



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Caracterização e utilização de arroz vermelho (*Oryza glaberrima*) e preto (*Oryza sativa*)
e seus subprodutos para a produção de filmes biodegradáveis**

CAROLINA GALARZA VARGAS

Porto Alegre, 2018.

CAROLINA GALARZA VARGAS

CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ARROZ VERMELHO (*ORYZA GLABERRIMA*) E PRETO (*ORYZA SATIVA*) E SEUS SUBPRODUTOS PARA A PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Hickmann Flôres

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Porto Alegre, 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Vargas, Carolina Galarza
Caracterização e utilização de arroz vermelho
(*Oryza glaberrima*) e preto (*Oryza sativa*) e seus
subprodutos para a produção de filmes biodegradáveis
/ Carolina Galarza Vargas. -- 2018.

136 f.

Orientadora: Simone Hickmann Flôres.

Coorientadora: Alessandro de Oliveira Rios.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Compostos bioativos.
3. Antioxidantes. 4. Radicais livres. 5. Células SH-
SY5Y. I. Flôres, Simone Hickmann, orient. II. Rios,
Alessandro de Oliveira, coorient. III. Título.

Carolina Galarza Vargas
(Mestre em Nutrição e Alimentos)

TESE

**CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ARROZ VERMELHO (*ORYZA
GLABERRIMA*) E PRETO (*ORYZA SATIVA*) E SEUS SUBPRODUTOS PARA A
PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS**

Submetido como parte dos requisitos para obtenção do grau de
DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:...../...../.....
Pela Comissão Examinadora

Homologada em:...../...../.....
Por:

Prof^ª. Dra. Simone Hickmann Flôres
Orientadora
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos.
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do Programa de Pós Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA/UFRGS)

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Coorientador
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos.
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos
(ICTA/UFRGS)

Banca: Prof^ª. Dra. Médelin Marques da Silva
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos
IFRS

Banca: Prof^ª. Dra. Flavia Santos Twardowski Pinto
Doutora em Engenharia de Produção
IFRS

Banca: Prof^ª. Dra. Giovana Domeneghini Mercali
Doutorado em Engenharia Química
PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ah...! Agradecer!

Quero começar agradecendo Aquele que de algum lugar rege nossas vidas, meu Deus, obrigada por ter me proporcionado essa oportunidade e ter preparado absolutamente cada detalhe do que me esperava nessa jornada.

À minha família, meus pais, meus maiores exemplos, os amores da minha vida! Obrigada pelo incentivo, pelo apoio constante, pelos esforços dispendidos pra que eu pudesse trilhar esse caminho, obrigada por sempre acreditarem em mim! Vocês são minha base, o melhor de mim! Pai e Mãe sem vocês eu não sou nada... amo vocês além dessa vida! Dedico a vocês o mérito de hoje eu poder concluir essa etapa e realizar esse sonho! Um agradecimento especial à minha mãe, minha inspiração, meu modelo, meu exemplo, que despertou em mim a paixão pela nossa profissão!

A minha irmã, minha companheira de vida, minha melhor amiga, que do seu jeitinho me ama, me apoia e me dá forças pra continuar. Te amo demais Vê!

À Tia Flávia!! Que pessoa iluminada! Obrigada por tudo, sempre... tu veio ensinar a esse mundo como podemos ser melhor...Te amo!

Obrigada a essa equipe fantástica de Professores que me orientou com muita sabedoria. Primeiramente, meu muito obrigada à minha orientadora Profe Simone... mais que uma orientadora, uma mãezona dos filhotes adotivos do laboratório 211! Profe obrigada pelos ensinamentos, obrigada por acreditar em mim, por me aconselhar e incentivar sempre...sempre mesmo! Obrigada pela disponibilidade a qualquer hora do dia e dia da semana! Obrigada por confiar em mim! Levarei pra sempre tua frase... “se der medo, vai com medo mesmo!”

Ao meu coorientador, Professor Alessandro, outro exemplo de profissional excepcional! Da mesma forma, obrigada pela confiança, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela paciência e por estar presente sempre que eu precisei!

