<sub>R</sub>) das amostras (Figura 14B e 15), observou-se uma grande porcentagem de DPPH<sub>R</sub> nas infusões de grãos de arroz integral marrom-claro e branco polido. Já as infusões obtidas através dos grãos pigmentados (preto e vermelho) possuíam maior capacidade de inibição do radical DPPH•, deixando menor quantidade de DPPH<sub>R</sub> ao longo da cinética. Não houve diferença estatisticamente significativa na %Inibição entre as infusões de arroz vermelho (40,52%) e arroz preto (33%) assim como entre o integral marrom-claro (5,26%) e polido (1,54%).

Figura 14 – A: concentração de compostos fenólicos solúveis totais da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C), B: atividade antioxidante da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C). Barra de erro indica o desvio padrão de triplicata com duas repetições.

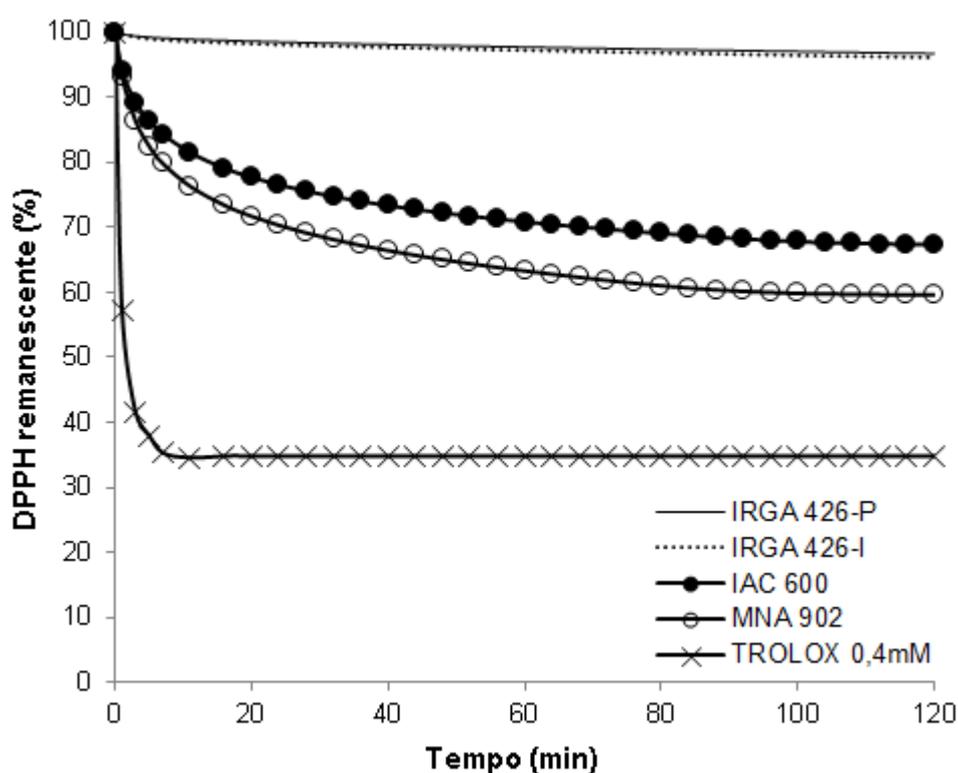


De acordo com Li et al. (2013), o método de ferver a água pode substituir o uso de solventes orgânicos. Os autores comentam que as infusões obtidas a partir de plantas medicinais têm sido consumidas há milhares de anos na China. Devido a toxicidade do metanol, o método de extração utilizando apenas a água como solvente poderia ser uma melhor opção para obtenção de antioxidantes em alimentos de origem vegetal.

A relação da quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante em infusões com diferentes tempos de embebição já foi encontrada em trabalhos anteriores com grãos de feijão preto, desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Itt Nutrifor. Observou-se que ao deixar os grãos de feijão preto comum

de molho por um período de 3h, a atividade antioxidante da água de embebição se manteve constante mesmo com tempos superiores a 3h de embebição e liberação continuada de compostos fenólicos solúveis totais. (SPOHR; MATOS; RAMOS, 2014). Esses dados reforçam a proposta de que uma grande quantidade de compostos fenólicos não necessariamente determinará uma grande atividade antioxidante e levanta a discussão de qual seria o tempo adequado para deixar o grão de molho.

