UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de
arroz integral na inibição da enzima conversora de
angiotensina I e da α -amilase

Isabel Louro Massaretto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Massaretto, Isabel Louro
M414e Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de arroz
integral na inibição da enzima conversora de angiotensina I e
da α -amilase / Isabel Louro Massaretto. -- São Paulo, 2009.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.
Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Bromatologia 2. Alimento : Composto fenólico : Ciência
dos alimentos 3. Arroz : Ciência dos alimentos I. T. II. Lanfer
Marquez, Ursula Maria, orientador.

641 CDD

Isabel Louro Massaretto

Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de arroz
integral na inibição da enzima conversora de angiotensina I
e da α -amilase

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez
orientador/presidente

José Alberto Noldin

1º. examinador

Jorge Mancini Filho

2º. examinador

São Paulo, 26 de março de 2009.

Dedico este trabalho ao meu marido Gustavo
por incentivar continuamente meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À professora Ursula Maria Lanfer Marquez pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho e, sobretudo pela importante contribuição para o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal;

À professora e amiga Catharina Maria Wilma Brandi minha mais profunda gratidão pela constante demonstração de confiança e carinho e pelas oportunidades colocadas em meu caminho como verdadeiras bênçãos. E ainda, pelos valores profissionais e humanos que me inspiram a buscar meu crescimento contínuo;

À professora Adriana Karaoglanovic Carmona pela boa vontade em oferecer seu laboratório e auxiliar com seu conhecimento durante os ensaios enzimáticos da ECA;

Ao Márcio Alves pela grande receptividade e pela generosa contribuição durante a realização das análises com a ECA;

Ao professor Rodrigo Cunha pelo incentivo e pelas sugestões durante os ensaios de inibição da ECA;

À minha grande amiga Adriana de Souza Leoni pelo dom de deixar meus dias mais leves e alegres e também por ter sido fundamental para a realização deste sonho que parecia distante;

À amiga Ligia Ajaime Azzalis pela imensa generosidade durante meus primeiros passos na carreira acadêmica. Pela boa vontade e carinho em todos os momentos;

À amiga Marisa Regina Veiga pela demonstração de carinho e confiança e pela importante oportunidade profissional concedida. Pelas palavras de estímulo constantes;

À Beatriz Pinn pelo incentivo inicial em desenvolver minha pesquisa na área de ciência dos alimentos e por todo material fornecido com desprendimento para meus estudos;

Às amigas Luciana, Illana, Bárbara pelo aconchego e amizade nos momentos difíceis e pelas risadas e alegrias compartilhadas nos momentos de descontração;

A Priscila, Lílían e Helena um agradecimento especial pela importante contribuição na realização de diversas análises durante o desenvolvimento deste trabalho;

A Eli, Flávia e Linda pelas conversas animadas que me preencheram com alegria e motivação;

Aos colegas de laboratório Alexandre, Cristina, Daniela, Juliana, Nádia, Rosa, Simone e Vanilda, obrigada pela companhia, colaboração e momentos de alegria;

Aos meus familiares, cada um a sua maneira, por desejarem e torcerem sempre por minha felicidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de mestrado, processo nº 2006/58559.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio à pesquisa (Edital MCT/CNPq 014/2008).

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI) / Estação Experimental de Itajaí, em especial ao pesquisador José Alberto Noldin, pelo fornecimento das amostras de arroz.

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) pelo fornecimento da amostra de arroz preto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Arroz integral.....	4
2.2 Genótipos de arroz com pericarpo não-pigmentado e pigmentado.....	6
2.3 Compostos bioativos do arroz integral.....	8
2.4 Compostos fenólicos em arroz integral.....	9
2.4.1 Ácidos fenólicos.....	9
2.4.2 Flavonóides.....	12
2.5 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos.....	14
2.6 Teores de compostos fenólicos e impacto do cozimento do arroz	18
2.7 Efeitos potenciais dos fenólicos no auxílio do controle da diabetes.....	20
2.8 Efeitos potenciais dos fenólicos no controle da hipertensão.....	22
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Amostras.....	28
4.2 Métodos Analíticos.....	30
4.2.1 Cozimento das amostras.....	30
4.2.2 Moagem do arroz e determinação da umidade	30
4.2.3 Extração e quantificação dos fenólicos solúveis e insolúveis.....	31
4.2.3.1 Extração dos fenólicos solúveis em água.....	31

4.2.3.2 Extração dos fenólicos solúveis em etanol 80%.....	31
4.2.3.3 Hidrólise e extração dos fenólicos insolúveis.....	32
4.2.3.4 Quantificação dos compostos fenólicos.....	33
4.2.4 Extração dos compostos fenólicos para os ensaios enzimáticos.....	33
4.2.4.1 Extração dos compostos fenólicos solúveis.....	33
4.2.4.2 Hidrólise e extração dos compostos fenólicos insolúveis.....	34
4.2.5 Ensaio da inibição da ECA <i>in vitro</i>	34
4.2.6 Ensaio da inibição da α -amilase <i>in vitro</i>	37
4.2.7 Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Teores de compostos fenólicos solúveis: escolha do solvente de extração.....	41
5.2 Teores de compostos fenólicos: influência da pigmentação e do cozimento.....	42
5.2.1 Fenólicos solúveis.....	42
5.2.2 Fenólicos insolúveis.....	48
5.2.3 Fenólicos totais.....	52
5.3 Teores de compostos fenólicos em arroz preto.....	55
5.4 Inibição da ECA pelos extratos aquosos.....	58
5.5 Inibição da ECA pelos fenólicos de arroz não-pigmentado e pigmentado.....	59
5.5.1 Inibição da ECA por fenólicos solúveis.....	59
5.5.2 Inibição da ECA por fenólicos insolúveis.....	63
5.6 Inibição da ECA pelos fenólicos do arroz preto.....	65
5.7 Determinação do IC ₅₀ dos compostos fenólicos de arroz pigmentado.....	67
5.8 Inibição da α -amilase pelos fenólicos de arroz não-pigmentado e pigmentado.....	73
5.9 Inibição da α -amilase pelos fenólicos do arroz preto.....	75
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura de um grão de cereal integral.....	5
Figura 2	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos.....	10
Figura 3	Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.....	10
Figura 4	Estruturas químicas das principais classes de flavonóides.....	13
Figura 5	Prevalência de diabetes no mundo.....	21
Figura 6	Mecanismo vasoconstritor da renina-angiotensina para o controle da pressão arterial.....	24
Figura 7	Amostras de genótipos pigmentados de arroz integral.....	29
Figura 8	Amostras de genótipos não-pigmentados de arroz integral.....	29
Figura 9	Fluxograma de análise da atividade da ECA.....	35
Figura 10	Curva de calibração da maltose (g/mL).....	37
Figura 11	Curva de saturação da α -amilase.....	38
Figura 12	Fluxograma de análise da atividade da α -amilase.....	39
Figura 13	Teor de fenólicos solúveis em extratos aquosos e hidroalcoólicos	41
Figura 14	Teores médios de fenólicos solúveis nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento	45
Figura 15	Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos solúveis.....	47
Figura 16	Teores médios de fenólicos insolúveis nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento.....	49
Figura 17	Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos insolúveis.....	51
Figura 18	Teores médios de fenólicos totais nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento.....	53

Figura 19	Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos totais.....	55
Figura 20	Efeito do cozimento no teor de fenólicos totais de genótipos pigmentados (vermelho e preto).....	56
Figura 21	Inibição média da ECA por fenólicos solúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento.....	61
Figura 22	Inibição da ECA por fenólicos solúveis de genótipos pigmentados.....	62
Figura 23	Inibição média da ECA por fenólicos insolúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento.....	65
Figura 24	Inibição da ECA por fenólicos solúveis de genótipos pigmentados (vermelho e preto).....	66
Figura 25	Curva de determinação do IC ₅₀ do captopril.....	68
Figura 26	Curvas de determinação do IC ₅₀ para os fenólicos solúveis dos genótipos pigmentados: ITJ 8 cru, ITJ 8 cozido, ITJ 31 cru, ITJ 31 cozido, ITJ 80 cru e ITJ80 cozido.....	69
Figura 27	IC ₅₀ médio dos grupos de arroz pigmentado vermelho cru e cozido..	70
Figura 28	Curvas de determinação do IC ₅₀ para os fenólicos solúveis de arroz preto cru e cozido.....	71
Figura 29	Estimativa dos valores de IC ₅₀ em massa de arroz para amostras cruas e cozidas genótipos ITJ 8, ITJ 31 e ITJ 80 e arroz preto.....	72
Figura 30	Inibição da α -amilase por fenólicos solúveis de arroz cru pigmentado.....	74
Figura 31	Inibição média da α -amilase por fenólicos solúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da pressão sanguínea de adultos.....	23
Tabela 2	Teores de fenólicos solúveis em genótipos de arroz integral.....	43
Tabela 3	Teores de fenólicos insolúveis em genótipos de arroz integral.....	48
Tabela 4	Teores de fenólicos totais em genótipos de arroz integral.....	52
Tabela 5	Inibição da ECA por fenólicos solúveis de arroz integral.....	59
Tabela 6	Inibição da ECA por fenólicos insolúveis de arroz integral.....	63
Tabela 7	Inibição da α -amilase por fenólicos solúveis de arroz integral.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg eq. AF/g	µg equivalentes de ácido ferúlico por grama
µg eq. AG/g	µg equivalentes de ácido gálico por grama
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNS	Ácido dinitrossalicílico
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FI	Fenólicos insolúveis
FS	Fenólicos solúveis
FT	Fenólicos totais
IC₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática
IRGA	Instituto Rio Grandense do Arroz
UAF/min	Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto

MASSARETTO, I. L. **Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de arroz integral na inibição da enzima conversora de angiotensina I e da α -amilase**. São Paulo, 2009. 88 p.

O arroz (*Oryza sativa* L.), principal alimento para cerca de metade da população mundial, é consumido principalmente na forma polida. Contudo, o arroz integral vem se destacando, devido principalmente aos compostos bioativos presentes nas camadas mais externas do grão. Os benefícios à saúde são atribuídos, em parte, à sua capacidade de combater radicais livres e exercer atividades biológicas, tais como a inibição de determinadas enzimas. Neste trabalho foram analisados os teores de compostos fenólicos totais (FT), solúveis (FS) e insolúveis (FI) e avaliado o efeito do cozimento de 17 genótipos de arroz integral, sete com pericarpo pigmentado e dez genótipos não-pigmentados. Ainda foi avaliada a inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e da α -amilase por esses compostos, no arroz cru e cozido. O arroz pigmentado se mostrou rico em compostos fenólicos, em média da ordem de 4200 μg eq. ácido ferúlico/g, devido aos seus altos teores de FS, constituídos principalmente por antocianinas e proantocianidinas. Os FI, representados principalmente pelos ácidos fenólicos contribuíram com apenas 20% dos compostos fenólicos totais. O arroz não-pigmentado contém, em média, ao redor de 1000 μg eq. ácido ferúlico/g, distribuídos quase equitativamente entre a fração solúvel e insolúvel. O cozimento do arroz provocou redução nos teores de FT e alteração na proporção entre FS e FI. Essas alterações foram mais pronunciadas no arroz com pericarpo vermelho, afetando principalmente a fração solúvel. O arroz preto, contudo, manteve a proporção entre FS e FI após o cozimento. A α -amilase não foi inibida de forma significativa pelos fenólicos das amostras de arroz cozido. O arroz pigmentado inibiu mais fortemente a ECA do que o arroz não-pigmentado, levando a crer que a pigmentação seja um fator importante. No entanto, entre os diferentes genótipos pigmentados, o perfil de fenólicos parece ser o fator determinante para a maior ou menor atividade inibitória. O cozimento do arroz reduziu significativamente a inibição da ECA pelos fenólicos, fato observado principalmente nos genótipos vermelhos, devido à diminuição dos teores de FS e da capacidade inibitória dos fenólicos presentes. O arroz preto se destacou por ter o maior teor de fenólicos solúveis e a maior ação inibidora da ECA, após o cozimento.

Palavras chave: arroz integral, compostos fenólicos, cozimento, enzima conversora de angiotensina I, α -amilase

MASSARETTO, I. L. **Cooking effect and inhibition of angiotensin I converting enzyme and α -amylase by compound phenolics from brown rice.** São Paulo, 2009. 88 p.

Rice (*Oryza sativa* L.) sustains at present about half of the world's population. Consumption is mainly in its milled form, but brown rice has prompted further research due to bioactive compounds present in the pericarp of the grain. Some of the positive health effects have been attributed to radical scavenging activity and other biological effects such as inhibition of certain enzymes. In this study it was analyzed the contents of total, soluble and insoluble phenolic compounds of 17 different genotypes of brown rice as well as the effect of cooking. Seven genotypes had pigmented pericarp and ten were non-pigmented. In addition, the extracts from crude and cooked rice were tested for their capacity to inhibit the angiotensin I (ACE) converting enzyme and α -amylase activities. Pigmented rice genotypes were highest in phenolic compounds, with an average of about 4200 μg ferulic acid eq./g, due to their high contents of soluble phenolics, mostly represented by anthocyanins and proanthocyanidins. Insoluble phenolics, represented mainly by phenolic acids, contributed with only 20% of total phenolics. Non-pigmented rice showed overall lower levels of phenolics. The mean content was about 1000 μg ferulic acid eq./g, almost equally distributed between the soluble and insoluble fractions. Levels of total phenolics were significantly reduced by rice cooking and proportions between soluble and insoluble fractions were altered. These alterations were more pronounced for pigmented rice, and soluble phenolics were the most affected. However, after cooking, black rice was the only that maintained the original proportion between soluble and insoluble phenolics. Alpha-amylase was not significantly inhibited by phenolics after cooking. Pigmented rice showed a potent inhibition of ACE, much higher than of non-pigmented rice, which seems to indicate that color of the pericarp is an important factor. Nevertheless, different profiles of phenolic compounds may explain why individual pigmented genotypes with similar phenolic levels can have different ACE inhibiting capacities. Rice cooking reduced significantly the inhibition of ACE by phenolics, which feature was more pronounced in pigmented rice due to the reduction of soluble phenolics and the activity of individual phenolics. Among pigmented rice, the highest soluble phenolic content and the most potent ACE inhibition after cooking was observed for black rice turning it the most distinguished notable.

Key-words: brown rice, phenolic compounds, cooking, angiotensin I converting enzyme, alpha-amylase.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado e consumido em todos os continentes e desempenha papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social, sendo a maior fonte de emprego, renda e nutrição em muitas regiões do planeta. É considerado o principal alimento em vários países da Ásia e Pacífico, da América do Sul e da África, constituindo alimentação básica para cerca de 2,5 bilhões de pessoas. O arroz representa um quarto da produção mundial de grãos e é responsável por 20% do suprimento calórico da dieta, enquanto o trigo e o milho provêm 19% e 5%, respectivamente (FAO, 2004^a).

O Brasil se destaca como o maior produtor fora do continente asiático, ocupando a 9ª posição geral, o que corresponde a 2,2% da produção mundial e 50% da produção da América Latina. Possui grande potencial para aumentar a colheita de arroz, seja expandindo a área cultivada ou aumentando a produtividade nas diferentes regiões orizícolas (CONAB, 2007). No Brasil, o cereal ocupa o terceiro lugar na produção de grãos, ficando somente atrás da soja e do milho (EMBRAPA, 2007).

Assim, como na maioria dos países, no Brasil o arroz é consumido principalmente na forma polida, sendo esta a forma que consta nas estatísticas de produção, consumo e comércio globalizado.