Ao querido Professor Eliseu! Quanta paciência e sutileza pra me ensinar aquele mundo novo de massas e estruturas moleculares que me deixava zonha! Fui privilegiada por ter tido a oportunidade de aprender um pouco desse tanto de sabedoria! Foi um prazer te ter como parceiro no meu trabalho! Também preciso registrar meu agradecimento pela confiança que depositastes todo o tempo em mim!

À Professora Paula, que nos salvou!!! Obrigada pela dedicação, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e parceria!!!

Professores...levarei vocês como exemplo para o dia que eu também for docente, eu reproduza os ensinamentos aqui adquiridos e desperte o orgulho e a gratidão que vocês despertaram em mim!

Aos queridos colegas do laboratório 211! Que grupo sensacional! A todos, sem exceção, meu muito obrigada! Vocês foram fundamentais pra que hoje eu olhe pra trás e lembre com carinho de tudo o que vivi aqui na UFRGS! Gostaria de fazer um agradecimento especial aos integrantes do meu quarteto, os Edilsons, Aelson, Aline e Liana foi um prazer dividir esses anos com vocês! Ah...e ao meu grande amigo Aelson, dedico o cargo de anjo da guarda! Sem palavras pra te agradecer por essa irmandade!

Aos meus três alunos de iniciação científica, Eduardinho, Léo e Bruna, obrigada pelo empenho e contribuição meus queridos!

Ao meu “professor de espanhol-chefe de cozinha”, Santi, que me incentivou e nunca negou nenhum pedido meu... *Eres lo ecuatoriano más brasileño que yo conozco! Te extraño mi amigo! Muchas gracias!*

À minha amiga-irmã Japa, que o universo me traz sempre pra perto, obrigada por me escutar, aconselhar, me tranquilizar e me cuidar! E também à minha outra “irmã” Dé... que mesmo longe está sempre no meu coração! Morro de saudade do nosso trio... Amo vocês manas!

Às minhas amigas Déa e Laila, elas não sabem quantas vezes me ajudaram! Obrigada amigas! Vocês são especiais!

Ao meu amigo de longa data, Juca, que esteve sempre ao meu lado, me ajudou, apoiou, incentivou, me deu força e me cuidou! Valeu mesmo querido! Meu muito obrigada também ao meu “Guru”... Julio... que muitas vezes me acalmou e me deu seus sábios conselhos que, de alguma maneira intuitiva, ele sabia que eu precisava!

Aos melhores vizinhos Ricardo e Sérgio, com os quais eu sempre pude contar! Guris só desejo sucesso na vida de vocês!

Ao meu quarteto querido Amandita, Tati, Teacher Bru e Bernardo... vocês são demais! Que sintonia né turma?!

À Gé que apareceu pra dividir comigo ansiedades, medos e conhecer o melhor que o “velho mundo” tinha pra nos proporcionar.. *Gracias chica!*

À Professora Amparo e a todos os meus colegas, hoje amigos, que me receberam de braços abertos na Universidade Politécnica de Valência durante meu doutorado sanduíche. Mayra, Ali, Sofi, Dana, Johana, Dieguito, Quim, Ary, Andrea e Laydi...Vocês foram

responsáveis por ter feito dessa experiência profissional, a melhor experiência da minha vida! Serei eternamente grata e guardarei todos os “*recuerdos*” no meu coração!

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição no meu trabalho. Se foi questão de sorte, eu não sei, mas mais uma vez fui abençoada por ter o privilégio de ter profissionais que eu admiro muito contribuindo para a valorização do meu trabalho e finalização desta etapa!

Ao PPGCTA do ICTA/ UFRGS e seus funcionários que sempre foram muito amáveis e receptivos comigo!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me auxiliaram e vibraram por mim por mais essa conquista!