Figura 15 – Quantidade de DPPH remanescente da infusão de grãos de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado em temperatura aquecida (90°C) durante 120 minutos de cinética.



Nesse sentido, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que as infusões de grãos pigmentados de arroz podem ser uma rica fonte de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Assim, são grandes as possibilidades de aplicação desses compostos, solúveis em água, no consumo humano através do protocolo de infusão. Esses resultados são base para futuros estudos clínicos que investiguem a relação da possível ingestão de compostos fenólicos, oriundos de infusão de arroz, com capacidade antioxidante no organismo humano.

#### 4.5 Teores de proteína bruta: arroz cru

O procedimento mais comum para a determinação de proteína é a determinação de um elemento ou de um grupo pertencente à proteína, e esses elementos analisados geralmente são carbono ou nitrogênio, e os grupos são aminoácidos e ligações peptídicas. (CECCHI, 2003). O método original de análise de nitrogênio total e conteúdo proteico foi proposto por Kjeldahl em 1883, e possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas (GALVANI; GAERTNER, 2006), assim como o nitrogênio orgânico total, que pode ser proteico e não proteico. Porém, na maioria dos alimentos o nitrogênio não proteico representa muito pouco no total da amostra.

A razão entre o nitrogênio medido e a proteína estimada depende do tipo de amostra e de outros fatores como variedade, condições de crescimento e quantidade de fertilizante utilizado na cultura. (CECCHI, 2003). Mesmo sofrendo várias modificações e adaptações, Kjeldahl ainda é muito usado por ser uma técnica confiável com rotinas bem estabelecidas (GALVANI; GAERTNER, 2006) e continua sendo o método mais utilizado na determinação de proteína em alimentos (CECCHI, 2003).

Genótipos de arroz com pericarpo vermelho e preto podem apresentar diferenças nas características em relação ao arroz com pericarpo marrom-claro, como por exemplo um maior teor de proteínas. Uma das formas que os compostos fenólicos se encontram nos vegetais é pela ligação com proteínas (BRAVO, 1998). Dessa forma, torna-se importante a avaliação e identificação de diferentes cultivares de arroz com maior teor de proteína visando compreender as propriedades nutricionais do grão. Os resultados de proteína bruta (%) das cultivares de arroz cru em base úmida (b.u.) e base seca (b.s.) estão listados na Tabela 10.

Geralmente, os resultados referentes ao processo de secagem são expressos em função do peso total do material (alimento) úmido e do tempo de duração do processo, mas também pode-se optar por expressar os dados em função da taxa de secagem. Já que o valor do material úmido pode variar durante o processo de secagem, não é indicado expressar o teor de umidade em função deste. (CASSINI, 2004). Tendo em vista que o valor do material úmido pode variar ao longo do

processo de secagem, o teor de umidade deve ser expresso em função da massa de matéria seca, pois permanecerá constante durante todo o processo de secagem.

Tabela 10 – Quantidade de proteína bruta de cultivares de arroz com pericarpo pigmentado e não pigmentado.

Cultivares	Proteína (%) <sup>a</sup>		
	Proteína <sub>b.u.</sub>	Proteína <sub>b.s.</sub>	p-valor <sup>b</sup>
IAC 600	7,81 ± 0,11 <sup>B</sup>	9,05 ± 0,15 <sup>A</sup>	0,013
MNA 902	7,84 ± 0,01 <sup>B</sup>	9,08 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,005
IRGA 426-I	7,63 ± 0,02 <sup>B</sup>	8,85 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,021
IRGA 426-P	7,01 ± 0,77 <sup>B</sup>	8,12 ± 0,96 <sup>A</sup>	0,074

<sup>a</sup>Dados apresentados por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Teste-*t* pareado base úmida vs base seca.

Dessa forma, ao analisar o teor de proteína das cultivares de arroz, em base úmida e base seca, observa-se um acréscimo médio de 20% de proteína em base seca, comprovando que a umidade pode interferir no valor final da amostra analisada. Os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de proteína entre as cultivares. Sugerindo que não há relação entre a quantidade de compostos fenólicos e proteína dos grãos. A investigação de Matsue e Ogata (1998) mostra que mesmo que o arroz seja considerado como um dos cereais de menores conteúdos de proteína, o melhoramento genético destaca-se nesse sentido a fim de aumentar o teor de proteína no grão, uma vez que o arroz é um dos grãos mais consumidos no mundo e faz parte da alimentação diária da população mundial.