Contudo, o arroz integral que é o resultado da retirada da casca do grão, vem chamando a atenção de pesquisadores, devido principalmente à presença de compostos bioativos contidos em camadas situadas entre a casca e o endosperma. O arroz integral apresenta cerca de 10% de farelo, constituindo fonte de fibras, vitaminas do complexo B e de compostos fitoquímicos que

contêm várias classes de antioxidantes (CHARALAMPOPOULOS *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de grãos integrais está associado à redução do risco de doenças crônicas, tais como doenças cardíacas, câncer, diabetes e obesidade. Os benefícios à saúde são atribuídos em parte à sua composição fitoquímica específica, capaz de combater os radicais livres, responsáveis pelo dano a diversas biomoléculas, e de reduzir as taxas séricas de colesterol (ADOM & LIU, 2002; BERGER *et al.*, 2005).

Pesquisas indicam que o arroz, além do γ -orizanol e homólogos da vitamina E, contêm um amplo espectro de compostos fenólicos. Nos genótipos não-pigmentados predominam os ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos, principalmente o ácido ferúlico e diferulatos, e nos genótipos pigmentados ainda são encontradas antocianinas e proantocianidinas.

Os compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados nos vacúolos celulares, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados covalentemente a estruturas da parede celular (NACZK & SHAHIDI, 2004). Os estudos de compostos fenólicos do arroz são escassos e poucos pesquisadores levam em consideração os fenólicos insolúveis, tampouco é considerado o efeito do cozimento do arroz sobre os teores originais dessas substâncias, o que se torna fundamental do ponto de vista de atividade biológica e nutricional.

Os potenciais efeitos biológicos benéficos para a saúde humana que vêm sendo atribuídos aos compostos fenólicos estão relacionados às suas propriedades antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica, além da habilidade de modular algumas atividades enzimáticas (LIU, 2004; CHUN *et al.*, 2005; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que compostos fenólicos, principalmente antocianinas e proantocianidinas, extraídos de plantas utilizadas tradicionalmente como anti-hipertensivas apresentam atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina I (ECA). Esta enzima tem importante papel na regulação da pressão sanguínea (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001). Paralelamente, extratos herbais de plantas consideradas hipoglicêmicas têm demonstrado a capacidade, atribuída aos compostos fenólicos, de inibir a atividade enzimática da α -amilase, o que levaria a uma redução da taxa de absorção de glicose e conseqüentemente a um aumento mais lento da glicose plasmática pós-prandial (GAD *et al.*, 2006).

Embora os estudos com alimentos ainda sejam escassos, alguns já evidenciam a associação entre determinados compostos fenólicos e atividade inibitória de enzimas amilolíticas e da ECA *in vitro* (MCCUE *et al.*, 2005; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007).

Assim, diante da importância do arroz na alimentação humana e tendo em vista a falta de dados em relação aos conteúdos de compostos fenólicos, o efeito do cozimento e a relação dos fenólicos do arroz com a inibição da ECA e da α -amilase, consideramos importante desenvolver um trabalho abordando estes aspectos.

Portanto, foram avaliados os teores de compostos fenólicos em diferentes genótipos de arroz não-pigmentado e pigmentado (preto e vermelho), o impacto do cozimento sobre esses teores, bem como a capacidade dessas substâncias inibirem a α -amilase e a ECA *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz integral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento que faz parte do hábito alimentar de muitas culturas, sendo consumido por cerca de 2,5 bilhões de pessoas (EMBRAPA, 2007). A Ásia é o continente responsável pelo consumo e produção de 90% do arroz mundial, sendo a China o maior produtor do mundo com 118 mil toneladas de arroz por ano, o que corresponde a 30% da produção mundial (FAO, 2004^b).

A América Latina é o segundo maior produtor e o terceiro maior consumidor de arroz. No Brasil, o arroz faz parte da alimentação básica da população sendo consumidos ao redor de 74 a 76 kg de arroz em casca ou 34 a 40 kg de arroz beneficiado por habitante em um ano. O país ocupa a nona posição na produção mundial e a primeira posição na América Latina (EMBRAPA, 2007).

No Brasil, como na maioria dos países, o arroz é consumido principalmente na forma polida (70-80%), sendo esta a forma que consta nas estatísticas de produção, consumo e comércio globalizado. Contudo, o consumo do arroz parboilizado vem aumentando gradualmente e de acordo com dados divulgados pelo IRGA, contribui com 25% do consumo total de arroz (IRGA, 2005).

Observa-se também uma tendência mundial de aumento no consumo de grãos integrais, impulsionada pela contínua divulgação de seus benefícios à saúde, associados principalmente, à redução do risco de doenças crônicas, tais como doenças cardíacas, câncer, diabetes e obesidade (SLOAN, 2005).

Os grãos de cereais após a retirada da casca podem ser divididos anatomicamente em três partes: embrião, endosperma e pericarpo (farelo). O endosperma corresponde a aproximadamente 80% do grão e é constituído por amido e por uma camada mais externa, denominada subaleurona, que contém proteínas (SLAVIN, 1999). Envolvendo o endosperma, existe uma fina camada de uma a cinco células, denominada pericarpo ou farelo (SIDHU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2002) (Figura 1). É nesta camada que estão localizados os principais compostos bioativos dos cereais integrais. Os grãos de arroz integral ainda apresentam cerca de 10% de farelo, fazendo com que também constituam uma importante fonte destes compostos bioativos da dieta.

Figura 1. Estrutura de um grão de arroz integral (Fonte: www.bernas.com.my/process.htm)

Durante o beneficiamento do arroz, o pericarpo é removido junto com a casca, o que leva à perda desses fitoquímicos nele localizados.

2.2 Genótipos de arroz com pericarpo não-pigmentado e pigmentado

Os genótipos de arroz com pericarpo não-pigmentado são predominantes em termos de produção e consumo no mundo, representando aproximadamente 85% do total. Genótipos não-pigmentados foram selecionados no passado, provavelmente em função de sua melhor aceitação, e hoje são produzidos em larga escala para fins comerciais (OKI *et al.*, 2002).

Considerando o arroz pigmentado, os tipos mais comuns são os que apresentam pericarpo preto e vermelho, sendo cultivados principalmente no sul da Ásia e em países como Itália, Grécia e Estados Unidos e são principalmente encontrados como variedades selvagens. O arroz pigmentado há muito tempo vem sendo consumido no Japão e China e, nestas regiões, é popularmente considerado um alimento saudável (FINOCCHIARO *et al.*, 2007).

No Brasil, o arroz vermelho, pouco conhecido, é cultivado em áreas isoladas no centro-oeste, no norte e no nordeste, onde recebe também os nomes de arroz da terra, arroz de veneza, arroz maranhão entre outros. É no sertão do estado da Paraíba que se concentra a maior produção de arroz vermelho do Brasil e este é plantado principalmente por pequenos agricultores, utilizando sistemas de produção bastante rudimentares (EMBRAPA, 2008). Na Paraíba, em particular, é considerado um ingrediente comum da culinária regional mas, fora dessas regiões, o arroz vermelho é visto como uma planta daninha a ser eliminada das lavouras comerciais de arroz não-pigmentado por ser de difícil controle, causando a contaminação da cultura e conseqüente redução da produtividade.

O arroz preto, por sua vez, apesar do baixo consumo, restrito a naturalistas e à alta gastronomia, apresenta um mercado em expansão no Brasil, em função da divulgação de suas propriedades nutricionais.

Atualmente, o arroz pigmentado vem ganhando atenção especial de pesquisadores em função de seus potenciais benefícios à saúde, em grande parte, atribuídos à sua propriedade antioxidante, capaz de fornecer proteção contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres (HU *et al.*, 2003). Estas substâncias são geradas no corpo humano por várias fontes e são necessárias para o metabolismo normal, desempenhando importante papel nas funções bioquímicas e fisiológicas do organismo. Contudo, quando presentes em excesso, podem causar danos. Todos os componentes das células são suscetíveis à ação dos radicais livres, porém a membrana celular é a mais prejudicada em decorrência da lipoperoxidação, que pode ser associada aos mecanismos de câncer, envelhecimento, entre outros (SLAVIN, 2003).

Tanto o arroz preto como o vermelho são associados a uma notável atividade antioxidante *in vitro* em função da presença de compostos bioativos específicos, ausentes nas variedades não-pigmentadas (FINOCCHIARO *et al.*, 2007). Alguns estudos ainda demonstram que a substituição do arroz branco por arroz preto na dieta diminui o stress oxidativo *in vivo*. Ling *et al.* (2001) observaram que coelhos hipercolesterolêmicos apresentavam aumento da concentração de lipoproteína de alta densidade e diminuição do tamanho das lesões ateroscleróticas, quando alimentados com dieta contendo arroz preto.

2.3 Compostos bioativos do arroz integral

Pesquisas indicam que o arroz integral, além da vitamina E e do γ -orizanol, contém um largo espectro de compostos fenólicos, que complementam aqueles consumidos por meio de frutas e vegetais (GOFFMAN & BERGMAN, 2002).

Os tocoferóis e tocotrienóis, homólogos da vitamina E, apresentam potente ação antioxidante e desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônico-degenerativas, doenças cardiovasculares e também atuam na prevenção do aparecimento de alguns tipos de tumores (BRAMLEY *et al.*, 2000; QURESHI *et al.*, 2001).

O γ -orizanol, por sua vez, não é uma substância única e sim uma mistura de ácidos ferúlicos esterificados com esteróis ou álcoois triterpênicos (ROGERS *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 2003). Um dos mais divulgados benefícios à saúde, associado ao γ -orizanol, é sua ação hipocolesterolêmica e antioxidante (RONG *et al.*, 1997; XU & GODBER, 1999; XU *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2002; BERGER *et al.*, 2005). Os tocoferóis, tocotrienóis e o orizanol podem ser isolados dos extratos lipossolúveis do farelo e do arroz integral.

Os principais compostos fenólicos do arroz não-pigmentado são os ácidos fenólicos; nos genótipos pigmentados, além dos ácidos fenólicos, são encontrados compostos polifenólicos como os flavonóides. Estas substâncias têm recebido atenção pelos seus potenciais efeitos biológicos benéficos para a saúde humana, a literatura descreve propriedades antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica, além de sua habilidade

para modular algumas atividades enzimáticas no interior das células (LIU, 2004; CHUN *et al.*, 2005; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005).

Contudo, pouco se sabe sobre o efeito do cozimento no perfil, teores e solubilidade destes compostos presentes em diferentes genótipos de arroz.

2.4 Compostos fenólicos em arroz integral

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários e constituem a maior classe de fitoquímicos do reino vegetal. Caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis aromáticos e ao menos uma hidroxila. Geralmente são subdivididos em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos. No arroz integral os principais compostos fenólicos pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos e dos flavonóides.

2.4.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e pelo menos uma hidroxila e/ou metoxila na molécula. Os compostos pertencentes a essa classe podem ser divididos em derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (SOARES, 2002).

A quantidade de derivados do ácido hidroxibenzóico livres, contida nos vegetais comestíveis, é geralmente muito baixa (MANACH *et al.*, 2004). Normalmente fazem parte de estruturas complexas como taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagiotaninos) e incluem os ácidos salicílico, gentílico, gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecóico, vanílico e sirínico, com estrutura básica de sete átomos de carbono, C6-C1 (Figura 2).

$R_1 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Salicílico; $R_1 = R_4 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Gentísico; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido *p*-Hidroxibenzóico; $R_2 = R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Protocatecólico; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Vanílico; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Gálico; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Siríngico

Figura 2. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (Fonte: SOARES, 2002).

Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos com nove átomos de carbono (C6-C3), sendo que três formam uma cadeia lateral. Esses compostos são mais comuns do que os ácidos hidroxibenzóicos e fazem parte dessa classe os ácidos *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (SOARES, 2002) (Figura 3).

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H} \rightarrow$ Ácido Cinâmico; $R_1 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido *o*-cumárico; $R_2 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido *m*-cumárico; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido *p*-cumárico; $R_2 = R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Caféico; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Ferúlico; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ Ácido Sinápico

Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos (Fonte: SOARES, 2002).

Informações sobre os compostos fenólicos do arroz integral ainda são limitados na literatura, embora os mais estudados nos genótipos não-

pigmentados sejam os ácidos fenólicos, sendo predominantes o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico (ZHOU *et al.*, 2004).

Nos genótipos pigmentados de pericarpo vermelho os ácidos ferúlico e *p*-cumárico também são os ácidos fenólicos predominantes, enquanto que no arroz preto o ácido protocatecóico é o principal ácido fenólico presente (MIRA *et al.*, 2008).

Do ponto de vista físico-químico, os ácidos fenólicos nos vegetais podem estar nas formas solúvel e insolúvel. Os solúveis podem encontrar-se na forma livre ou conjugada (esterificados a açúcares), compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares. Já os fenólicos insolúveis estão esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécticos ou hemicelulósicos, ligados à parede celular, (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Adom & Liu (2002) descreveram que os compostos fenólicos insolúveis contribuem com uma porção importante dos fenólicos totais em grãos, embora a maioria dos estudos quantifique somente os fenólicos solúveis. Logo, sua contribuição sobre a atividade antioxidante e atividade biológica em geral vem sendo subestimada (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2005).

Em um estudo prévio no laboratório de Análise de Alimentos do Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, realizado com as amostras utilizadas neste trabalho, os teores médios de ácidos fenólicos totais (solúveis e insolúveis) foram de 280 µg/g em base seca para os genótipos não-pigmentados de arroz integral. O grupo com pericarpo vermelho apresentou níveis de ácidos fenólicos semelhantes às amostras não-pigmentadas, enquanto o arroz preto apresentou teor de 755µg/g (MIRA *et al.*, 2008). Em um estudo com uma variedade de arroz não-pigmentado, Tian *et al.*, (2004)

obtiveram teor de ácidos fenólicos totais de 206 µg/g, valor inferior aos das amostras não-pigmentadas e vermelhas utilizadas neste trabalho.

2.4.2 Flavonóides

Os flavonóides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal. Estão presentes em diversas partes dos vegetais, 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 flavonóides consiste em dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbono (difenilpropano) que formam um anel heterocíclico oxigenado (anel C). Na substituição desse anel C padrão, resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (Figura 4). Substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (HOLLMAN & KATAN, 1999).

Nos genótipos pigmentados de arroz integral, além dos ácidos fenólicos, também são encontrados flavonóides, principalmente antocianinas e proantocianidinas.

As antocianinas, que correspondem à forma glicosilada das antocianidinas, são pigmentos encontrados em vacúolos do tecido da epiderme dos vegetais, conferindo coloração vermelha, azul ou roxa. São encontradas sob a forma de heterosídeos polihidroxilados ou polimetoxilados, derivados do íon flavínium (2-fenilbenzopirílium) (Figura 4).

Existem seis estruturas básicas mais comuns de antocianidinas que podem estar ligadas a diferentes açúcares, formando as antocianinas e com

variações no número de grupamentos hidroxilas e metoxilas no anel B (MCDUGALL *et al.*, 2005).

Figura 4. Estruturas químicas das principais classes de flavonóides (Fonte: MANACH *et al.*, 2004).

A variedade de antocianinas encontrada decorre da natureza e número de resíduos de açúcares ligados. Estes resíduos podem, ainda, serem substituídos por ácidos alifáticos, hidroxibenzóicos ou hidroxicinâmicos (ESCRIBANO-BAILÓN *et al.*, 2004). As antocianinas formam a classe majoritária dos compostos fenólicos encontrados nas variedades pigmentadas

de cereais, sendo a concentração presente proporcional à intensidade da cor (FARDET *et al.*, 2008).

Alguns estudos relatam que as antocianinas presentes no arroz preto apresentam potente poder sequestrante de radicais livres (LING *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2003; XIA *et al.*, 2003). Hu *et al.* (2003) identificaram a presença de antocianinas no pericarpo do arroz preto, particularmente a cianidina 3-glicose e a peonidina 3-glicose, que contribuíram na prevenção de danos ao DNA e da oxidação da LDL *in vitro*, em função de sua propriedade antioxidante.