“Donde no puedas amar, no te demores”

RESUMO

O crescente interesse científico relacionado ao estudo das propriedades dos grãos de arroz vermelho (*Oryza glaberrima*) e preto (*Oryza sativa*) está atrelado ao elevado teor nutricional desses grãos. Quando submetidos ao processo de beneficiamento, eles geram subprodutos, entre os quais a quirera e o farelo, ricos em amido e compostos fenólicos, respectivamente. Uma vez consideradas as diferenças varietais dos grãos e o potencial uso dos seus subprodutos, os objetivos deste trabalho foram, primeiramente, determinar a composição química e o perfil de compostos bioativos desses grãos e, sequencialmente, avaliar sua atividade antioxidante por meio da análise do efeito protetor de células SH-SY5Y. Posteriormente, esses grãos e seus subprodutos foram utilizados como material para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi avaliada em extratos da fração farelo de ambos os grãos, por ser essa a fração que contém sua maior concentração. Os resultados evidenciaram que o ácido ferúlico foi o principal composto fenólico encontrado em ambas as amostras. Enquanto no farelo de arroz preto a cianidina-3-glicosídeo foi a antocianina majoritária, no farelo de arroz vermelho foi identificada a presença de proantocianidinas. Com relação à atividade antioxidante, o ensaio realizado em cultura de células SH-SY5Y, demonstrou que os extratos de ambos os farelos de arroz, nas duas concentrações testadas (10 and 50 µg/mL), apresentam um efeito protetor contra as espécies reativas geradas pelo H₂O₂ (ensaio DCFH-DA) e, esse resultado foi relacionado à presença de compostos bioativos, especialmente ácidos fenólicos e antocianinas. Devido às propriedades físico-químicas e antioxidantes, amido e farinha de arroz vermelho foram utilizados para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. Foram desenvolvidas formulações contendo diferentes proporções de farinha e amido (10:0, 9:1, 7:3, 5:5 e 0:10, p/p). A incorporação de amido nos filmes de farinha promoveu melhora das propriedades mecânicas e estruturais e, redução da permeabilidade ao vapor de água. Baseado na excelente atividade de sequestro do radical DPPH. e no menor custo de produção, a formulação 9:1 foi escolhida para ser aplicada na forma de sachê para análise da estabilidade de óleo de girassol armazenado sob condições de oxidação acelerada. Os resultados demonstraram que os filmes foram eficazes como embalagem protetora impedindo a formação de produtos de degradação primários (peróxidos e dienos conjugados) e secundários (trienos conjugados) durante o armazenamento. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, fica evidenciada a possibilidade de utilização dos grãos de arroz vermelho e preto e seus

subprodutos como matérias-primas promissoras para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis fonte de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: amido de arroz; antioxidantes; células SH-SY5Y; compostos bioativos; embalagem; farelo de arroz.

ABSTRACT

The increase scientific interest related to the study of the properties of red (*Oryza glaberrima*) and black rice (*Oryza sativa*) grains is related to the high nutritional content of these grains. When submitted to the polishing process, they generate by-products, among them broken grains and bran, rich in starch and phenolic compounds, respectively. Once considered varietal differences of the grains, and the potential use of their by-products, the goals of this work were, firstly, to determine the chemical composition and the bioactive compounds profile of these grains and, sequentially evaluate their antioxidant activity by analyzing the protective effect of SH-SY5Y cells. Subsequently, these grains and their by-products were used as material for the development of biodegradable films. The identification and quantification of phenolic compounds was evaluated in extracts of the bran fraction of both grains, since this is the fraction that contains the highest concentration of them. The results showed that ferulic acid was the main phenolic compound found in both samples. While in the black rice bran cyanidin-3-glycoside was the major anthocyanin, in the red rice bran the presence of proanthocyanidins was identified. In relation to the antioxidant activity, the SH-SY5Y cell culture assay showed that the extracts from both rice bran, at both concentrations tested (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), had a protective effect against the reactive species generated by H_2O_2 (DCFH-DA assay) and this result was related to the presence of bioactive compounds, especially phenolic acids and anthocyanins. Due to the physicochemical and antioxidant properties, starch and red rice flour were used for the development of biodegradable films. Formulations containing different ratios of flour and starch (10:0, 9:1, 7:3, 5:5 and 0:10, w/w) were developed. The incorporation of starch in the flour films promoted improved mechanical and structural properties, and reduced permeability to water vapor. Based on excellent scavenging activity of DPPH radical and lowest production cost, the 9: 1 formulation was chosen to be applied in the form of sachets to analyze the stability of sunflower oil stored under accelerated oxidation conditions. The results demonstrated that the films were effective as protective packaging preventing the formation of primary degradation products (peroxides and conjugated dienes) and secondary (conjugated trienes) during the storage. Based on the results obtained in this work, it was confirmed the possibility of using red and black rice grains and their by-products as promising raw materials for the development of biodegradable packaging source of antioxidant compounds.