## CONCLUSÃO

O processo de cocção pode afetar a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos grãos de arroz. A pigmentação do grão é um fator que está relacionado com a capacidade antioxidante, como pode ser constatado no presente estudo. O cozimento dos grãos de arroz não reduziu significativamente a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos grãos de arroz preto. Embora o arroz vermelho tenha apresentado maior quantidade de compostos fenólicos quando cru, observou-se diferença após o cozimento bem como uma tendência de redução da atividade antioxidante com o processo de cocção.

No ensaio das infusões, o grão de arroz vermelho foi o que mais liberou CFST para água de embebição, seguido do arroz preto. Contudo, as infusões de arroz vermelho e preto não diferiram quanto a capacidade de sequestro do radical DPPH•. Na caracterização química dos teores de proteína, não houve diferença entre as cultivares, mas os grãos de arroz preto, vermelho e marrom-claro diferiram com significância quando comparados entre grupos (base úmida vs base seca).

Estudos futuros sugerem a identificação dos compostos presentes nos extratos aquosos assim como nas infusões preparadas com os grãos de arroz. Também sugere-se maiores investigações dos potenciais efeitos benéficos em estudos *in vitro* e *in vivo*, objetivando maior conhecimento dos potenciais químicos e funcionais desse cereal a fim de incentivar o desenvolvimento de novas possibilidades de utilização desses grãos. Apesar de ser uma área amplamente estudada, ainda é necessário que se realizem ensaios biológicos mais abrangentes sobre a biodisponibilidade e bioacessibilidade desses compostos.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc36fe0047457e348a3fde3fbc4c6735/RDC\\_277\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc36fe0047457e348a3fde3fbc4c6735/RDC_277_2005.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 26 jun. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Informe Técnico nº 45, de 28 de dezembro de 2010**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40512000474583248e6ede3fbc4c6735/informe\\_45.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40512000474583248e6ede3fbc4c6735/informe_45.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 26 jun. 2014.
- AK, T.; GULÇIN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 27-37, 2008.
- ALVES, C. Q. A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMATO, G. W.; CARVALHO, J. L. V.; SILVEIRA FILHO, S. **Arroz parboilizado: tecnologia limpa, produto nobre**. Porto Alegre: Ricardo Lenz, 2002. 240p.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 303-309, 2009.
- ATOUI, A. K.; MANSOUR, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.
- BASSINELLO, P. Z.; GARCIA, J. S.; SOARES, L. A.; KOAKUZO, S. N.; MOURA NETO, F. P.; FERREIRA, R. A.; MENDONÇA, J. A.; SANTIAGO, C. M.; RANGEL, P. H. N. Arroz Preto: nova opção culinária para o Brasil. **Comunicado Técnico Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás - GO, 2008.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BENNO, Y.; ENDO, K.; MIYOSHI, H.; OKUDA, T.; KOISHI, H.; MITSUOKA, T. Effect of rice fiber on human fecal microflora. **Microbiology and Immunology**, v. 33, p. 435-440, 1986.

BORDIGA, M.; GOMEZ-ALONSO, S.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I.; ARLORIO, M. Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa* L. cultivars grown in Piedmont (Italy). **Food Research International**, xxx, 2014.

BOTTINI, R. L. Arroz: história, variedades, receitas. **Editora Senac**: São Paulo, 2008. 157p.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRUCE, W.; FOLKERTS, O.; GARNAAT, C.; CRASTA, O.; ROTH, B.; BOWEN, B. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. **The Plant Cell**, v. 12, n. 1, p. 65-80, 2000.

CANDIRACCI, M.; LUISA JUSTO, M.; CASTAÑO, A.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; HERRERA, M. D. Rice Bran Enzymatic Extract supplemented diets modulate adipose tissue inflammation markers in Zucker rats. **Nutrition**, v. 30, p. 466-472, 2014.