Dentro da classe dos flavanóis, as proantocianidinas constituem pigmentos avermelhados, como a cianidina e delphinidina, e apresentam uma rica diversidade estrutural resultante de padrões de substituições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (ANGELO & JORGE, 2007). São também conhecidas como taninos condensados e podem ser dímeros, oligômeros ou polímeros de catequinas. É difícil estimar o teor de proantocianidinas nos alimentos porque esses compostos apresentam uma grande variedade de estruturas e pesos moleculares, uma vez que seu grau de polimerização costuma variar entre 4 e 11 (MANACH *et al.*, 2004). Hu *et al.* (2003) relacionaram a atividade sequestrante de radicais livres do arroz vermelho com a presença de proantocianidinas.

2.5 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

A absorção e o metabolismo dos compostos fenólicos são determinados primariamente pela sua estrutura química, conjugação com outras substâncias, grau de polimerização e solubilidade (KARAKAYA, 2004).

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos ainda é regida por outras variáveis, tais como metabolismo pela microflora intestinal, cinética plasmática,

natureza dos metabólitos circulantes, ligação à albumina, captação celular, metabolismo intracelular, acúmulo nos tecidos e excreção biliar e urinária. Todas essas variáveis dificultam a integração das informações e a relação de seus efeitos fisiológicos (MANACH *et al.*, 2005).

Um dos fatores que afetam a absorção é o peso molecular. Os fenólicos de menor peso molecular, em especial os ácidos fenólicos solúveis, parecem ser facilmente absorvidos no intestino delgado.

Outro fator é a glicosilação dos compostos fenólicos. Estes se encontram majoritariamente na forma glicosilada nos alimentos. A glicosilação afeta as propriedades química, física e biológica destes compostos, fazendo que sejam hidrofílicos demais para penetrar na parede intestinal por difusão passiva (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Ainda, a maioria dos glicosídeos resiste à hidrólise ácida no estômago, chegando, assim, intacta ao duodeno. O único mecanismo de transporte ativo descrito é o transportador Na^+ -dependente envolvido na absorção de ácidos hidroxicinâmicos no jejuno de ratos (ADER *et al.*, 1996). Isso implica que, para a absorção ocorrer, a parte hidrofílica da molécula precisa ser removida.

A concentração de compostos fenólicos no cólon pode chegar a centenas de micromols por litro (SCALBERT *et al.*, 2002) fazendo com que, junto com carotenóides, essas substâncias constituam os antioxidantes da dieta presentes no cólon, já que as vitaminas C e E são absorvidas nos segmentos superiores do intestino.

Tecidos humanos (mucosa intestinal e fígado) e fluidos biológicos (plasma, suco gástrico e fluido duodenal) não possuem esterases capazes de hidrolisar as ligações entre o ácido ferúlico e os carboidratos da parede celular dos vegetais, necessitando passar por clivagem por meio de xilanases e

esterases da microflora intestinal (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Algumas linhagens de bactérias envolvidas nesse processo vêm sendo identificadas (COUTEAU *et al.*, 2001). Este fato abre a possibilidade dos compostos fenólicos insolúveis serem absorvidos, ao menos parcialmente (BUCHANAN *et al.*, 1996).

Diversas classes dos flavonóides, como flavonóis, isoflavonas, flavonas e antocianinas estão presentes nos alimentos na forma de glicosídeos. Assim, o primeiro passo para metabolização desses compostos precisa ser a remoção do açúcar por glicosidases. Após a hidrólise, as agliconas passam a ser metabolizadas em vários ácidos aromáticos. O local da clivagem do anel heterocíclico pode ocorrer em diferentes pontos, dependendo da estrutura química da molécula. Assim, os flavonóis produzem principalmente ácido hidroxifenilacético, enquanto, flavonas e flavanonas, principalmente, ácido hidroxifenilpropiônico. Já os flavanóis geram majoritariamente, fenilvalerolactonas e ácidos hidroxifenilpropiônicos. Esses ácidos são posteriormente metabolizados em derivados do ácido benzóico (MANACH *et al.*, 2004).

A absorção das proantocianidinas difere da dos demais flavanóides devido ao alto peso molecular que limita a absorção no intestino delgado, pois os oligômeros maiores que trímeros parecem não ser absorvidos na forma nativa. Em estudos *in vitro*, utilizando monocamada de células Caco-2 como modelo de absorção no intestino delgado, foi demonstrado que apenas dímeros e trímeros de flavanóis são capazes de atravessar o epitélio intestinal (DEPREZ *et al.*, 2001). Dímeros de proantocianidinas já foram detectados em plasma humano e mostraram potente atividade antioxidante (SOOBRAATTEE *et al.*, 2005). Assim, as proantocianidinas, presentes em alta concentração nas

dietas ricas em polifenóis, podem exercer principalmente efeitos locais no trato gastrointestinal ou atividade mediada por ácidos fenólicos produzidos por meio da degradação microbiana. Essa atividade local apresenta grande importância, pois o intestino é particularmente exposto a agentes oxidantes e pode ser afetado por inflamação e inúmeras doenças, como câncer (HALLIWELL *et al.*, 2000).

Uma vez ingeridos, os compostos fenólicos são submetidos a três tipos de conjugação: metilação, sulfatação e glicuronidação. Cada uma dessas reações é catalisada por enzimas distintas. Algumas enzimas envolvidas apresentam polimorfismos e podem ser induzidas ou inibidas pela dieta. Os locais de expressão de cada enzima nos tecidos humanos determinam o metabolismo e a farmacocinética dos compostos fenólicos ingeridos (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000; ZHAO *et al.*, 2004).

A identificação dos metabólitos circulantes é ainda limitada a poucos polifenóis. Os metabólitos absorvidos circulam no organismo, ligados a proteínas plasmáticas, principalmente albumina. A afinidade com a albumina é variável, de acordo com a estrutura de cada composto fenólico (DANGLES *et al.*, 1999).

O acúmulo dos metabólitos ativos dos compostos fenólicos em tecidos alvo ainda não está elucidado. Os poucos estudos parecem indicar que algumas células podem incorporar os compostos por mecanismos específicos e a concentração plasmática dos compostos fenólicos não está diretamente relacionada com as concentrações encontradas em tecidos alvo. Ainda, a distribuição entre sangue e tecidos difere entre os vários compostos fenólicos (MANACH *et al.*, 2004).

Os metabólitos podem seguir duas vias de excreção: biliar ou urinária. A conjugação atua como uma destoxificação metabólica, comum a vários xenobióticos, facilitando a excreção biliar e urinária, pelo aumento do caráter hidrofílico das estruturas. Os metabólitos extensivamente conjugados são preferencialmente eliminados com a bile e passam novamente por ação da β -glicuronidase microbiana, nos segmentos distais do intestino, para serem posteriormente reabsorvidos. Essa reciclagem entero-hepática pode levar a uma permanência prolongada dos compostos fenólicos no organismo, após a ingestão. Já os metabólitos pouco conjugados, como os monossulfatos, são preferencialmente excretados na urina (MANACH *et al.*, 2004).

2.6 Teores de compostos fenólicos e impacto do cozimento do arroz

As informações sobre teores de compostos fenólicos em arroz integral ainda são muito limitadas e a maioria dos dados referem-se aos teores de fenólicos solúveis em amostras de arroz cru.

Goffman & Bergman (2002) num trabalho de triagem quantificaram os fenólicos solúveis de 320 genótipos de arroz integral que haviam sido agrupados em diferentes classes de acordo com a cor do pericarpo. Os resultados para as linhagens roxas e vermelhas variaram entre 290 e 5830 μg eq. AG/g, enquanto que as linhagens de coloração marrom variaram de 250 a 2860 μg eq. AG/g. Em linhagens com pericarpo mais claro os teores encontrados foram de 230 a 620 μg eq. AG/g. Embora, nas linhagens mais escuras a variação dos teores tenha sido elevada, as concentrações de fenólicos foram superiores aos das linhagens mais claras.

Adom & Liu (2002) determinaram para uma única amostra de arroz não-

pigmentado o teor de fenólicos totais, como somatória dos fenólicos solúveis e insolúveis. Os teores dos fenólicos solúveis e insolúveis foram de 357,3 $\mu\text{g eq. AG/g}$ e 588,6 $\mu\text{g eq. AG/g}$, respectivamente, totalizando 945,9 $\mu\text{g eq. AG/g}$. Os fenólicos insolúveis, portanto, contribuíram com 62% dos fenólicos totais, evidenciando a importância de sua quantificação.

Os estudos ainda são muito limitados sobre o efeito do cozimento no perfil dos compostos fenólicos presentes nos cereais e na sua capacidade antioxidante e demais atividades biológicas. O cozimento pode causar reações químicas e alterações físicas complexas, incluindo a liberação de ácidos fenólicos livres a partir de suas formas ligadas, degradação de polifenóis, polimerização de fenólicos e formação de produtos complexos a partir da interação de fenólicos com outros componentes do grão, como por exemplo proteínas.

Poucos estudos com cereais têm sido realizados visando avaliar o efeito do processamento térmico. A maioria demonstrou uma redução significativa nos teores de compostos fenólicos. Tortilhas fabricadas a partir de variedades de milho vermelho, por exemplo, tiveram seus teores de fenólicos solúveis reduzidos em 44% após o processamento em relação aos grãos de milho cru, redução maior do que a observada para as tortilhas produzidas a partir de variedades de milho não-pigmentado (35%) (PARRA *et al.*, 2007). O trigo sarraceno também apresentou teores muito menores de fenólicos solúveis após o processamento térmico. Os principais compostos fenólicos deste cereal são os flavonóides, incluindo proantocianidinas, e com a extrusão, um processo que combina umidade, pressão, temperatura e agitação mecânica, ocorreu redução de 65 a 80% destes compostos (ZIELINSKI *et al.*, 2006).

Em relação ao arroz integral, somente um trabalho avaliando o efeito do cozimento nos teores de fenólicos foi encontrado na literatura. Finocchiaro *et al.* (2007) analisaram dois genótipos, um não-pigmentado e outro pigmentado (pericarpo vermelho), antes e após o cozimento. Os teores dos ácidos ferúlico e sinápico foram significativamente reduzidos com o cozimento, tanto na amostra pigmentada como na não-pigmentada, e as proantocianidinas do arroz de pericarpo vermelho foram drasticamente reduzidas (70%) na amostra cozida.

Faltam, portanto, dados a respeito do efeito do cozimento sobre os fenólicos solúveis e insolúveis em diferentes genótipos de arroz pigmentado e não-pigmentado.

2.7 Efeitos potenciais dos fenólicos no auxílio do controle da diabetes

Níveis elevados de glicose no sangue após as refeições são reconhecidos como um dos primeiros sinais que apontam para o risco de complicações micro e macrovasculares que podem progredir para um quadro sintomático de diabetes tipo II (RATNER, 2001; ZIMMERMAN, 2001; FONSECA, 2003). A diabetes é um distúrbio metabólico que aumenta a cada dia, em 2000 eram cerca de 171 milhões de diabéticos no mundo e estima-se que este número irá atingir aproximadamente 366 milhões em 2030, com crescimento, neste período, maior que 100% em praticamente todos os continentes (Figura 5) (WHO, 2008).

Atualmente, as opções para o tratamento de diabetes incluem: intervenção dietética, agentes hipoglicemiantes orais (sulfoniluréia, acarbose) ou insulinoterapia. Um controle adicional da glicemia seria o retardo da absorção

da glicose por meio da inibição de enzimas amilolíticas do trato gastrintestinal, como a α -amilase e α -glucosidase.

Figura 5. Prevalência de diabetes no mundo (Fonte: WHO, 2008).

Inibidores das enzimas responsáveis pela hidrólise do amido atrasam a digestão dos carboidratos, causando uma redução da taxa de absorção da glicose e consequentemente levam a aumento mais lento da glicose plasmática pós-prandial (ALI *et al.*, 2006).

Algumas plantas, ricas em compostos fenólicos, vêm sendo utilizadas tradicionalmente por determinados povos da Índia, China e América do Sul no controle da diabetes (CHEN *et al.*, 2001; GROVER *et al.*, 2002; HASRAT *et al.*, 2004) e têm demonstrado a capacidade de inibir a atividade enzimática da α -amilase (ALI *et al.*, 2006; GAD *et al.*, 2006; KOTOWAROO *et al.*, 2006; MCCUE *et al.*, 2006; MCCUE & SHETTY, 2006; MOHAMED *et al.*, 2006).

No entanto, os estudos com alimentos ainda são escassos, mas evidenciam a associação entre determinados compostos fenólicos e atividade inibitória de enzimas amilolíticas *in vitro*. Mccue *et al.* (2005) pesquisaram extratos fenólicos aquosos de alimentos típicos de origem americana (uva vermelha e pimentão verde) e asiática (gengibre e canela) e observaram atividades inibitórias tanto sobre a α -amilase quanto a α -glucosidase. Outro estudo demonstrou a capacidade de polímeros e oligômeros de proantocianidinas, extraídos da casca do caqui, de inibirem a α -amilase e a α -glicosidase *in vitro* (LEE *et al.*, 2007).

2.8 Efeitos potenciais dos fenólicos no controle da hipertensão

A hipertensão arterial é o principal fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, derrame, doenças coronárias, hipertrofia do ventrículo esquerdo entre outras (FITZGERALD *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004). Sugere-se que a prevalência da hipertensão esteja intimamente relacionada a vários aspectos, tais como ingestão de sal e álcool, sedentarismo, estilo de vida, estresse, fumo, peso corpóreo e fatores da dieta (CHOBANIAN *et al.*, 2003).

Uma nova classificação da pressão sanguínea foi sugerida em 2003 pelo “National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee”, que representa organizações de profissionais, voluntários e agências federais de saúde dos Estados Unidos (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Nessa classificação foi incluído o estágio de pré-hipertensão e os antigos estágios 2 e 3 foram reunidos em uma única categoria (Tabela 1).

Pacientes no estágio de pré-hipertensão apresentam alto risco de desenvolver a doença, possuindo duas vezes mais probabilidade de tornarem-

se hipertensos do que os que apresentam valores normais. Pacientes neste estágio são também aqueles que respondem ao tratamento não-medicamentoso.

Tabela 1. Classificação da pressão sanguínea de adultos.

	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Normal	< 120	< 80
Pré-hipertensão	120 - 139	80 – 89
Hipertensão (estágio 1)	140 – 159	90 – 99
Hipertensão (estágio 2)	≥ 160	≥ 100

Fonte: CHOBANIAN *et al.*, 2003

O controle da hipertensão arterial inclui além de terapia medicamentosa, alterações nos hábitos de vida. A adoção de um estilo de vida saudável é um fator crítico na prevenção da doença e uma parte indispensável do tratamento daqueles que já são hipertensos. As modificações mais eficientes na redução da pressão sanguínea incluem perda de peso, abandono do tabagismo, adoção de dieta com reduzido teor de sódio, prática regular de exercícios físicos e consumo moderado de álcool (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Paralelamente, terapias coadjuvantes, como a ingestão de alimentos ou suplementos alimentares contendo substâncias que atuam como inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA) também podem fazer parte da estratégia de tratamento da pré-hipertensão.

O controle da pressão sanguínea é mediado por diferentes sistemas bioquímicos inter-relacionados, como os sistemas renina-angiotensina, do óxido nítrico, endotelial e das endopeptidases neurais. Estes produzem uma série de peptídeos que, em conjunto, regulam a pressão sanguínea e o balanço eletrolítico por meio de receptores de membrana localizados em diferentes

tecidos do corpo. Os rins atuam no controle da pressão arterial por meio de alterações no volume do líquido extracelular e por meio do sistema renina-angiotensina (FITZGERALD *et al.*, 2004).