Keywords: rice starch; antioxidants; SH-SY5Y cells; bioactive compounds; rice bran; packing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3	21
Figura 1. Beneficiamento do arroz em casca com as proporções aproximadas de seus produtos e subprodutos.....	33
CAPÍTULO 4	44
Figura 2. Arroz vermelho (A) e preto (B).....	44
Figura 3. Obtenção das matérias-primas (farinha, farelo e amido de arroz).....	45
Figura 4. Farinha, farelo e quirera de arroz vermelho (A, B e C), farinha, farelo e quirera de arroz e preto (D, E e F).....	45
Figura 5. Amido de arroz vermelho (A) e preto (B).....	50
Figura 6. Filme biodegradável de farinha de arroz vermelho (A) e de amido de arroz vermelho (B).....	51
Figura 7. Análise da espessura dos filmes utilizando micrômetro digital.....	52
Figura 8. Texturômetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) utilizado para análise das propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis.....	53
Figura 9. Células de permeação para análise de PVA.....	54
Figura 10. Análise de solubilidade dos filmes em água.....	55
Figura 11. Tubos de ensaio contendo as amostras de filmes biodegradáveis e a solução do radical DPPH após 2h 30min de reação.....	58
Figura 12. Disposição dos filmes biodegradáveis e controles aberto (placas de Petri abertas) e fechado (potes plásticos de PVC tampados) contendo óleo de girassol, armazenados sob condições extremas de degradação acelerada.....	59
Figura 13. Análise de índice de peróxidos, após 21 dias sob armazenamento, determinada para amostras de óleo de girassol embalados em (A) = potes plásticos de PVC tampados; (B) = placas de Petri abertas; (C) = filmes biodegradáveis de farinha de arroz vermelho e amido de arroz vermelho (9:1).....	59
CAPÍTULO 5	61
Figure 1. Chromatogram obtained by HPLC-DAD of the phenolic compounds from rice bran at 280 nm: (A) Insoluble-bound phenolic compounds of RRB, (B) insoluble-bound phenolic compounds of BRB, (C) free phenolic compounds of RRB, and (D)	

free phenolic compounds of BRB. Peak characterization is given in Table 1.....	74
Figure 2. Effect of RRB and BRB extracts on intracellular reactive species production (DCFH assay) in SH-SY5Y cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=6). *Different from untreated cells (control) (p<0.05); #Different from H ₂ O ₂ -trated cells(p<0.05); & Different from Trolox-treated cells (p<0.05). Control = cells incubated without RRB or BRB extracts//Trolox or 500 μ M H ₂ O ₂ ; Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox® (standard antioxidant) in the presence of 500 μ M H ₂ O ₂ ; RRB and BRB hydrophilic and pellet fractions = cells incubated with hydrophilic and pellet fractions extracts from RRB and BRB (10 – 50 μ g/mL) in the presence of 500 μ M H ₂ O ₂	78
Figure 3. Effect of RRB and RRB extracts on qualitative morphology (A, 600 \times) and viability (B) of SH-SY5Y cells. SRB assay data are expressed as means \pm SEM (n = 6). Control = cells incubated without RRB or BRB extracts; RRB and BRB hydrophilic and pellet fractions = cells incubated with hydrophilic and pellet fractions extracts from RRB and BRB (50 μ g/mL). Observe that control cells and those treated with RRB or BRB extracts preserved the morphology with small neurites (fine cytoplasmic extensions, black arrows), as confirmed by the SRB assay (B).....	80
 CAPÍTULO 6.	89
Figure 1. Visual appearance of the RRF-RRS composite films at different ratios....	103
Figure 2. SEM micrographs of the surfaces of the RRS (A), RRF (B) and RRF-RRS (9:1) (C).....	103
Figure 3. DPPH radical scavenging activity (I) of RRF-RRS composite films at different ratios.....	104
Figure 4. Visual aspect of RRF-RRS composite films at different ratios prior and after 15 days of exposure to soil burial degradation.....	105
Figure 5. TGA curves of RRF-RRS composite films at different ratios.....	107
Figure 6. Peroxide Values, conjugated dienes and conjugated trienes of Sunflower Oil Packed in RRF-RRS (9:1) film, in Closed Plastic Bottles (PLA) and Placed in Open Glass Petri Dishes (GLA).....	108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 5.....	61
Table 1. Chromatographic and spectroscopic characteristics and contents of insoluble-bound phenolic compounds and free phenolic compounds of red (RRB) and black rice (BRB) brans obtained by HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	88
CAPÍTULO 6.....	89
Table 1. Chemical Composition (g/100g DB) of the Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) used to prepare biodegradable films.....	97
Table 2. Film Thickness (FT), Tensile Strength (TS), Elongation at Break (EB), and Young's Modulus (YM) of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.....	99
Table 3. Moisture Content (MC), Solubility in water (SW), Water holding capacity (WHC) and Water Vapor Permeability (WVP) of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.....	99
Table 4. Color of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.....	101
Table 5. Light Transmittance and Opacity of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.....	102