CASSINI, A. S. **Análise das características de secagem da proteína texturizada de soja**. 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. Qualidade de grãos em arroz. **Circular Técnica 34**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30p.

CAVA, G. **Efeito da adição de extrato de alecrim e alho em pó nos parâmetros de cor e oxidação lipídica de produto cárneo emulsionado à base de frango**. 2007. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas: **Editora da Unicamp**, 2003. 207p.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 592–597, 2007.

CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 131-41, 2002.

CHEN, M.; CHOI, S. H.; NOBUYUKE KOZUKUE, N.; HYUN-JEONG KIM, H.; FRIEDMAN, M. Growth-Inhibitory Effects of Pigmented Rice Bran Extracts and Three Red Bran Fractions against Human Cancer Cells: Relationships with Composition and Antioxidative Activities. American Chemical Society, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 915-916, 2012.

CHEN, J.; LIU, S.; YE, R.; CAI, G.; JI, B.; WU, Y. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: purification and characterization. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1684-1692, 2013.

COLLINS, A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 261S-267S, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos Safra 2013/2014. Oitavo Levantamento. Junho 2013.** Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_05\\_08\\_10\\_11\\_00\\_boletim\\_graos\\_maio\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_graos_maio_2014.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2014.

DASTMALCHI, K.; DAMIEN DORMANA, H. J.; KOŞARB, M.; HILTUNENA, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 239-248, 2007.

DIETARY GUIDELINES FOR AMERICANS. Washington: U.S. **Government Printing Office**, 7<sup>th</sup> Edition, 112 p., 2010.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO (EMBRAPA). **Cultivo do arroz irrigado no Brasil.** Sistemas de Produção, Novembro de 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasi/cap01.htm#mundo>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO (EMBRAPA). **Cultivo do Arroz de Terras Altas no Estado de Mato Grosso.** Sistemas de Produção, Setembro de 2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/producao\\_sementes.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/producao_sementes.htm)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2010/2011**. AGOSTINI, I.; VIEIRA, L. M. Disponível em: <[http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese\\_2011/Arroz%20sintese%202011.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2011/Arroz%20sintese%202011.pdf)>. Acesso em: 05 mai. 2013.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, **INC On-line**. Disponível em: <[www.britannica.com/EBchecked/topic-art/502259/164/the-outer-layer-and-internal-structures-of-a-rice-grain](http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/502259/164/the-outer-layer-and-internal-structures-of-a-rice-grain)>. Acesso em: 13 mar. 2014.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 648-656, 2000.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A. N.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 317, p. 1-22, 2012.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.43, n.2, p. 211-8, 2009.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 393-395, 1999.

FELDMANN, K. A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 162-7, 2001.

FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J; C. M; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p.1438-1443, 2009.

FINOCCHIARO, F.; FERRARI, B.; GIANINETTI, A.; DALLÁSTA, C.; GALAVERNA, G.; SCAZZINA, F.; PELLEGRINI, N. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. **Nutrition Food Research**, v. 51, n. 8, p. 1006-1019, 2007.

FOLIN, C.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophan determination in protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627-650, 1927.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO)**. Disponível em: <<http://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 07 abr. 2013.

GALVANI, F., GAERTNER, E. **Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta**. Circular Técnica, n. 63, 2006.

GIADA, M. L. R. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos vegetais e bebidas. **Dimetria: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 9, n. 1, p. 137-146, 2014.

GOFFMAN, F. D.; BERGMAN, C. J. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1235-1240, 2004.

GOMIS, D. B.; PALOMINO, N. F.; ALONSO, J. J. M. Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in apple juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 426, n. 1, p. 111–117, 2001.

GRUBER, J.; SCHAFFER, S.; HALLIWELL, B. The mitochondrial free radical theory of ageing – where do we stand? **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6554-6579, 2008.

GUNARATNE, A.; WU, K.; LI, D.; BENTOTA, A.; CORKE, H.; CAI, I. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1153–1161, 2013.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 40 ed., Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidants: Molecules, medicines and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p.561-564, 2010.

HARMAN, D.; EDDY, D. E. Free radical theory of aging: beneficial effect of adding antioxidants to the maternal mouse diet on life span of offspring: possible explanation of the sex difference in longevity. **Age**, v. 2, p. 109-122, 1979.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 9, p. 527-584, 2002.