Este sistema inicia-se com o angiotensinogênio, um glicopeptídeo, que é substrato da renina, uma proteinase sintetizada e armazenada nas células justaglomerulares do rim. Esta enzima atua sobre o angiotensinogênio liberando, a partir de sua porção N-terminal, um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I. Em seguida, ocorre a clivagem de dois aminoácidos de sua extremidade carboxila, formando o octapeptídeo angiotensina II. Esta reação é catalisada pela ECA, ocorrendo quase inteiramente nos pulmões (LI *et al.*, 2004). A ECA possui importante papel na regulação da pressão sanguínea (Figura 6), não só por promover a formação do potente vasoconstritor angiotensina II, mas também por catalisar a degradação da bradicinina, um peptídeo com ação hipotensora (ASTAWAN *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2004).

Figura 6. Mecanismo vasoconstritor da renina-angiotensina para o controle da pressão arterial (Fonte: FITZGERALD *et al.*, 2004).

Com a formação da angiotensina II, que é o principal componente ativo do sistema renina-angiotensina, ocorre estimulação do sistema nervoso simpático, secreção de aldosterona, de hormônio antidiurético e diminuição do tônus vagal, além de ser responsável por vários efeitos diretos sobre os rins (ROBERTSON *et al.*, 1987). Possui ação imediata e a longo prazo na regulação da pressão sanguínea; o principal efeito imediato é a vasoconstrição, levando a um aumento na resistência vascular periférica total, elevando a pressão arterial. Já o mecanismo de efeito a longo prazo consiste na diminuição da excreção de sal e água pelos rins, aumentando de forma gradual o volume do líquido extracelular e, conseqüentemente, a pressão arterial.

Pesquisas realizadas principalmente com plantas potencialmente anti-hipertensivas, demonstram que a ECA pode ser inibida por compostos fenólicos (NYMAN *et al.*, 1998; DUNCAN *et al.*, 1999).

Taninos hidrolisáveis e alguns flavonóides como as proantocianidinas, presentes em plantas utilizadas tradicionalmente como anti-hipertensivas, têm sido associados à atividade inibitória *in vitro* sobre a ECA (BRAGA *et al.*, 2007).

Contudo, nem todos os compostos fenólicos teriam a capacidade de inibir a enzima. Compostos fenólicos isolados de três plantas potencialmente anti-hipertensivas demonstraram que flavonóides e proantocianidinas inibem a enzima enquanto os ácidos fenólicos, também presentes nas plantas, não inibem a ECA significativamente (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001).

Apesar de existirem poucos dados que relacionem os compostos fenólicos presentes em alimentos com a inibição da ECA, evidências epidemiológicas indicam associação inversa entre o consumo de dietas ricas em flavonóides e a incidência de doenças cardiovasculares. Nesse sentido os flavanóis, uma subclasse dos flavonóides, vêm recebendo atenção especial,

pois o consumo de chá, vinho tinto e produtos à base de cacau, ricos nessas substâncias, estão associados com a redução da pressão sanguínea em humanos (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006).

Um estudo realizado com proantocianidinas e outros flavanóis (flavan-3-ols) purificados, amplamente distribuídos na dieta humana, principalmente em vegetais e bebidas, demonstrou a capacidade inibitória desses compostos sobre a enzima conversora de angiotensina I *in vitro*. Além dos compostos purificados, os alimentos ricos em flavanóis, como chocolate, vinho e chá, também mostraram a capacidade de inibirem a ECA (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Quantificar os compostos fenólicos de diferentes genótipos de arroz integral cru e cozido, bem como analisar a inibição da α -amilase e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) por esses compostos *in vitro*.

3.2 Específicos

- Quantificar os compostos fenólicos solúveis e insolúveis de diferentes genótipos de arroz integral não-pigmentado e pigmentado (preto e vermelho);
- Verificar o efeito do cozimento nos teores de fenólicos solúveis e insolúveis;
- Analisar a inibição da α -amilase pelos fenólicos solúveis e insolúveis de arroz cru e cozido *in vitro*;
- Analisar a inibição da ECA pelos fenólicos solúveis e insolúveis de arroz cru e cozido *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Para a quantificação dos fenólicos solúveis e insolúveis foram utilizadas amostras de dezessete genótipos de arroz integral (*Oryza sativa*, L.), sendo sete genótipos com pericarpo pigmentado (seis vermelhos e um preto) e dez genótipos com pericarpo não-pigmentado.

O arroz preto foi cultivado em sistema irrigado em campos experimentais do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), RS e colhido durante a safra de 2006. Os demais genótipos foram cultivados na mesma época também em sistema irrigado em campos experimentais da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) / Estação Experimental de Itajaí, SC.

As amostras não-pigmentadas representam genótipos de alta produtividade e qualidade, resistentes a doenças. As amostras SC 339 e SC 354 são linhagens experimentais e as demais são disponíveis para o cultivo comercial (Figura 8). Os genótipos de pericarpo vermelho são oriundos de populações de arroz vermelho que infestam lavouras de arroz irrigado em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul (Figura 7).

Para os ensaios de inibição da α -amilase e da ECA foram utilizadas todas as amostras pigmentadas e seis amostras de genótipos não-pigmentados: SCS 112, SCS 339, SCS 354, SCS 115 CL, EPAGRI 108 e EMPASC 104. As demais amostras do grupo não-pigmentado não foram analisadas porque a inibição apresentada pelo grupo foi homogênea e não alcançou índices considerados importantes. A escolha das amostras não-pigmentadas para os ensaios enzimáticos foi realizada de forma aleatória.

Figura 7. Amostras de grãos de genótipos pigmentados de arroz integral.

Figura 8. Amostras de grãos de genótipos não-pigmentados de arroz integral.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Cozimento das amostras

A cocção das amostras de arroz foi realizada utilizando-se ao redor de 30 g de arroz e 120 mL de água, mantendo sempre uma proporção arroz:água de 1:4 (p/v). O cozimento foi realizado em béquer, semi-tampado com vidro de relógio por 30 min. mimetizando condições caseiras. O arroz cozido foi congelado, liofilizado e moído.

4.2.2 Moagem do arroz e determinação da umidade

A moagem foi realizada em moinho analítico (Analytical Mill A10, Kinematica AG, Luzern, Suíça) e a farinha tamisada em peneira com abertura de 20 mesh, sendo as amostras acondicionadas em frascos herméticos à temperatura ambiente (20 a 25°C) até o momento das análises.

As amostras moídas foram utilizadas para diversos ensaios até uma semana após a moagem de forma a garantir a manutenção de seus teores de fenólicos e umidade residual. Foram realizados testes prévios onde se observou que os teores de compostos fenólicos não sofriam variação por um período de no mínimo uma semana.

A umidade das amostras cruas e a umidade residual das amostras cozidas e liofilizadas foram determinadas a partir de 5 g de amostra, por secagem em estufa a 105°C até massa constante, de acordo com método descrito pela AOAC (1995), para que os resultados pudessem ser expressos em base seca. A umidade das amostras cruas variou entre 12,3 e 14,4% (média de 13,3%) enquanto que das amostras cozidas variou entre 2,0 e 5,6% (média de 3,5%).

4.2.3 Extração e quantificação dos fenólicos solúveis e insolúveis

4.2.3.1 Extração dos fenólicos solúveis em água

A extração dos compostos fenólicos solúveis em água foi realizada com base nos métodos descritos por Higashi-Okai *et al.* (2004), Maccue *et al.* (2005) e Ho *et al.* (2006). Após diversas adaptações com relação à quantidade de amostra, tempo de extração e volume de solvente, a extração foi padronizada e adotou-se o seguinte procedimento:

Partiu-se de 1,5 g de amostra que foi adicionada de 20 mL de água destilada e agitada em homogeneizador Ultra-turrax (modelo MA102) por 1 minuto. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e o resíduo submetido a mais quatro extrações sequenciais, nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados, liofilizados e ressuspensos com água destilada em balão de 10 mL. A extração foi realizada em triplicata e os extratos foram congelados a -40°C em frasco hermético até o momento da análise, que ocorria em até uma semana após a extração. Este período foi considerado seguro para a obtenção de dados confiáveis, ou seja, sem que ocorresse perda de fenólicos durante o armazenamento, conforme dados obtidos em testes prévios.

4.2.3.2 Extração dos fenólicos solúveis em etanol 80%

O procedimento de extração de compostos fenólicos solúveis em etanol 80% foi baseado nos métodos descritos por Adom & Liu (2002) e Zhou *et al.* (2004), com adaptações como quantidade de amostra e escolha do solvente.

Os compostos fenólicos solúveis foram extraídos a partir de 2,0 g de farinha de arroz com 10 mL de etanol 80% por 10 minutos. Após centrifugação a 5000 x g por 10 min, o sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 25 mL. O resíduo foi submetido a mais duas re-extrações, uma com 10 e outra com 5 mL de etanol 80% e os sobrenadantes foram combinados. O volume foi ajustado para 25 mL com etanol 80%. A extração foi realizada em triplicata e os extratos congelados a -40°C em frasco hermético até o momento da análise, que ocorria em até uma semana após a extração.

4.2.3.3 Hidrólise e extração dos compostos fenólicos insolúveis

Os fenólicos insolúveis foram solubilizados conforme procedimentos descritos por Zhou *et al.* (2004) e Liyana-Pathirana & Shahidi (2005). O resíduo obtido após extração com etanol foi desengordurado com 10 mL de hexano. Após centrifugação a 7000 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o resíduo submetido à hidrólise alcalina por 4 horas à temperatura ambiente pela adição de 60 mL de NaOH 4M. A suspensão foi deaerada com fluxo de N₂ para evitar a oxidação dos compostos. A seguir, a mistura foi acidificada com HCl concentrado até pH em torno de 1,5 e centrifugada a 7000 x g por 30 min. O sobrenadante foi extraído com 5 porções de 30 mL cada de acetato de etila, sendo a fração orgânica recolhida e evaporada em evaporador rotatório até seca. O resíduo foi ressuspenso em 10 mL de etanol 80%. A extração foi realizada em triplicata e os extratos congelados a -40°C em frasco hermético até o momento da análise, que ocorria em até uma semana após a extração.

Os extratos obtidos em 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.3 foram analisados para a quantificação de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu descrito a seguir.

4.2.3.4 Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos das frações, solúvel e insolúvel, foram quantificados pelo reagente de Folin Ciocalteu de acordo com o método descrito por Singleton *et al.* (1999), com pequena modificação, alcalinizando a solução com NaOH 0.5M ao invés de Na₂CO₃. Esta alteração foi realizada uma vez que a alcalinização com Na₂CO₃ levava à turbidez da solução enquanto que com NaOH a mesma mantinha-se límpida, condição essencial para a análise por espectrofotometria. Diluições apropriadas de cada extrato foram oxidadas pelo reagente de Folin-Ciocalteu e posteriormente alcalinizadas. A absorbância da cor azul resultante foi medida em espectrofotômetro em 760 nm após 2 horas contra um branco de reagentes. O teor de fenólicos de cada extrato foi calculado utilizando curva padrão de ácido ferúlico (25-100 µg/mL), e expresso em µg equivalentes de ácido ferúlico por g de arroz em base seca (µg eq. AF/g). Os resultados das análises realizadas em triplicata foram expressos como média para cada genótipo de arroz integral.

4.2.4 Extração dos compostos fenólicos para os ensaios enzimáticos

4.2.4.1 Extração dos compostos fenólicos solúveis

O procedimento de preparação foi idêntico ao descrito no item 4.2.3.2, no entanto, os sobrenadantes foram coletados e secos em rotoevaporador e, posteriormente, os resíduos ressuspensos em dimetilssulfóxido (DMSO) e os volumes finais completados para 1 mL.

O DMSO foi utilizado como solvente, pois apresentou menor interferência na atividade enzimática combinada à melhor solubilidade dos

fenólicos das amostras em relação aos outros solventes testados (tampão, metanol 80% e etanol 50% e 80%,)

Os teores de fenólicos foram quantificados nesses extratos conforme descrito no item 4.2.3.4.

4.2.4.2 Hidrólise e extração dos compostos fenólicos insolúveis

O procedimento de preparação foi idêntico ao descrito no item 4.2.3.3, no entanto, o resíduo após secagem em rotoevaporador foi ressuspenso em DMSO e o volume final foi completado para 1mL com o mesmo solvente. Os teores de fenólicos foram quantificados nesses extratos conforme descrito no item 4.2.3.4.

4.2.5 Ensaio da inibição da ECA *in vitro*

A inibição da enzima foi determinada segundo método descrito por Araújo *et al.* (2000), com algumas adaptações. O método baseia-se na hidrólise de um peptídeo sintético com supressão intramolecular de fluorescência pela ECA. Este peptídeo contém um grupo fluorescente Abz-FR (ácido orto-amino benzóico), ligado ao grupo N-terminal do peptídeo e ao grupo apagador Dnp (2,4-dinitrofenil) que está incorporado ao ϵ -amino grupo de um aminoácido da cadeia peptídica. Após a hidrólise, ocorre a liberação do produto Abz-FR responsável pela fluorescência que foi medida em fluorímetro.

Para esses ensaios empregou-se a enzima conversora da angiotensina I de pulmão de coelho (Sigma, A-6778) e o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH sintetizado em fase sólida no laboratório do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Para a triagem e seleção das amostras com maior atividade inibitória utilizou-se fluorímetro com leitor de microplacas de 96 poços, marca Tecan modelo Gênios, equipado com agitador e controle de temperatura, conforme Figura 9.

Figura 9. Fluxograma de análise da atividade da ECA.

O valor do coeficiente angular da reta, que expressa a inclinação da reta e a velocidade enzimática, obtido durante o ensaio do controle em unidades arbitrárias de fluorescência/minuto (UAF/min), foi utilizado como 100% da atividade da enzima. Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos como média da triplicata. A % de inibição de cada amostra foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade enzimática} = \left[\frac{\text{UAF/min amostra}}{\text{UAF/min controle}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \% \text{ atividade enzimática}$$

Para a determinação do IC_{50} das amostras e do inibidor referência (captopril®), as análises de inibição foram realizadas em fluorímetro de cubeta, marca Hitachi, modelo F 2000 com banho termostatizado (37°C) sob agitação constante.

Foi utilizada uma quantidade de substrato cuja concentração fosse duas vezes maior do que o K_m , concentração de substrato na qual a enzima atinge metade de sua velocidade máxima, para garantir a linearidade da reação por um período de 300 segundos. A leitura da fluorescência foi realizada em comprimento de onda de 320nm (excitação) e 420nm (emissão). A concentração da enzima foi ajustada para que houvesse liberação de 400 a 500 UAF/min. Esse valor correspondeu a 100% de atividade da ECA nas condições do ensaio.

Após otimização dos parâmetros de ensaio foram adotadas as seguintes condições: 990 μ L de tampão (Tris 100mM pH7,0; $ZnCl_2$ 10 μ M; NaCl 50mM), 3,0 μ L de ECA de pulmão de coelho (0,1U/mL) e volumes variáveis (2-10 μ L) da amostra ou do captopril® (0,6 μ M), completando-se o volume com tampão. A mistura foi pré-incubada por 5 minutos e em seguida foram adicionados 2 μ L do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (10mg/mL). Decorridos 200 segundos, a velocidade (UAF/min) foi registrada e utilizada para o cálculo do IC_{50} .

Essas análises também foram realizadas na UNIFESP, com a colaboração da Dra. Adriana Carmona.

4.2.6 Ensaio da inibição da α -amilase *in vitro*

A inibição da α -amilase foi determinada segundo método descrito por Ali *et al.* (2006), com algumas adaptações nos volumes de enzima e substrato e no tempo de incubação. O método baseia-se na hidrólise do amido pela α -amilase, que o converte em maltose, glicose e dextrina. Esses açúcares redutores são quantificados por uma reação colorimétrica com o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), que é reduzido e forma o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cuja coloração é medida em espectrofotômetro (540nm).