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
1 INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 2	20
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO 3	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 Arroz	21
3.1.1 Carboidratos	21
3.1.2 Proteínas	22
3.1.3 Lipídios	23
3.1.4 Minerais	24
3.1.5 Fibras	24
3.1.6 Compostos fenólicos e antocianinas	25
3.2 Atividade antioxidante	28
3.3 Beneficiamento	32
3.4 Subprodutos do arroz	33
3.4.1 Farelo de arroz	33
3.4.2 Quirera	35
3.4.3 Amido	36
3.5 Aproveitamento de subprodutos para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis	37
CAPÍTULO 4	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Material	44
4.1.1 Matéria-prima	44
4.2 Métodos	44
4.2.1 Processamento das farinhas do grão integral, farelo e quirera de arroz	44
4.2.2 Composição centesimal	46
4.2.3 Determinação de amilose nas farinhas de arroz integral, quirera, farelo e no amido de quirera	46
4.2.4 Extração dos compostos fenólicos nos farelos de arroz vermelho e arroz preto	47
4.2.5 Determinação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS ⁿ	47
4.2.6 Avaliação do efeito neuroprotetor in vitro dos farelos de arroz vermelho e preto	48
4.2.6.1 Cultura de células	48
4.2.6.2 Ensaio da diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)	48
4.2.6.3 Viabilidade celular	49
4.2.6.4 Cálculo da concentração inibitória 50	49
4.2.7 Extração de amido de farinha de quirera de arroz vermelho e preto por método alcalino	50
4.2.8 Caracterização dos amidos obtidos da farinha de quirera	51
4.2.9 Desenvolvimento dos filmes biodegradáveis	51
4.2.9.1 Desenvolvimento dos filmes de farinha e de amido de arroz	51
4.2.10 Caracterização dos filmes obtidos	52
4.2.10.1 Espessura	52

4.2.10.2	Conteúdo de umidade.....	52
4.2.10.3	Análise das propriedades mecânicas	52
4.2.10.4	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	53
4.2.10.5	Solubilidade em água	54
4.2.10.6	Capacidade de retenção de água (CRA).....	55
4.2.10.7	Cor.....	55
4.2.10.8	Opacidade	56
4.2.10.9	Transparência dos filmes	56
4.2.10.10	Morfologia dos filmes.....	56
4.2.10.11	Análise térmica.....	56
4.2.10.12	Biodegradabilidade: degradação em solo	56
4.2.10.13	Determinação da atividade antioxidante dos filmes biodegradáveis pelo método DPPH	57
4.2.10.14	Determinação do potencial antioxidante através do método acelerado de oxidação de óleo de girassol.....	58
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
CAPÍTULO 5	61
	ARTIGO 1: Bioactive Compounds and Protective Effect of Red and Black Rice Brans Extracts in Human Neuron-like Cells (SH-SY5Y)	61
CAPÍTULO 6	89
	ARTIGO 2: Comparative study on the properties of films based on red rice (<i>Oryza glaberrima</i>) flour and starch.....	89
CAPÍTULO 7	115
	DISCUSSÃO GERAL.....	115
CAPÍTULO 8	118
	CONCLUSÃO GERAL	118
	PERSPECTIVAS FUTURAS	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente encontra-se entre os dez maiores produtores mundiais de arroz (*Oriza sativa L*), com produção em 2016 de 11.2 toneladas. Nesse contexto, o Rio Grande do Sul (RS) responde por mais de 60 % da produção e é o maior produtor nacional desse cereal (FAO, 2016).