HEINEMANN, R. J. B., FAGUNDES, P. L.; PINTO, E. A.; PENTEADO, M. V. C.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 287-296, 2005.

HOLDEN, J. M.; BHAGWAT, S. A.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; DWYER, J. T.; PETERSON, J.; BEECHER, G. R.; ELDRIDGE, A. L.; BALENTINE, D. Development of a database of critically evaluated flavonoids data: application of USDA's data quality evaluation system. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 8, p. 829-844, 2005.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietaty flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chemistry Toxicology**, v.37, n.9, p. 937-942, 1999.

HYUN, J. W.; CHUNG, H. S. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2213-2217, 2004.

ICHIKAWA, H.; ICHIYANAGI, T.; XU, B., YOSHII, Y.; NAKAJIMA, M.; KONISHI, T. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. **Journal of Medicinal Food**, v. 4, n. 4, p. 211-218, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020p. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)>. Acesso em: 01 jun. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 17 mai. 2013.

JAVIER, Q. J. Let's promote brown rice to combat hidden hunger. Rice Today: **Rice Research Institute**, v. 1, n. 3, 2004, 38p.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurize Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition. In: Rice: chemistry and technology. **American Association of Cereal Chemists**, Cap. 2, p. 17-57, 1985.

JULIANO, B. O. **Rice in human nutrition**. Rome: FAO, 1993.

JULIANO, B. O. **Rice Chemistry and Quality**. Philippines: Island Publishing House, 2003.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KORUS, J.; GUMUL, D.; CZECHOWSKA, K. Effect of extrusion on the phenolic composition and antioxidant of dry beans of *Phaseolus vulgaris* L. **Bio Food Tech**, v. 45, p.139-146, 2007.

KUZUHARA, T.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 261, p. 12-20, 2008.

LI, S.; LI, S-K.; GAN, R-Y.; SONG, F-L.; KUANG, L.; LI, H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 289-298, 2013.

LING, W. H.; WANG, L. L.; MA, J. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. **Journal of Nutrition**, v. 132, n.1, p. 20-26, 2002.

LIU, R.H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n.3, p. 207–219, 2007.

LUISA JUSTO, M.; CANDIRACCI, M.; DANTAS, A. P.; SOTOMAYORA, M. A.; PARRADO, J.; VILAD, E.; HERRERA, M. D.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R. Rice bran enzymatic extract restores endothelial function and vascular contractility in obese rats by reducing vascular inflammation and oxidative stress. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1453-1461, 2013.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Total phenolics and anthocyanins in grape juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MASSARETTO, I. L. **Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de arroz integral na inibição da enzima conversora de angiotensina I e da  $\alpha$ -amilase**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

MASSARETTO, I. L.; ALVES, M. F. M.; MIRA, N. V. M.; CARMONA, A. K. C.; MARQUEZ, U. M. L. Phenolic compounds in raw and cooked Rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p.236-240, 2011.

MATOS, A. D.; OLIVEIRA, B. P.; RAMOS, R. C. S. Avaliação de compostos fenólicos de cultivares de arroz. In: III Salão de Iniciação Científica e Desenvolvimento Tecnológico do IRGA - SICDT, 2013, Cachoeirinha. **Anais...** Instituto Rio Grandense de Arroz, 2013.

MATSUE, Y.; OGATA, T. Physicochemical and mochi-making properties of the native red and black-kerneled glutinous rice cultivars. **Plant Production Science**, v. 1, n. 2, p. 126-133, 1998.

MATSUO, T.; HOSHIKAWA, K. Science of the rice plant: Morphology. **Food and Agriculture Policy Research Center**, v. 1, p. 161-186, 1993.

- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 36, n.1, p. 1-11, 2002.
- MIN, B.; GU, L.; MCCLUNG, A. M.; BERGMAN, C. J.; CHEN, M. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. **Food Chemistry**, v. 133, p. 715–722, 2012.
- MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFERMARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.4, p. 994-1002, 2008.
- MIRA, N. V. M.; MASSARETTO, I. L.; PASCUAL, C. S. C. I.; MARQUEZ, U. M. L. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian Rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 405-409, 2009.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211–219, 2004.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145 -171, 2001.
- MOYER, R. A.; HUMMER, K.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.50, p.519-525, 2002.
- NAM, Y. J.; NAM, S. H.; KANG, M. Y. Cholesterol-lowering efficacy of unrefined bran oil from the pigmented black rice (*Oryza sativa* L cv. Suwon 415) in hypercholesterolemic rats. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 457-463, 2008.
- NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, 2009.
- NITZKE, J. A.; BIEDRZYCKI, A. **Terra de arroz**. Porto Alegre: ICTA-UFRGS, 2007.
- OKI, T.; MASUDA, M.; KOBAYASHI, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; SUDA, I.; SATO, T. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7524-7529, 2002.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.*** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 5036-5040, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. **Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parâmetros de riesgo cardiovascular en humanos.** 2007. 244f. Tesis (Doctoral) - Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Departamento de Química Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid – UAM, Madrid, ESP, 2007.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Varela, 2005. 95p.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**, n. 127, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science Food Agriculture**, v.76, p. 270-276, 1998.

SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J.; BETA, T. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. **Food Chemistry**, v. 143, p. 90-96, 2014a.

SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J.; BETA, T. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 211-218, 2014b.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHEN, Y.; JIN, L.; XIAO, P.; LU, Y.; BAO, J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 106-111, 2009.

SHOTWELL, M.A.; LARKINS, B.A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. **The Biochemistry of Plants: a Comprehensive Treatise**, v. 15, p. 297-345, 1989.

SILVEIRA, R. D. D.; SANTOS, K. F. N.; DIDONET, C. C. G. M.; DIDONET, A. D.; BRONDANI, C. Proteínas de reserva de acessos de coleção nuclear de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1441-1447, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-179, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOARES, S.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 6726-6735, 2007.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz Irrigado: Recomendações da Pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre: SOSBAI, 188 p., 2010.

SOBRATTEE, M. A; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMAA, A.; ARUOMAB, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

SOUZA, R. A. M.; OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; ALENCAR, S. M. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 229-236, 2011.

SPOHR, A. P. C.; MATOS, A. D.; RAMOS, R. C. S. Avaliação de compostos fenólicos em diferentes tempos de embebição de feijão preto cru (*Phaseolus vulgaris* L.). In: XXI Mostra de Iniciação Científica Tecnológica UNISINOS, 2014, São Leopoldo. **E-book**, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2014

STANNER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N.; BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 407-422, 2004.

SUJATHA, S. J.; AHMAD, R.; BHAT, P. R. Physicochemical properties and cooking qualities of two varieties of raw and parboiled rice cultivated in the costal region of Dakshina Kannada, India. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 211-216, 2004.

SWEENEY, M. T.; THOMSON, M. J.; PFEIL, B. E.; MCCOUCH, S. Caught red handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, v.18, p. 283-294, 2006.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 317-323, 2005.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15 p. 4808-4813, 2004.

TOMÁS-BARBERAN, F.; ESPÍN, J. C. compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-9, 2012.

TRIANAPHYLLOU, K.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of Lamiaceae. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 313–317, 2001.

XIA, M.; LING, W. H.; MA, J.; KITTS, D. D.; ZAWISTOWSKI, J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 744-751, 2003.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 17-27, 2008.

WALTER, M. **Composição química e propriedades antioxidantes de grãos de arroz com pericarpo marrom-claro, vermelho e preto**. 2009. 121f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, 2009.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 371-377, 2011.

WALTER, M.; MARCHESAN, E.; MASSONI, P. F. S.; SILVA, L. P.; SARTORI, G. M. S.; FERREIRA, R. B. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 698-703, 2013.

YAWADIO, R.; TANIMORI, S.; MORITA, N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1644-1653, 2007.

YU, P.; YEO, A. S-L.; LOW, M-I.; ZHOU, W. Identifying key non-volatile compounds in ready-to-drink green tea and their impact on taste profile. **Food Chemistry**, v. 155, p. 9-16, 2014.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p. 849-868, 2002.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, v.87, p. 401-406, 2004.

ZLOTOGORSKI, A.; DAYAN, A.; DAYAN, D.; CHAUSHU, G.; SALO, T.; VERED, M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol. **Oral Oncology**, v. 49, p. 502–506, 2013.