Para o cálculo dos açúcares redutores formados e, portanto, da atividade enzimática foi utilizada uma curva de calibração utilizando maltose como padrão (0,02-0,1g/mL).

Figura 10. Curva de calibração da maltose (g/mL).

A α -amilase pancreática de porco (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi diluída em tampão fosfato 0,02M, pH 6,9 e NaCl 0,6mM para uma concentração de 0,1UI/mL e como substrato foi utilizado amido de batata solúvel (EC 232-686-4, S-2630, Sigma) a 1% diluído no mesmo tampão.

A curva de velocidade de formação da maltose em função da concentração de substrato foi utilizada para definir as quantidades de enzima e substrato no ensaio (Figura 11). Aumentou-se progressivamente a concentração de substrato até que a velocidade constante de formação do produto fosse atingida, ou seja, a velocidade máxima, onde todos os centros ativos encontram-se ocupados (saturados) com o substrato.

Figura 11. Curva de saturação da α -amilase. Amido (g/mL);
Velocidade (concentração maltose/min.) $\times 10^{-3}$

Para as análises de inibição da α -amilase foram utilizados os parâmetros de ensaio conforme Figura 12.

A absorbância lida foi convertida em concentração de maltose formada por meio da equação da curva de calibração (Figura 10). Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos como média da triplicata. A % de inibição foi calculada conforme fórmula a seguir:

$$\% \text{ atividade enzimática} = \left[\frac{\text{conc. maltose amostra}}{\text{conc. maltose controle}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \% \text{ atividade enzimática}$$

Figura 12. Fluxograma de análise da atividade da α-amilase.

4.2.7 Análise estatística

Para a avaliação da influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos solúveis, insolúveis e totais, bem como para a análise dos dados de inibição da ECA e da α -amilase, as amostras foram divididas em quatro grupos: pigmentado cru, pigmentado cozido, não-pigmentado cru e não-pigmentado cozido. Os dados com distribuição normal e homogeneidade de variância foram analisados por Two-way ANOVA, seguida de teste de comparação de médias de Tuckey. Na ausência de distribuição normal e de homogeneidade de variância, os dados foram analisados por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

As comparações entre as extrações dos fenólicos solúveis por água e etanol 80% e entre os índices de inibição da ECA por fenólicos solúveis de arroz cru e cozido (IC_{50}) foram avaliadas por teste-t de student para amostras dependentes.

Os coeficientes de correlação entre os teores de fenólicos e a inibição da ECA e da α -amilase foram determinados pelo teste de Pearson quando os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variância; na ausência destes foi utilizado o teste não-paramétrico de Spearman. Todos os testes foram realizados utilizando o software Statistica 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teores de compostos fenólicos solúveis: escolha do solvente de extração

A princípio foi realizada uma comparação entre os teores de compostos fenólicos solúveis obtidos a partir de extração aquosa e hidroalcoólica, visando a escolha do método de extração mais eficiente desses compostos.

Na Figura 13 são apresentados os teores de compostos fenólicos em extratos aquosos e hidroalcoólicos de dez amostras de arroz não-pigmentado e três amostras de arroz pigmentado: arroz preto, arroz-vermelho e ITJ 75. Os valores são expressos em $\mu\text{g eq. AF/g arroz}$, em base seca.

Figura 13. Teores de fenólicos solúveis em extratos aquosos e hidroalcoólicos.

Nas amostras não-pigmentadas, o teor médio de compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos foi de $578,7 \mu\text{g eq. AF/g}$, ligeiramente superior ao dos extratos aquosos que foi de $552,9 \mu\text{g eq. AF/g}$. No entanto, como não

houve diferença significativa, concluiu-se que tanto a água quanto o etanol 80% podem ser utilizados para a extração dos fenólicos solúveis dessas amostras.

Em contrapartida, a extração com etanol 80% mostrou-se muito mais eficiente que a aquosa para os genótipos pigmentados. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram teores que variaram entre 2563,3 e 4136,2 $\mu\text{g eq. AF/g}$, enquanto que os extratos aquosos variaram entre 1200,1 e 3027,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$, dependendo da amostra. Devido a essa significativa diferença, a extração aquosa foi descontinuada e o etanol 80% foi utilizado no decorrer deste trabalho para a extração dos fenólicos solúveis.

5.2 Teores de compostos fenólicos: influência da pigmentação e do cozimento

5.2.1 Fenólicos solúveis

Na Tabela 2 são apresentados os teores de fenólicos solúveis dos quatro grupos estudados: não-pigmentado cru, não-pigmentado cozido, pigmentado (com pericarpo vermelho) cru e pigmentado cozido.

Apesar de ter sido estudada uma única amostra de arroz preto, esta foi avaliada separadamente ao longo deste trabalho por ter apresentado um comportamento diferente das demais amostras pigmentadas, quanto ao cozimento e à inibição das enzimas.

No grupo não-pigmentado cru os teores variaram de 388,4 a 893,3 $\mu\text{g eq. AF/g}$, enquanto nos seis genótipos pigmentados os teores foram muito maiores e variaram entre 2563,3 a 4136,2 $\mu\text{g eq. AF/g}$, em função da presença de proantocianidinas nas amostras de pericarpo vermelho, além de ácidos fenólicos. Nas amostras não-pigmentadas os principais componentes da fração

solúvel correspondem aos ácidos fenólicos (MIRA *et al.*, 2008).

Tabela 2. Teores de fenólicos solúveis em genótipos de arroz integral¹.

Genótipos	µg eq. AF/g arroz	
	cru	cozido
Não-pigmentados		
Epagri 108	388,4	252,4
Epagri 109	893,3	407,8
SCS 115 CL	504,9	349,5
SCSBRS TIO TAKA	524,3	349,5
SCS 112	621,4	310,7
SCS 114 Andosan	456,8	331,5
L 230	563,2	330,1
EMPASC 104	660,2	271,9
SC 354	602,0	330,1
SC 339	485,5	349,5
Pigmentados vermelhos		
Arroz-vermelho	2563,3	563,2
ITJ 8	3864,4	524,3
ITJ 31	2738,1	504,9
ITJ 75	4136,2	776,8
ITJ 80	3825,5	543,7
ITJ 82	2990,5	563,2

¹valores médios de análises em triplicata

Goffman & Bergman (2002) num trabalho de triagem quantificaram os fenólicos solúveis de 320 genótipos de arroz integral que haviam sido agrupados em diferentes classes de acordo com a cor do pericarpo. Os resultados para as linhagens roxas e vermelhas variaram entre 290 e 5830 µg eq. AG/g, enquanto que as linhagens de coloração marrom variaram de 250 a 2860 µg eq. AG/g. Em linhagens com pericarpo mais claro os teores encontrados foram de 230 a 620 µg eq. AG/g.

Os genótipos pigmentados analisados no presente trabalho evidenciaram níveis de fenólicos solúveis, similares às linhagens mais ricas em fenólicos estudadas por Goffman & Bergman (2002). Entretanto, as amostras

dentro do grupo pigmentado estudadas por nós apresentaram pericarpo com coloração semelhante entre si e, portanto, os diferentes teores de fenólicos apresentados por cada genótipo não puderam ser reconhecidos pela coloração do pericarpo.

Sabe-se que a presença de polifenóis em plantas é altamente influenciada por fatores genéticos e ambientais e, portanto, repetidas análises ao longo dos anos seriam fundamentais para minimizar os efeitos sazonais e oferecer a oportunidade de identificar genótipos particularmente ricos em fenólicos.

O cozimento mostrou ter um efeito importante nos teores; causou redução dos fenólicos solúveis nos genótipos não-pigmentados, que variaram entre 252,4 e 407,8 $\mu\text{g eq. AF/g}$. Nos genótipos pigmentados a redução dos fenólicos solúveis, provocada pelo cozimento, foi ainda mais pronunciada e os teores variaram entre 504,9 e 776,8 $\mu\text{g eq. AF/g}$.

Na Figura 14 encontram-se os valores médios dos teores de fenólicos solúveis dos quatro grupos de amostras. O teor médio do grupo não-pigmentado cru foi de 570,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$, e do pigmentado cru de 3353,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$, seis vezes maior.

Na mesma figura observa-se que, com o cozimento, houve redução média de 42% dos fenólicos solúveis nos genótipos não-pigmentados, cujo teor médio caiu de 570,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ para 328,3 $\mu\text{g eq. AF/g}$. Ainda mais expressiva foi a redução ocorrida nos genótipos pigmentados. O teor médio das amostras cruas foi de 3353,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ enquanto que o das cozidas foi 83% menor (3353,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$). A redução foi mais ou menos uniforme entre as amostras de cada grupo e indicam um comportamento reprodutível.

Figura 14. Teores médios de fenólicos solúveis nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A redução dos teores de fenólicos solúveis com o cozimento pode ser explicada por diversos fatores como degradação térmica, alterações na reatividade química dos fenólicos que pode diminuir a reação com o Folin-Ciocalteu ou ainda formação de complexos insolúveis com outros componentes da matriz tais como proteínas, tornando-os mais difíceis de extrair. De fato, foi observada na prática uma coloração mais intensa do resíduo após a extração dos fenólicos solúveis quando se tratava de amostras de arroz cozido, evidenciando que parte da pigmentação, atribuída à presença de proantocianidinas, havia ficado retida na matriz.

Interações entre compostos fenólicos e proteínas são bem conhecidas. Fenólicos de baixo peso molecular, como os ácidos fenólicos, predominantes nos genótipos não-pigmentados, podem se ligar a proteínas reduzindo sua

solubilidade. Ainda mais fortes são as interações das proteínas com fenólicos de maior peso molecular como os polifenóis presentes no arroz pigmentado.

Alguns estudos revelam que a estrutura dos compostos fenólicos tem efeito direto no processo de ligação destes às proteínas, sendo a ligação mais forte quanto maior o peso molecular do composto, uma vez que moléculas maiores apresentam mais grupos ligantes (SOARES *et al.*, 2007). Talvez, por essa razão, observou-se neste trabalho, que no grupo pigmentado houve uma redução muito mais pronunciada dos fenólicos solúveis do que no grupo não-pigmentado (Figura 14).

O arroz de pericarpo vermelho contém, além de ácidos fenólicos, proantocianidinas presentes como fenólicos solúveis e estes compostos são muito afetados pelo processamento térmico. Finocchiaro *et al.* (2007) quantificaram os teores de proantocianidinas em uma variedade de arroz vermelho, antes e após o cozimento. Esses teores foram reduzidos em 96% no arroz cozido quando a água de cozimento era descartada no final do processo e 70% quando a água era totalmente absorvida pelo arroz. Portanto, mesmo com o aproveitamento total da água, processo comum durante o cozimento do arroz e adotado neste trabalho, a perda do principal composto fenólico do arroz pigmentado é bastante significativa. Além da interação dos fenólicos com proteínas da matriz pode ter ocorrido também a condensação e polimerização dos fenólicos, diminuindo a solubilidade desses compostos. Os fenólicos são substâncias reativas e apresentam derivados de quinona e hidroquinona como produtos de sua degradação. O cozimento promove a formação desses compostos que por meio de sucessivas reações levam à condensação e polimerização dos fenólicos (ROBARDS *et al.*, 2003).

Assim, de forma geral, pode-se afirmar que a pigmentação do pericarpo do grão, e o cozimento do arroz influenciam os teores de fenólicos solúveis como pode ser visualizado na Figura 15.

Nas amostras cruas, a pigmentação do arroz determina os altos teores de fenólicos solúveis, representados principalmente pelas proantocianidinas.

Nas amostras cozidas, a pigmentação do arroz ainda é determinante para os altos teores de fenólicos, embora em proporção muito menor. Isso ocorre em função do efeito do cozimento, que leva à redução expressiva dos compostos fenólicos solúveis principalmente nas amostras de arroz pigmentado.

Figura 15. Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos solúveis. Sim = genótipos pigmentados, não = genótipos não-pigmentados.

5.2.2 Fenólicos insolúveis

Na Tabela 3 são apresentados os teores de fenólicos insolúveis dos quatro grupos estudados: não-pigmentado cru, não-pigmentado cozido, pigmentado (com pericarpo vermelho) cru e pigmentado cozido. Esta fração corresponde aos ácidos fenólicos ligados a resíduos de açúcares da parede celular e ainda a compostos fenólicos não extraídos no meio hidroalcoólico.

Tabela 3. Teores de fenólicos insolúveis em genótipos de arroz integral¹.

Genótipos	µg eq. AF/g arroz	
	cru	cozido
Não-pigmentados		
Epagri 108	369,0	427,2
Epagri 109	446,6	757,3
SCS 115 CL	369,0	466,1
SCSBR S TIO TAKA	310,7	369,0
SCS 112	407,8	543,7
SCS 114 Andosan	370,5	485,1
L 230	563,2	737,9
Empasc 104	466,1	660,2
SC 354	563,2	582,6
SC 339	369,0	407,8
Pigmentados vermelhos		
Arroz-vermelho	893,3	1068,0
ITJ 8	543,7	1572,9
ITJ 31	699,1	1320,5
ITJ 75	912,7	2155,5
ITJ 80	543,7	1301,1
ITJ 82	873,9	1262,2

¹ valores médios de análises em triplicata

No grupo não-pigmentado cru, os teores variaram de 310,7 a 563,2 µg eq. AF/g e no grupo pigmentado cru os teores foram maiores e variaram entre 543,7 a 912,7 µg eq. AF/g.

Com o cozimento, os teores de fenólicos insolúveis nos genótipos não-pigmentados tiveram um aumento e variaram entre 369,0 e 757,3 µg eq. AF/g e

nos genótipos pigmentados o aumento foi bem maior, os teores variaram entre 1068,0 e 2155,5 $\mu\text{g eq. AF/g}$.

Na Figura 16 são apresentados os teores médios de fenólicos insolúveis dos quatro grupos avaliados. No grupo pigmentado cru, o teor médio foi de 744,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$, duas vezes maior e significativamente diferente do grupo não-pigmentado (423,5 $\mu\text{g eq. AF/g}$). Neste caso, o valor mais elevado nas amostras pigmentadas cruas pode ter sido eventualmente devido à presença de proantocianidinas que ainda ficaram retidas na matriz mesmo após repetidas extrações.

Figura 16. Teores médios de fenólicos insolúveis nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Considerando os fenólicos totais como a somatória dos fenólicos solúveis e insolúveis, os fenólicos insolúveis representam cerca de 40% dos fenólicos totais (993,5 $\mu\text{g eq. AF/g}$) no grupo não-pigmentado, enquanto que no

grupo pigmentado os insolúveis representam aproximadamente 20% do total (4097,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$). Esta menor contribuição ocorre em função do alto teor de fenólicos solúveis nessas amostras.

Estes resultados confirmam a significativa contribuição dos fenólicos insolúveis no teor de fenólicos totais, principalmente nos genótipos não-pigmentados.

Adom & Liu (2002) observaram que os fenólicos insolúveis de uma única amostra de arroz não-pigmentado contribuíram com 62% dos fenólicos totais (588,6 $\mu\text{g eq. AG/g}$). No entanto, nenhum estudo, com dados de fenólicos insolúveis de amostras de arroz pigmentado, foi encontrado na literatura.

Para os fenólicos insolúveis o cozimento também mostrou ter um efeito importante que ainda pode ser observado na Figura 16. Mas, ao contrário do que ocorreu com os solúveis, o cozimento levou ao aumento dos fenólicos insolúveis tanto nos genótipos não-pigmentados quanto nos pigmentados.