O arroz é considerado a principal fonte de energia para a maioria da humanidade, e a preferência do consumidor por esse cereal está atrelada a aspectos econômicos, tradicionais e culturais, variando entre os países e, inclusive, entre regiões dentro de um mesmo país.

Esse grão representa uma das principais culturas nos países em desenvolvimento e, embora amplamente consumido como arroz branco, há muitas cultivares especiais que contêm pigmentos, tais como o arroz preto e o vermelho. Seus nomes se referem à cor da semente, a qual é formada por depósitos de antocianinas em diferentes camadas do pericarpo, tegumento e aleurona (PAIVA et al., 2016). O tipo e a concentração de polifenóis no grão variam entre os diferentes genótipos e estão relacionados principalmente à cor do pericarpo (SHAO et al., 2011). Normalmente, grãos com pericarpo vermelho e preto apresentam maior concentração de compostos fenólicos do que aqueles com pericarpo marrom-claro (PENGKUMSRI et al., 2015; SHAO et al., 2014a). Vários compostos fenólicos como as antocianinas, as antocianidinas (FINOCCHIARO; FERRARI; GIANINETTI, 2010), o ácido felúrico, caféico e os ácidos protocatecuicos já foram identificados nos grãos com pericarpo vermelho e preto (BORDIGA et al., 2014).

O arroz tem como constituinte principal o amido e apresenta quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e minerais em sua estrutura. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento, o que proporciona grãos com características nutricionais diferenciadas.

Apesar das cultivares de arroz pigmentado possuírem maior teor de nutrientes em relação ao arroz branco polido, seu consumo ainda é baixo (PAIVA et al., 2014). O processo de polimento é realizado pelas indústrias de arroz, a fim de melhorar as características físicas e as propriedades sensoriais do grão, bem como para aumentar a sua estabilidade durante o armazenamento (MONKS et al., 2013). Para que o grão

polido seja obtido ele precisa ser beneficiado, processo que, além de reduzir o seu valor nutricional, representa um problema econômico para os engenhos de beneficiamento e para a indústria arroseira, uma vez que gera, em média, 8% do volume do produto de farelo e 14% de grãos quebrados, classificados como quirera, cujo valor de mercado representa apenas a quinta parte daquele obtido na comercialização do grão inteiro (SILVA; ASCHERI, 2009).

Embora o farelo de arroz seja um subproduto do beneficiamento, ele representa uma excelente fonte de carboidratos, fibras, vitaminas, minerais, proteínas, lipídios e compostos fenólicos. As fibras do farelo de arroz possuem boa capacidade de absorção de água e óleo e, por isso, podem contribuir para o desenvolvimento de uma enorme variedade de produtos industrializados que requerem essas propriedades (JÚNIOR et al., 2009). Além disso, ao contrário dos farelos de trigo, aveia, cevada e centeio, não possuem glúten e assim podem ser utilizadas por pessoas alérgicas a esta proteína (LACERDA et al., 2010).

Já a quirera contém a mesma composição centesimal média do grão inteiro polido e constitui uma fonte rica em amido (SILVA; ASCHERI, 2009). Uma alternativa para agregar valor a esses grãos quebrados consiste na moagem dos mesmos, para obtenção de farinha, a qual, além de apresentar sabor pouco pronunciado não é alergênica e apresenta aplicação tecnológica (DORS et al., 2006). Uma segunda alternativa é a extração do amido, processo no qual essa matéria-prima pode ser transformada em um produto com maior interesse industrial e comercial.

Em geral, o amido apresenta importante papel tecnológico em alimentos processados e pode atuar como agente de enchimento em embutidos cárneos, agente encapsulante, espessante na formação de géis, adjuvante na estabilização de suspensões e emulsões, na composição de filmes biodegradáveis e coberturas, o que representa uma variável de grande interesse no processamento e tecnologia do arroz (XU et al., 2005).