Nas amostras não-pigmentadas, o aumento foi em média de 28%, passando os teores de 423,5 $\mu\text{g eq. AF/g}$ para 543,7 $\mu\text{g eq. AF/g}$, embora sem diferença significativa.

Apenas nos genótipos pigmentados o aumento causado pelo cozimento foi significativo; o teor médio das amostras cozidas foi de 1446,7 $\mu\text{g eq. AF/g}$, quase o dobro das amostras cruas (744,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$).

Na Figura 17 observa-se que os teores de fenólicos insolúveis presentes no arroz integral também preservam uma relação direta com a pigmentação do pericarpo. Contudo, o cozimento, ao contrário do observado para os fenólicos solúveis, provoca aumento dos fenólicos insolúveis, principalmente nas amostras pigmentadas.

Figura 17. Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos insolúveis. Sim = genótipos pigmentados, não = genótipos não-pigmentados.

Estes dados reforçam a hipótese de que o cozimento provoca alterações complexas na estrutura dos compostos fenólicos. Especialmente os genótipos com pericarpo vermelho são mais afetados. A redução expressiva dos fenólicos solúveis e o aumento significativo dos fenólicos insolúveis reforçam a idéia de que ocorre uma interação dos fenólicos solúveis com outros componentes da matriz, especialmente proteínas. Além disso, a polimerização dos fenólicos solúveis durante o cozimento também pode contribuir para a menor solubilidade dos mesmos.

5.2.3 Fenólicos totais

Na Tabela 4 são apresentados os teores de fenólicos totais dos quatro grupos de arroz: não-pigmentado cru, não-pigmentado cozido, pigmentado (com pericarpo vermelho) cru e pigmentado cozido.

Tabela 4. Teores de fenólicos totais em genótipos de arroz integral¹.

Genótipos	µg eq. AF/g arroz	
	cru	cozido
Não-pigmentados		
Epagri 108	757,4	679,6
Epagri 109	1339,9	1165,1
SCS 115 CL	873,9	815,6
SCSBRS TIO TAKA	835,0	718,5
SCS 112	1029,2	854,4
SCS 114 Andosan	827,3	816,6
L 230	1126,4	1068
Empasc 104	1126,3	932,1
SC 354	1165,2	912,7
SC 339	854,5	757,3
Pigmentados vermelhos		
Arroz-vermelho	3456,6	1631,2
ITJ 8	4408,1	2097,2
ITJ 31	3437,2	1825,4
ITJ 75	5048,9	2932,3
ITJ 80	4369,2	1844,8
ITJ 82	3864,4	1825,4

¹ valores médios de análises em triplicata

É importante mencionar que os fenólicos totais correspondem à somatória dos fenólicos solúveis e insolúveis. No grupo não-pigmentado cru os teores variaram de 757,4 a 1339,9 µg eq. AF/g e no pigmentado foram muito maiores e variaram entre 3437,2 e 5048,9 µg eq. AF/g

O cozimento causou a redução dos fenólicos totais nos genótipos pigmentados, devido à grande redução ocorrida nos fenólicos solúveis. Nas amostras não-pigmentadas, os teores após o cozimento variaram entre

679,6 e 1165,1 $\mu\text{g eq. AF/g}$. Nas pigmentadas, as alterações causadas pelo cozimento foram ainda maiores; houve uma importante redução dos teores de fenólicos totais, que variaram entre 1631,2 e 2932,3 $\mu\text{g eq. AF/g}$.

Na Figura 18 encontram-se as médias de fenólicos totais dos grupos avaliados. O teor médio do grupo pigmentado foi de 4097,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$, quatro vezes maior do que o do grupo não-pigmentado (993,5 $\mu\text{g eq. AF/g}$). O alto teor das amostras pigmentadas ocorreu em função do alto teor de fenólicos solúveis dessas amostras.

Figura 18. Teores médios de fenólicos totais nos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Adom & Liu (2002) determinaram para uma amostra de arroz não-pigmentado o teor de fenólicos totais, como somatória dos fenólicos solúveis e insolúveis, que foi de 945,9 $\mu\text{g eq. AG/g}$, valor próximo à média das amostras não-pigmentadas deste estudo. Não foram encontradas outras publicações

com teores de fenólicos totais de arroz, uma vez que os fenólicos insolúveis não costumam ser quantificados.

Não houve diferença significativa entre os teores médios de compostos fenólicos totais das amostras antes e após o cozimento.

Nos genótipos pigmentados as alterações causadas pelo cozimento foram expressivas. Houve redução de 50% dos fenólicos totais, de 4097,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$ para 2026,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$.

Observou-se também alteração das proporções entre fenólicos solúveis:insolúveis com o cozimento. Nos genótipos não-pigmentados, as amostras cruas apresentaram proporção de 57:43% que passou a ser de 38:62% nas cozidas. Nos genótipos pigmentados a alteração foi muito pronunciada, ocorrendo praticamente a inversão das proporções com o cozimento. Nas amostras cruas a proporção foi de 82:18% enquanto que nas cozidas foi de 29:71%. Portanto, os fenólicos insolúveis passam a representar a maioria dos fenólicos no arroz cozido.

Os teores de fenólicos totais presentes no arroz integral são influenciados pela pigmentação do pericarpo e pelo cozimento do arroz. Nas amostras cruas a pigmentação determina maiores teores de fenólicos totais e o cozimento, de forma semelhante ao observado para os fenólicos solúveis, provoca a redução principalmente nas amostras pigmentadas (Figura 19).

Figura 19. Representação tridimensional: influência da pigmentação e do cozimento do arroz nos teores de fenólicos totais. Sim = genótipos pigmentados, não = genótipos não-pigmentados.

5.3 Teores de compostos fenólicos em arroz preto

O arroz preto apresentou teores de fenólicos, solúveis e insolúveis superiores à média das amostras de pericarpo vermelho, embora algumas amostras vermelhas tenham apresentado conteúdos similares ou superiores.

Os conteúdos de fenólicos solúveis foram de 4078,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ e 3353 $\mu\text{g eq. AF/g}$, para o arroz preto e a média do grupo de arroz vermelho, respectivamente. Já, os conteúdos de fenólicos insolúveis do arroz preto foram de 1068,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ enquanto que a média do grupo pigmentado vermelho foi de 744,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$. Por fim, os teores de fenólicos totais foram de 5146,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ e 4097,4 $\mu\text{g eq. AF/g}$, para o arroz preto e a média do grupo pigmentado vermelho, respectivamente, conforme apresentado na Figura 20.

Figura 20. Efeito do cozimento nos teores de fenólicos totais de genótipos pigmentados (vermelho e preto).

O arroz preto apresentou comportamento diferente em relação às amostras de pericarpo vermelho, quando foi avaliado o efeito do cozimento sobre os teores de fenólicos.

O cozimento do arroz preto reduziu os fenólicos solúveis em 51% (de 4078,0 para 2000,2 µg eq. AF/g) enquanto nas amostras do grupo pigmentado vermelho a redução foi muito maior, em média 83% (de 3353,0 para 579,4 µg eq. AF/g). Os fenólicos insolúveis do arroz preto sofreram redução de 29% (de 1068,0 para 757,3 µg eq. AF/g) enquanto que no grupo vermelho houve um aumento de 94% com o cozimento (de 744,4 para 1446,7 µg eq. AF/g), como já foi discutido no item 5.2.2.. Em relação aos fenólicos totais, as perdas foram semelhantes, sendo de 46% (de 5146,0 para 2757,5 µg eq. AF/g) para o arroz preto e de 50% (de 4097,4 para 2026,0 µg eq. AF/g) para o grupo de arroz pigmentado vermelho.

As proporções entre fenólicos solúveis:insolúveis foram semelhantes no arroz preto cru e no grupo de arroz cru com pericarpo vermelho, sendo de 79:21% para o arroz preto e de 82:18% para o grupo de arroz pigmentado vermelho.

Com o cozimento, a proporção entre fenólicos solúveis:insolúveis no arroz preto foi pouco alterada (73:27%) enquanto que no arroz de pericarpo vermelho a alteração foi significativa (29:71%).

Estes resultados parecem indicar que os fenólicos solúveis do arroz preto são mais resistentes ao cozimento do que os das amostras de pericarpo vermelho. Além disso, esses compostos parecem não se ligar à matriz do grão tornando-se insolúveis, ao contrário do que foi observado nas amostras de pericarpo vermelho. De fato, o perfil de fenólicos solúveis presentes no arroz preto é diferente do encontrado no arroz de pericarpo vermelho. De acordo com estudos de Hu *et al.* (2003) as antocianinas, especialmente a cianidina 3-glicose e a peonidina 3-glicose, são os principais compostos fenólicos do arroz preto, enquanto o arroz de pericarpo vermelho é especialmente rico em protantocianidinas. Estes compostos, com estruturas químicas diferentes, apresentam também polaridade e reatividade química diferentes, que certamente influenciam o comportamento dessas substâncias frente ao processamento térmico.

Enquanto os fenólicos insolúveis do arroz vermelho sofreram incremento, no arroz preto seus teores foram menores após o cozimento.

Para uma avaliação estatística dos teores de fenólicos do arroz preto mais amostras devem ser analisadas. No presente estudo somente uma variedade foi avaliada por conta da dificuldade de obtenção de amostras de

arroz preto de origem e subespécie conhecidas.

Embora a biodisponibilidade dos compostos fenólicos de arroz pigmentado seja ainda pouco conhecida, presume-se que os fenólicos do arroz preto apresentem um potencial maior de serem absorvidos pelo organismo do que os dos genótipos de arroz com pericarpo vermelho, pois são constituídos majoritariamente por fenólicos solúveis além de apresentar maior teor de fenólicos totais.

Gostaríamos de ressaltar a importância do desenvolvimento de estudos de biodisponibilidade dos compostos fenólicos, especialmente dos genótipos de arroz pigmentado vermelho e preto.

5.4 Inibição da enzima conversora de angiotensina I pelos extratos aquosos

Primeiramente, foram utilizados extratos aquosos nos ensaios de inibição da ECA pelo fato de reproduzirem melhor as condições fisiológicas do organismo humano após a ingestão de arroz. Foram testados os extratos aquosos de amostras escolhidas aleatoriamente; duas variedades de arroz não-pigmentado, Epagri 108 e SCS BRS Tio Taka, e duas variedades de arroz pigmentado, ITJ 75 e arroz-vermelho. As quatro amostras testadas não inibiram significativamente a ECA nas condições experimentais utilizadas.

Estudos demonstram que compostos fenólicos com capacidade de inibir a ECA são geralmente polifenólicos como os flavonóides e as proantocianidinas (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003). A extração aquosa dessas substâncias é deficiente quando comparada à extração com etanol 80%, como já foi mencionado neste trabalho. No caso das amostras pigmentadas testadas,

ITJ 75 e arroz-vermelho, os teores de fenólicos solúveis dos extratos aquosos foram 1557,4 e 1200,1 $\mu\text{g eq. AF/g}$, respectivamente. Em contrapartida, o teor de fenólicos solúveis nos extratos hidroalcoólicos foi 2,1 vezes superior para a amostra ITJ 75 e 2,6 vezes superior para a amostra de arroz-vermelho.

De fato, os extratos hidroalcoólicos das amostras ITJ 75 e arroz-vermelho inibiram fortemente a ECA e por essa razão todos os ensaios enzimáticos, da ECA e da α -amilase, realizados neste trabalho foram efetuados utilizando-se os extratos hidroalcoólicos ao invés dos extratos aquosos.

5.5 Inibição da ECA pelos fenólicos de arroz não-pigmentado e pigmentado

5.5.1 Inibição da ECA por fenólicos solúveis

As porcentagens de inibição da ECA e os teores de fenólicos solúveis nos quatro grupos estudados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Inibição da ECA por fenólicos solúveis de arroz integral¹.

Genótipos	Cru		Cozido	
	$\mu\text{g eq AF/mL}$ de vol. reação	Inibição (%)	$\mu\text{g eq AF/mL}$ de vol. reação	Inibição (%)
Não-pigmentados				
Epagri 108	6,8	22	4,9	7
SCS 115 CL	8,8	25	6,6	13
SCS 112	11,0	22	6,1	11
Empasc 104	11,6	34	5,2	13
SC 354	10,3	36	6,3	5
SC 339	8,4	36	6,7	10
Pigmentados vermelhos				
ITJ 8	70,5	100	10,5	3
ITJ 31	48,5	100	9,7	10
ITJ 75	75,0	93	15,4	42
ITJ 80	69,5	100	10,5	12
ITJ 82	54,5	100	11,0	16
Arroz-vermelho	45,0	91	10,9	15

¹Média de análises em triplicata.

Como era de se esperar, o grupo de arroz não-pigmentado cru apresentou reduzida inibição da ECA que variou entre 22 e 36%, quando a concentração de fenólicos era de 6,8 a 11,6 $\mu\text{g eq AF/mL}$ do volume de reação. Por outro lado, a inibição do grupo pigmentado (pericarpo vermelho) cru, rico em flavonóides foi muito maior e a inibição variou entre 91 e 100%, em concentrações de fenólicos de 45,0 a 75,0 $\mu\text{g eq AF/mL}$.

O cozimento da mesma forma que reduziu o teor de fenólicos solúveis, como já foi discutido anteriormente, também diminuiu a atividade inibitória sobre a ECA. As amostras do grupo não-pigmentado cozido apresentaram inibições que variaram entre 5 e 13% em concentrações de fenólicos de 4,9 a 6,7 $\mu\text{g eq AF/mL}$ de volume de reação.

No grupo de arroz pigmentado, a redução nos índices de inibição após o cozimento foi ainda mais drástica. As amostras cozidas apresentaram inibição que variou entre 3 e 42% em concentrações de fenólicos de 9,7 a 15,4 $\mu\text{g eq AF/mL}$ de volume de reação.

De forma geral, as amostras desse grupo apresentaram inibição semelhante (3 a 16%), exceto o genótipo ITJ 75, que inibiu 42% da atividade enzimática após o cozimento. Se análises de novas safras confirmarem as inibições obtidas neste trabalho, o genótipo ITJ 75, em particular, tende a apresentar o melhor potencial de inibir a ECA *in vivo* dentre as amostras de pericarpo vermelho.

Na Figura 21 estão apresentadas as inibições médias dos grupos avaliados. Em relação às amostras cruas, a inibição média do grupo pigmentado foi de 97%, três vezes maior do que a do grupo não-pigmentado (29%).

Figura 21. Inibição média da ECA por fenólicos solúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A princípio pode-se pensar que essas amostras apresentem maior inibição por terem maiores teores de fenólicos solúveis do que as amostras não-pigmentadas. No entanto, esse fator parece não ser o único responsável pela elevada inibição da enzima. Isso porque os fenólicos solúveis de algumas amostras pigmentadas mesmo após diluição de cinco vezes continuam inibindo fortemente a ECA (Figura 22). Isto foi observado para os genótipos ITJ 8 e ITJ 80 que inibiram a ECA em 91 e 77%, respectivamente, quando a concentração de fenólicos era de cerca de $14,0 \mu\text{g Eq AF/mL}$, próxima a de alguns genótipos não-pigmentados. Por outro lado, a amostra ITJ 75 numa concentração de $15,0 \mu\text{g eq AF/mL}$ inibiu apenas 39% da atividade enzimática.

Figura 22. Inibição da ECA por fenólicos solúveis de genótipos pigmentados diluídos 5 vezes em relação aos extratos originais: inibição da ECA e teor de fenólicos solúveis por volume de reação.

De fato, o coeficiente de correlação entre o teor de fenólicos solúveis do grupo pigmentado cru e inibição da ECA foi muito baixo ($r=0,2549$) o que demonstra baixa intensidade de associação entre as duas variáveis. Dessa forma, acredita-se que, entre os genótipos pigmentados, o perfil de fenólicos presentes nas amostras, ou seja, a composição qualitativa desses fenólicos seja mais importante do que o teor total estimado pela reação com Folin-Ciocalteu. Seria importante conhecer os perfis de compostos fenólicos nos diferentes genótipos e a sua variação decorrente de fatores ambientais ou genéticos. Portanto, repetidas análises ao longo dos anos seriam interessantes para minimizar os efeitos sazonais e oferecer a oportunidade de identificar genótipos com perfis de fenólicos de alta inibição da ECA.

O cozimento da mesma forma que reduziu o teor de fenólicos solúveis, também diminuiu a inibição da ECA. Na Figura 21 observa-se ainda, que no

grupo não-pigmentado, a média de inibição caiu de 29% para 10% com o cozimento.

No arroz com pericarpo pigmentado a perda da inibição da ECA com o cozimento foi drástica e caiu de 97% para 16%, que corresponde a uma redução de 84%. A mesma redução (83%) foi observada para os teores de fenólicos solúveis após o cozimento. Portanto, pode-se afirmar que o cozimento promoveu interações entre a matriz do grão e os fenólicos solúveis, que nas amostras cruas eram responsáveis pela forte inibição.

5.5.2 Inibição da ECA por fenólicos insolúveis

As porcentagens de inibição da ECA e os teores de fenólicos insolúveis no volume de reação nos quatro grupos estudados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Inibição da ECA por fenólicos insolúveis de arroz integral¹

Genótipos	Cru		Cozido	
	µg eq AF/mL de vol. reação	Inibição (%)	µg eq AF/mL de vol. reação	Inibição (%)
Não-pigmentados				
Epagri 108	6,4	5	8,2	4
SCS 115 CL	6,4	11	8,8	25
SCS 112	7,3	32	10,6	31
Empasc 104	8,2	10	12,6	31
SC 354	9,7	15	11,2	27
SC 339	6,4	37	7,8	37
Pigmentados vermelhos				
ITJ 8	9,9	44	31,5	45
ITJ 31	12,4	31	25,4	38
ITJ 75	16,5	45	42,7	38
ITJ 80	9,9	36	25,2	35
ITJ 82	16	34	24,7	37
Arroz-vermelho	15,6	40	20,7	43

¹Média de análises em triplicata.

O grupo de arroz não-pigmentado cru apresentou inibição que variou entre 5 e 37% em função do genótipo e em concentrações de fenólicos de 6,4 a 9,7 $\mu\text{g eq AF/mL}$ do volume de reação. A inibição do grupo de arroz pigmentado (pericarpo vermelho) cru foi maior, tendo variado entre 31 e 45% em concentrações de fenólicos de 9,9 a 16,5 $\mu\text{g eq AF/mL}$.

O cozimento, embora tenha aumentado o teor de fenólicos insolúveis, como já foi discutido anteriormente, não aumentou a atividade inibitória sobre a ECA de forma significativa. As amostras do grupo não-pigmentado cozido apresentaram inibições que variaram entre 4 e 37% em concentrações de fenólicos de 8,2 a 12,6 $\mu\text{g eq AF/mL}$ de volume de reação. O mesmo ocorreu com os grupos de arroz pigmentado, o grupo cozido inibiu a ECA entre 35 e 45% em concentrações de fenólicos de 20,7 a 42,7 $\mu\text{g eq AF/mL}$ de volume de reação.

As inibições médias dos grupos de arroz encontram-se na Figura 23. O grupo pigmentado cru inibiu 38% a ECA, cerca de duas vezes mais do o grupo não-pigmentado (18%).

Esse comportamento está relacionado com o teor de fenólicos insolúveis, pois o grupo pigmentado cru apresenta teor médio de fenólicos insolúveis cerca de duas vezes maior do que o do grupo não-pigmentado.

Como já foi mencionado anteriormente o cozimento não alterou a inibição da ECA pelos fenólicos insolúveis. No grupo não-pigmentado, a inibição média do arroz cozido (26%) foi estatisticamente igual à do arroz cru (18%). Da mesma forma, no grupo pigmentado a inibição média das amostras cozidas (39%) foi estatisticamente igual à das amostras cruas (38%).

Figura 23. Inibição média da ECA por fenólicos insolúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Estes resultados indicam que, mesmo havendo um aumento dos fenólicos insolúveis no arroz cozido, não ocorre aumento da capacidade de inibir a ECA. Uma interpretação plausível seria que o aumento dos fenólicos insolúveis, decorrente de uma possível insolubilização dos fenólicos solúveis, deixa de apresentar capacidade de inibir a ECA, talvez por conta de possíveis alterações em suas estruturas químicas que dificultem ou mesmo impeçam a interação destes com a enzima.

5.6 Inibição da ECA pelos fenólicos de arroz preto

A amostra crua de arroz preto inibiu 86% da atividade enzimática em uma concentração de fenólicos de 74,5 μg Eq AF/mL do volume de reação, inibição esta um pouco inferior à média do grupo com pericarpo vermelho, que

foi de 97% para uma concentração média de fenólicos de 60,5 μg Eq AF/mL.

O arroz preto novamente se destacou em relação às amostras de arroz com pericarpo vermelho; após o cozimento os fenólicos solúveis inibiram a ECA em 70% enquanto que a média das amostras de pericarpo vermelho foi de somente 16% (Figura 24). Vale ressaltar que, nestes ensaios, foram utilizados volumes fixos de amostras (2 μl) que partiram de uma mesma massa de arroz, portanto, as comparações podem ser feitas diretamente em função do teor de fenólicos presentes por grama de arroz.

Assim, a concentração de fenólicos solúveis muito mais elevada no arroz preto, determinou a forte inibição da enzima. Conforme discutido anteriormente, o arroz preto cozido apresenta 2000,2 μg eq. AF/g enquanto que as amostras cozidas de pericarpo vermelho têm em média 579,4 μg eq. AF/g.

Figura 24. Inibição da ECA por fenólicos solúveis de genótipos pigmentados (vermelho e preto).

Os fenólicos insolúveis do arroz preto cru e cozido inibiram mais a ECA do que os do arroz com pericarpo vermelho, embora a análise de maior número de amostras de arroz preto seja necessária para a avaliação estatística. De qualquer maneira pode-se perceber que, embora o cozimento tenha reduzido o teor de fenólicos insolúveis do arroz preto de 1068,0 $\mu\text{g eq. AF/g}$ para 757,3 $\mu\text{g eq. AF/g}$, não houve redução da inibição da ECA.

Dessa forma, o arroz preto apresenta o maior potencial de inibir a ECA *in vivo*, dentre todas as amostras pigmentadas avaliadas neste trabalho, não só por seu alto teor de fenólicos, mas também por conter fenólicos solúveis que mesmo após o cozimento são capazes de manter a inibição em altos níveis.

Obviamente, ensaios com maior número de amostras de arroz preto são necessários para confirmar esses resultados, bem como, estudos *in vivo* para elucidar a biodisponibilidade e a atividade desses compostos no organismo.

5.7 Determinação do IC₅₀ dos compostos fenólicos de arroz pigmentado

O IC₅₀ corresponde à concentração de inibidor capaz de inibir 50% da atividade enzimática nas condições do ensaio e foi expresso em concentração de fenólicos ($\mu\text{g eq. AF/mL}$). Vale ressaltar que quanto menor o IC₅₀ maior a inibição.

Assim, foram selecionadas os extratos de fenólicos solúveis de três amostras de arroz pigmentado que haviam apresentado maior inibição da ECA, antes e após o cozimento. Também foram determinados os valores de IC₅₀ da amostra de arroz preto, cru e cozido, já que este mostrou a maior inibição dentre as amostras cozidas.

A curva de determinação do IC_{50} do captopril, um inibidor da ECA, que foi utilizado como referência para as amostras testadas, encontra-se na Figura 25.

Figura 25. Curva de determinação do IC_{50} do captopril.

Na Figura 26 são apresentadas as curvas de determinação do IC_{50} para as três amostras, cruas e cozidas, do grupo pigmentado com pericarpo vermelho: ITJ 8, ITJ 31 e ITJ 80.

As amostras cruas de arroz com pericarpo vermelho apresentaram índices de IC_{50} que variaram entre 2,4 e 12,7 $\mu\text{g eq. AF/mL}$, sendo que a amostra ITJ 8 apresentou o menor IC_{50} .

As mesmas amostras após o cozimento apresentaram índices de IC_{50} que variaram entre 11,5 e 20,3 $\mu\text{g eq. AF/mL}$, sendo que a amostra ITJ 8 apresentou o menor IC_{50} também dentre as amostras cozidas.

Figura 26. Curvas de determinação do IC_{50} para os fenólicos solúveis dos genótipos pigmentados: ITJ 8 cru (A), ITJ 8 cozido (B), ITJ 31 cru (C), ITJ 31 cozido (D), ITJ 80 cru (E) e ITJ 80 cozido (F).

Como pode ser visualizado na Figura 27, a média do grupo cru foi de 8,0 $\mu\text{g eq. AF/mL}$, significativamente menor do que a do grupo cozido, que foi de 16,1 $\mu\text{g eq. AF/mL}$. Isto significa que, para as amostras de arroz com pericarpo vermelho, o cozimento diminuiu a capacidade inibitória dos fenólicos presentes para a metade, provavelmente em função de alterações nas estruturas químicas desses compostos que afetaram diretamente sua interação com a enzima conversora de angiotensina I.

Figura 27. IC₅₀ médio dos grupos de arroz pigmentado vermelho cru e cozido.

Os fenólicos solúveis do arroz preto antes do cozimento apresentaram IC₅₀ de 17,6 $\mu\text{g eq. AF/mL}$ e após o cozimento o IC₅₀ foi muito semelhante (14,2 $\mu\text{g eq. AF/mL}$), o que demonstra que o cozimento praticamente não afetou a capacidade inibitória dos fenólicos solúveis (Figura 28).

Figura 28. Curvas de determinação do IC_{50} para os fenólicos solúveis de arroz preto cru (A) e cozido (B).

De maneira geral, os valores de IC_{50} para os fenólicos solúveis das amostras analisadas neste trabalho encontram-se próximos ao valor determinado por Actis-Goretta *et al.* (2003) para tetrâmeros de proantocianidinas purificadas ($14 \mu\text{g/mL}$) a partir de alimentos ricos em flavanóis, como chocolate, vinho e chá.

Pode-se observar que o IC_{50} do captopril foi uma ordem de grandeza menor do que todas as amostras analisadas, o que de fato era esperado, por tratar-se de um potente inibidor da ECA, utilizado no tratamento medicamentoso da hipertensão arterial. Os alimentos, que apesar de apresentarem inibição da ECA muito menor do que a dos medicamentos anti-hipertensivos, são recomendados para atuarem como coadjuvantes na prevenção da hipertensão, especialmente no estágio de pré-hipertensão conforme classificação descrita por Chobanian *et al.* (2003).

O IC_{50} avalia especificamente a potência de inibição dos fenólicos presentes, ou seja, amostras com valores de IC_{50} menores apresentam fenólicos com inibição mais potente, independente da concentração dos

mesmos no arroz. Dessa forma, foram realizados cálculos de estimativa da quantidade de arroz que contém uma concentração de compostos fenólicos capaz de inibir 50% da enzima nas condições de ensaio (Figura 29). Estes cálculos foram efetuados tomando-se por base o IC_{50} das amostras e seus respectivos teores de fenólicos.

Na Figura 29 encontram-se as quantidades estimadas de arroz vermelho e preto, antes e após o cozimento, necessárias para inibir 50% da ECA. Esta inibição foi variável, dependendo do genótipo e foi atingida com 0,6 a 4,6 mg de arroz de pericarpo vermelho. Após o cozimento, contudo, foram necessários 21,9 a 40,2 mg de arroz, o que indica uma perda da capacidade de inibir a enzima.

Figura 29. Estimativa dos valores de IC_{50} em massa de arroz para amostras cruas e cozidas genótipos ITJ 8, ITJ 31 e ITJ 80 e arroz preto.

Ao contrário do comportamento do arroz com pericarpo vermelho, o arroz preto praticamente não foi afetado pelo cozimento, uma vez que a quantidade de arroz cru foi de 4,3 mg e de arroz cozido 7,1 mg, o que significa

que uma quantidade bem menor de arroz preto cozido, do que de arroz vermelho, é necessária para inibir 50% da enzima nas condições de ensaio.

5.8 Inibição da α -amilase pelos fenólicos de arroz não-pigmentado e pigmentado

Na Tabela 7 são apresentadas as porcentagens de inibição da α -amilase e os respectivos teores de fenólicos solúveis no volume de reação nos quatro grupos estudados: não-pigmentado cru, não-pigmentado cozido, pigmentado (com pericarpo vermelho) cru e pigmentado cozido.

Tabela 7. Inibição da α -amilase por fenólicos solúveis de arroz integral¹.

Genótipos	Cru		Cozido	
	$\mu\text{g eq AF/mL}$ de vol. reação	Inibição (%)	$\mu\text{g eq AF/mL}$ de vol. reação	Inibição (%)
Não-pigmentados				
Epagri 108	54,7	3	39,3	4
SCS 115 CL	71,0	4	53,4	5
SCS 112	89,3	3	49,1	2
Empasc 104	93,8	3	41,9	3
SC 354	83,6	3	51,1	4
SC 339	67,7	2	54,3	5
Pigmentados vermelhos				
Arroz-vermelho	362,6	14	88,3	10
ITJ 8	571,2	33	84,8	14
ITJ 31	391,9	23	78,5	3
ITJ 75	604,4	26	124,4	6
ITJ 80	561,7	23	84,9	4
ITJ 82	441,4	21	89,0	5

¹Média de análises em triplicata.

De forma geral, nenhum grupo inibiu significativamente a α -amilase. O grupo pigmentado cru foi o que apresentou a maior inibição, que variou entre 14 e 33% em função do genótipo, em concentrações de fenólicos de 362,6 a 604,4 $\mu\text{g eq AF/mL}$ do volume de reação.

A inibição média por grupo de arroz estudado encontra-se na Figura 30.

O arroz pigmentado cru apresentou a maior inibição, com diferença significativa dos demais grupos.

Os fenólicos solúveis do grupo pigmentado cozido praticamente não inibiram a α -amilase. Observa-se novamente que o cozimento do arroz leva a uma redução significativa ($p<0,05$) da inibição apresentada por esses compostos, provavelmente em função da redução do teor de fenólicos solúveis dessas amostras e da alteração da estrutura química de seus compostos.

Figura 30. Inibição média da α -amilase por fenólicos solúveis dos grupos pigmentado e não-pigmentado, antes e após o cozimento. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($P<0,05$).

Os fenólicos insolúveis dos grupos não-pigmentado e pigmentado não inibiram a α -amilase nas condições de ensaio (51,5 e 90,1 μg eq AF/mL para os genótipos não-pigmentados e 79,8 e 345,1 μg eq AF/mL para os genótipos pigmentados).

5.9 Inibição da α -amilase pelos fenólicos de arroz preto

O arroz preto mais uma vez se destacou das amostras de arroz com pericarpo vermelho. A amostra crua de arroz preto inibiu em 64% a atividade enzimática, em uma concentração de fenólicos de 590,5 $\mu\text{g eq AF/mL}$ do volume de reação, enquanto que a inibição média do grupo vermelho foi de 23% para uma concentração de fenólicos média de 503,4 $\mu\text{g eq AF/mL}$.

Portanto, embora as concentrações de fenólicos no volume de reação do arroz preto e do grupo pigmentado vermelho fossem próximas, os fenólicos solúveis do arroz preto inibiram quase três vezes mais a enzima.