No entanto, em função da diversidade biológica e ambiental, os grânulos do amido podem apresentar as mais diversas formas, tamanhos e propriedades. Assim, a caracterização do amido, a fim de se obter o domínio e o conhecimento das suas características, torna-se fundamental para a valorização do seu potencial e adequada aplicação.

Uma alternativa de aplicação não somente do amido, como também da farinha de quirera e de farelo de arroz, constitui o desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir dessas matérias-primas. O aumento da utilização de embalagens e recipientes

descartáveis, produzidos com polímeros convencionais de fonte petroquímica, tem gerado problemas ambientais devido ao acúmulo destes materiais não biodegradáveis, visto que sua decomposição leva centenas de anos. Nos últimos anos, tem-se reconhecido a necessidade de reduzir o desperdício e o descarte de materiais plásticos. Assim, tem-se evidenciado crescente interesse pela utilização de polímeros biodegradáveis em substituição aos plásticos sintéticos com o intuito de minimizar o impacto ambiental gerado pelo acúmulo de plásticos ao meio ambiente (AHMAD et al., 2015). Neste contexto, a utilização dos subprodutos do arroz torna-se uma alternativa para a produção de um novo tipo de embalagem, mais sustentável e com funcionalidades específicas, tais como controle de umidade, gases e migração de aditivos e/ou nutrientes (DIAS et al., 2010).

Dessa forma, com base no elevado teor de compostos fenólicos contidos nos grãos de arroz de pericarpo vermelho e preto já evidenciado previamente na literatura e, na estrutura do grão de arroz, torna-se interessante avaliar o emprego do amido, extraído da quirera, na formulação de novos produtos e ingredientes alimentares. Além disso, o uso do farelo e da farinha, também pode representar uma alternativa de inovação tecnológica aos rizicultores, agregando valor a esses subprodutos do arroz. Assim, este trabalho tem como objetivo a avaliação dos compostos bioativos do arroz vermelho e preto na forma integral e o aproveitamento dos subprodutos (amido, farinha de quirera e farelo) para a produção de filmes biodegradáveis.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar as propriedades físicas e bioativas dos grãos de arroz vermelho e preto e dos seus subprodutos para o desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar as características químicas da farinha de quirera de arroz vermelho e preto e do farelo;
- Extrair, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos farelos de arroz vermelho e preto;
- Avaliar a capacidade neuroprotetora de extratos de farelos de arroz vermelho e preto em células SH-SY5Y insultadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- Avaliar a toxicidade dos extratos de farelos de arroz vermelho e preto em células SH-SY5Y.
- Extrair amido de arroz vermelho por método alcalino;
- Caracterizar o amido obtido;
- Desenvolver filmes biodegradáveis a partir de farinha e amido de arroz vermelho pela técnica de *casting*;
- Caracterizar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes biodegradáveis;
- Determinar a atividade antioxidante dos filmes biodegradáveis pelo método DPPH e do método acelerado de oxidação de óleo de girassol;

CAPÍTULO 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Arroz

O arroz é um fruto-semente conhecido como grão ou cariopse, constituído pela casca, película, germe e endosperma amiláceo (VIEIRA; RABELO, 2006), classificado quanto ao beneficiamento em arroz integral, arroz parboilizado integral, arroz polido e arroz parboilizado polido (BRASIL, 2009).

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe. O endosperma é formado majoritariamente por grânulos de amido e proteínas, com subdivisão em aleurona, subaleurona e amido (STORCK; SILVA; COMARELLA, 2005; SCUSSEL et al., 2008).

A composição nutricional do arroz está sujeita a diversos fatores, tais como, influências varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento, originando grãos com características nutricionais diferenciadas. Ele é considerado uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de carboidratos (amido) e apresenta quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e minerais (ZHOU et al., 2002).

3.1.1 Carboidratos

Praticamente a totalidade de carboidratos do arroz é representada pelo amido, contido no endosperma do grão, e dividido em amilose e amilopectina. A proporção entre amilose e amilopectina constitui uma variável de grande interesse no processamento e tecnologia do arroz e determina a capacidade de aglutinação dos grãos (KENNEDY; BURLINGAME, 2003; NAVES, 2007).