Figura 31. Inibição da α -amilase por fenólicos solúveis de genótipos pigmentados

Essa diferença pode ser explicada pelos diferentes perfis de compostos fenólicos presentes no arroz preto e no arroz de pericarpo vermelho. Como foi mencionado anteriormente, dentre o amplo espectro de compostos fenólicos, os principais presentes no arroz preto são as antocianinas enquanto que no arroz pigmentado vermelho são as proantocianidinas. Esses compostos apresentam estruturas químicas diferentes que influenciam diretamente a ação dessas substâncias.

Após o cozimento, o arroz preto, assim como o grupo pigmentado vermelho, teve sua atividade inibitória bastante reduzida. Embora o teor de fenólicos fosse bem maior na amostra de arroz preto cozido (324,1 μg eq AF/mL do volume de reação) do que na média do arroz pigmentado vermelho (91,7 μg eq AF/mL do volume de reação), este alto teor não resultou numa maior inibição da enzima, o que leva a crer que as alterações nos fenólicos solúveis do arroz preto, provocadas pelo cozimento, tenham impedido ou diminuído a interação com a α -amilase.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho estão apresentados novos dados a respeito dos compostos fenólicos presentes em genótipos pigmentados e não-pigmentados de arroz integral.

- ✚ O arroz pigmentado contém teores de fenólicos totais muito superiores ao não-pigmentado. Isso ocorre devido aos seus altos teores de fenólicos solúveis, compostos principalmente por antocianinas e proantocianidinas. Os fenólicos insolúveis contribuem de forma significativa no teor de fenólicos totais, principalmente no arroz integral não-pigmentado.
- ✚ O cozimento do arroz provoca redução dos fenólicos totais e alteração na proporção entre fenólicos solúveis e insolúveis. Essas alterações são mais pronunciadas no arroz com pericarpo vermelho, onde o teor de fenólicos totais é reduzido à metade e os fenólicos insolúveis passam a representar a maioria dos fenólicos após o cozimento. O arroz preto se diferencia do arroz com pericarpo vermelho por manter praticamente a mesma proporção entre fenólicos solúveis e insolúveis após o cozimento.
- ✚ Os fenólicos solúveis, representados pelas antocianinas e proantocianidinas, são os principais responsáveis por uma inibição significativa da ECA, levando a crer que a pigmentação do arroz seja um fator importante. No entanto, entre os genótipos pigmentados, o perfil de

fenólicos parece ser o fator determinante para a maior ou menor atividade inibitória. O cozimento do arroz reduz significativamente a inibição da ECA, fato observado principalmente nos genótipos vermelhos, devido à diminuição dos teores de fenólicos solúveis e da capacidade inibitória dos fenólicos presentes. O arroz preto apresenta o maior potencial como alimento funcional com ação inibidora da ECA, não só por apresentar o maior teor de fenólicos solúveis no arroz cozido, como também por esses fenólicos serem capazes de inibir fortemente a ECA mesmo após o cozimento.

- ✚ A α -amilase não é inibida de forma significativa pelos fenólicos das amostras de arroz cozido.
- ✚ Os genótipos de arroz pigmentado devido à sua elevada concentração de compostos fenólicos, tanto na forma solúvel ou insolúvel, merecem ainda atenção especial em relação à biodisponibilidade dos fenólicos e à sua ação antioxidante local no trato gastrointestinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. **J. Agric. Food. Chem.**, v.54, p.229-234, 2006.
- ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **FEBS Lett.**, v.555, p.597-600, 2003.
- ADER, P.; GRENACHER, B.; LANGGUTH, P.; SCHARRER, E.; WOLFFRAM, S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. **Exp. Physiol.**, v.81, p.943-955, 1996.
- ADOM, K.K.; LIU, R. Antioxidant activity of grains. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.6182-6187, 2002.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, p.449-455, 2006.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.
- ARAÚJO, M.C.; MELO, R.L.; CESARI, M.H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; CARMONA, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.39, p.8519-8525, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC**, 16ed., v.1, p.26-28, 1995.
- ASTAWAN, M.; WAHYUNI, M.; YASUHARA, T.; YAMADA, K.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. **Biosci. Biotech. Bioch.**, v. 59, n.3, p.425-429, 1995.
- BERGER, A.; REIN, D.; SCHAFER, A.; MONNARD, I.; GREMAUD, G.; LAMBELET, P.; BERTOLI, C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. **Eur. J. Nutr.**, v.44, n.3, p.163-173, 2005.

- BRAGA, F.C.; SERRA, C.P.; JÚNIOR, N.S.V.; OLIVEIRA, A.B.; CÔRTEZ, S.F.; LOMBARDI, J.A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 78, p.353-358, 2007.
- BRAMLEY, P.M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H.E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P.J.A.; WAGNER, K.H. Vitamin E. **J. Sci. Food Agr.**, v. 80, p.913-938, 2000.
- BUCHANAN, C.J.; WALLACE, G.; FRY, S.C. *In vivo* release of ¹⁴C-labeled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. **J. Sci. Food Agr.**, v.71, p.459-469, 1996.
- CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S.S., WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v.79, p.131-141, 2002.
- CHEN, H.; FENG, R.; GUO, Y.; SUN, L.; JIANG, J. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma polygonati odorti* in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.74, p.225-229, 2001.
- CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T.; ROCCELLA, E.J. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v. 42, p.1206-1252, 2003.
- CHUN, O.K.; KIM, D.O.; SMITH, N.; SCHROEDER, D.; HAN, J.T.; LEE, C.Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the american diet. **J. Sci. Food Agr.**, v.85, p.1715-1724, 2005.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Cenário mundial favorece exportações brasileiras de arroz**. Disponível em: www.conab.gov.br/conaweb. Acesso em: 03/08/2007.
- COUTEAU, D.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R.; WILLIAMSON, G.; FAULDS, C.B. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. **J. Appl. Microbiol.**, v. 90, p.873-881, 2001.
- DANGLES, O.; DUFOUR, C.; BRET, S. Flavonol-serum albumin complexation: two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. **J. Chem. Soc. Perk. T 1**, v.2, p.737-744, 1999.

- DÉPREZ, S.; MILA, I.; HUNEAU, J.F.; TOMÉ, D.; SCALBERT, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Antioxid. Redox. Signal.**, v.3, p.957-67, 2001.
- DUNCAN, A.C.; JÄGER, A.K.; STADEN, J.V. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p.63-70, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). **Cultivo do arroz irrigado no Brasil: importância econômica, agrícola e alimentar do arroz.** Disponível em: www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/cap01.htm. Acesso em: 03 jun. 2007.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). **Arroz vermelho em extinção.** Disponível em: www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores2006/060109.htm. Acesso em: 03 dez. 2008.
- ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Anthocyanins in cereals. **J. Chromatogr. A**, v.1054, p.129-141, 2004.
- FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? **J. Cereal Sci.**, v. 48, n.2, p.258-276, 2008.
- 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. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.51, p. 1006-1019, 2007.
- FITZGERALD, R.J.; MURRAY, B.A.; WALSH, D.J. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. **J. Nutr.**, v. 134 (suppl.), p. 980S-988S, 2004.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO^a). **Rice and human nutrition**, 2004. Disponível em: www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/fctsheet3.pdf. Acesso em: 06 ago. 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO^b). **Rice around the world**, 2004. Disponível em: www.fao.org/rice2004/en/world.htm. Acesso em: 12 set. 2006.

- FONSECA, V. Clinical significance of targeting postprandial and fasting hyperglycemia in managing type 2 diabetes mellitus. **Curr. Med. Res. Opin.**, v.19, n.7, p.635-641, 2003.
- GAD, M.Z.; EL-SAWALHI, M.M.; ISMAIL, M.F.; EL-TANBOULY, N.D. Biochemical study of the anti-diabetic action of the egyptian plants fenegreek and balanites. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 281, p.173-183, 2006.
- GOFFMAN, F.D., BERGMAN, C. Phenolics in rice: genetic variation, chemical characterization and antiradical efficiency. **American Association of Cereal Chemists Meetings**. 2002. Disponível em: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=139613. Acesso em: 15 mar. 2008.
- GROVER, J.K.; YADAU, S.; VATS, V. Medicinal pants of India with anti-diabetic potential. **J. Ethnopharmacol.**, v.81, p.81-100, 2002.
- HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radical Res.**, v.33, p.819–830, 2000.
- HASRAT, J.A.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Medicinal plants of Suriname: hypotensive effect of *Gossipium barbadense*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.56, p.381-387, 2004.
- HIGASHI-OKAI, K.; KANBAR, K.; AMANO, K.; HAGIWARA, A.; SUGITA, C.; MATSUMOTO, N.; OKAI, Y. Potent antioxidative e antigenotoxic activity in aqueous extract of japanese rice bran – association with peroxidase activity. **Phytother. Res.**, v.18, n.8, p.628-633, 2004.
- HO, C.H.; LIN, Y.T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic extracts of sprouted peas (*Pisum sativum* L.). **J. Food Biochem.**, v.30, p.21-34, 2006.
- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietaty flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, v.37, n.9, p. 937-942, 1999.
- HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W.; KITTS, D.D. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.18, p.5271-527, 2003.
- INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Nutrição e saúde**, 2005. Disponível em: <http://200.96.107.174/coma-arroz/paginas/nutricao.php>. Acesso em: 13 jan. 2009.

- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.44, p.453-464, 2004.
- KOTOWAROO, M.I.; MAHOMOODALLY, M.F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A.H. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible α -amylase inhibitory effects *in vitro*. **Phytother. Res.**, v.20, p.228-231, 2006.
- LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants . **Phytomedicine**, v.8, p. 47-52, 2001.
- LEE, Y.A.; CHO, E.J.; TANAKA, T.; YOKOZAWA T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. **J Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.53, p. 287-292, 2007.
- LI, G.H.; LE, G.W.; SHI, Y.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutr. Res.**, v.24, p. 80-86, 2004.
- LING, W.H.; CHENG, Q.X.; MA, J.; WANG, T. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. **J. Nutr.**, v.131, p.1421-1426, 2001.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J. Nutr.**, v.134 (suppl.), p.3479S-3485S, 2004.
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chem.**, v. 93, p.43-56, 2005.
- MACCUE, P.; KWON, Y.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I – converting enzyme potential of selected foods. **J. Food. Biochem.**, v.29, p.278-294, 2005.
- MACCUE, P.; SHETTY, K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v.13, n.1, p.101-106, 2006.
- MACCUE, P.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Inhibitory effect of clonal oregano extracts against porcine pancreatic amylase *in vitro*. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v.13, p.401-408, 2006.

- MCDUGALL, G.J.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.5896- 5904, 2005.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.727-747, 2004.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.81 (suppl.), p.230S-242S, 2005.
- MILLER, A.; FRENZEL, T.; SCHMARR, H.G.; ENGEL, K.H. Coupled liquid chromatography-gas chromatography for the rapid analysis of γ -oryzanol in rice lipids. **J. Chromatogr. A**, v.985, p.403-410, 2003.
- MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFER-MARQUEZ, 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.995-1003, 2008.
- MOHAMED, Z.G.; MAHA, M.E.; MANAL, F.I.; NIBAL, D.E. Biochemical study of the anti-diabetic action of the egyptian plants Fenugreek and Balanites. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 281, p.173–183, 2006.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A**, v.1054, p.95-111, 2004.
- NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L.B.; PEDERSEN, T.B.; PINSTRUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHPANGADAN, P.P. Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p.247-263, 1998.
- OKI, T.; MASUDA, M.; KOBAYASHI, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; SUDA, I.; SATO, T. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.7524-7529, 2002.
- PARRA, C.; SALDIVAR, S.O.S.; LIU, R.H. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas and tortillas chips. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.4177-4183, 2007.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.5036-5040, 2005.
- QURESHI, A.A.; SALSER, W.A.; PARMAR, R.; EMESON, E.E. Novel tocotrienols of rice bran inhibit atherosclerotic lesions in C57BL/6 ApoE-deficient mice. **J. Nutr.**, v.131, p.2606-2618, 2001.
- RATNER, R.E. Controlling postprandial hyperglycemia. **Am. J. Cardiol.**, v.88 (suppl.), p.26H-31H, 2001.
- ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v.1000, p.657-691, 2003.
- ROBERTSON, J.I.S.; TILLMAN, D.M.; BALL, S.G.; LEVER, A.F. Angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension. **J. Hypertens.**, v.5 (suppl.), p.S19-S25, 1987.
- ROGERS, E.J.; RICE, S.M.; NICOLOSI, R.J.; CARPENTER, D.R.; MCCLELLAND, C.A.; ROMANCZYK, L.J. Identification and quantification of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.70, p.301-307, 1993.
- RONG, N.; AUSMAN, L.M.; NICOLOSI, R.J. γ -Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty acids streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, p.303-309, 1997.
- SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed. Pharmacother.**, v.56, p. 276-282, 2002.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v.130 (suppl.), p. 2073S-2085S, 2000.
- SIDHU, J.S.; KABIR, Y.; HUFFMAN, F.G. Functional foods from cereal grains. **Int. J. Food Prop.**, v.10, p.231-244, 2007.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RANVENSON, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Method Enzymol.**, v.299, p.152-178, 1999.

- SLAVIN, J.L.; MARTIN, M.C.; JACOBS, D.R.J.; MARQUART, L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. **Am. J. Clin. Nutr.**, n.70(suppl), p.459S-463S, 1999.
- SLAVIN, J.L. Why whole grains are protective: biological mechanisms. **P. Nutr. Soc.**, n.62, p.129-134, 2003.
- SLOAN, A.E. Wholly grain. **Food Technol.**, v.59, n.6, p.16, 2005.
- SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p.6726-6735, 2007.
- SOOBRATTEE M.A.; NEERGHEEN U.S.; LUXIMON-RAMMA A.; ARUOMA O.I. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutat. Res.**, v.579, p.200-213, 2005.
- TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.4808-4813, 2004.
- WILSON, A.T.; IDREIS, H.M.; TAYLOR, C.M.; NICOLOSI, R.J. Whole fat rice bran reduces the development of early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters compared with wheat bran. **Nutr. Res.**, v.22, p.1319-1332, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diabetes programme: facts and figures**. Disponível em: www.who.int/diabetes/facts/en. Acesso em: 3 dez. 2008.
- XIA, M.; LING, W.H.; MA, J.; KITTS, D.; ZAWISTOWSKI, J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **J. Nutr.**, v.133, p.744-751, 2003.
- XU, Z.; GODBER, J.S. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p.2724-2728, 1999.

- XU, Z.; HUA, N.; GODBER, J.S. Antioxidant activity of tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.2077-2081, 2001.
- ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **J. Nutr.**, v. 134, p. 3083-3088, 2004.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **Int. J. Food Sci. Tech.**, v.37, p.849–868, 2002.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chem.**, v.87, p.401-406, 2004.
- ZIELINSKI, H.; MICHALSKA, A.; PISKULA, M.K.; KOZLOWSKA, H. Antioxidants in thermally treated buckwheat groats. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.50, p.824-832, 2006.
- ZIMMERMAN, B.R. Postprandial hyperglycemia: implications for practice. **Am. J. Cardiol.**, v.88 (suppl.), p.32H-36H, 2001.

ANEXOS

Accepted Manuscript

Title: Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes

Authors: Nádia Valéria Mussi de Mira, Isabel Louro Massaretto, Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual, Ursula Maria Lanfer-Marquez

PII: S0889-1575(08)00169-5
DOI: doi:10.1016/j.jfca.2008.06.012
Reference: YJFCA 1736

To appear in:

Received date: 25-10-2007
Revised date: 27-5-2008
Accepted date: 24-6-2008

Please cite this article as: de Mira, N. V. M., Massaretto, I. L., de Simone Carlos Iglesias Pascual, C., & Lanfer-Marquez, U. M., Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes, *Journal of Food Composition and Analysis* (2008), doi:10.1016/j.jfca.2008.06.012

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.