O arroz apresenta pequena quantidade de açúcares livres, localizados principalmente nas camadas externas do grão e sua concentração é afetada pela variedade, grau de polimento e processamento. Os principais açúcares no arroz são sacarose (aproximadamente 90%), glicose e frutose (MATSUO et al., 1995).

Diversos estudos têm revelado diferença estatística no teor de carboidratos de grãos que apresentam diferenças varietais, de processamento ou de cultivo. Na pesquisa de Walter (2009) foi encontrado 6,2% de variação no conteúdo de carboidratos de grãos de pericarpo marrom-claro, vermelho e preto, havendo inclusive diferença significativa

entre grãos de mesma coloração. Como relatado por Patindol et al (2006), o teor de carboidratos do arroz vermelho polido foi inferior ao do arroz não pigmentado, o que indica que fatores genéticos, além dos ambientais, influenciam a concentração de carboidratos no grão. Sompong et al (2011) ao avaliarem várias amostras de arroz vermelho e preto encontraram o menor teor de carboidrato em uma amostra de arroz preto (71,99 g/100 g) e o maior em amostra de arroz vermelho (79,27 g/100 g). Paiva et al (2016) investigaram o efeito dos processos de polimento e parboilização sobre as propriedades nutricionais de arrozes com pericarpo pigmentado. Nesse estudo foi evidenciado que grãos de arroz preto, polidos parboilizados e polidos não-parboilizados, apresentavam maior teor de carboidratos em comparação a grãos de arroz vermelho submetidos aos mesmos processos. Tal resultado foi atribuído ao fato dos teores de proteínas e cinzas terem sido mais afetados nas amostras de arroz preto do que nas amostras de arroz vermelho.

3.1.2 Proteínas

O conteúdo proteico do arroz é em média de 7,5% (base seca) e pode sofrer variação entre 5% e 13%, o que depende, principalmente, das diferenças varietais (KENNEDY; BURLINGAME, 2003). A composição de proteínas do endosperma difere do farelo, uma vez que há redução neste teor à medida que são retiradas as camadas superficiais do grão, pois o teor de proteínas diminui progressivamente da periferia para o interior da cariopse (GOMES; MAGALHÃES, 2004).

A proteína do arroz é constituída por diferentes frações protéicas, classificadas em relação a sua solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em álcalis). A maior parte das proteínas do arroz é compreendida pela fração das glutelinas, o que representa cerca de 80% (VIEIRA et al., 2008).

A composição de proteínas também é afetada pela característica genotípica. No estudo de Liu et al (2005), seis cultivares de arroz japonico cultivado em diferentes partes da China foram analisados, e os resultados revelaram diferença tanto na concentração total de proteínas (7,35-11,47%) entre os genótipos, quanto variação nos tipos de proteínas. A pesquisa realizada por Paiva et al (2016) não evidenciou diferença no teor de proteínas entre a cultivar de arroz preto IAC 600 (8%) e uma linhagem de arroz vermelho (8,1%). Walter (2009) encontrou teores de 7,50 a 9,36% com variação

de 19,9% ao comparar grãos com pericarpo marrom-claro, vermelho e preto. Enquanto Kang et al (2011) observaram significativa variação na composição e nos teores de aminoácidos entre grãos de arroz com pericarpo verde, marrom-escuro, preto e branco cultivados na Coreia. Por outro lado, na pesquisa de Boêno (2008) não houve diferença significativa para o teor de proteína (6,21% e 7,02%) entre as quatro amostras de arroz vermelho (uma tradicional e três geneticamente modificadas adquiridas do Programa de Melhoramento Genético de Arroz-Vermelho da Embrapa Meio-Norte). Alves et al (2016) encontraram teores de proteína entre 13,8% e 8,7% para duas amostras de arroz preto e 8,2% para a amostra de arroz vermelho.

3.1.3 Lipídios

O arroz polido possui baixo teor de lipídios (menor que 1%). No entanto, o grão integral pode conter até 3%, pois cerca de 80% dos lipídios do grão estão localizados em suas camadas periféricas. Apesar dos baixos teores de lipídios no arroz, sua composição majoritária é dos ácidos graxos insaturados - oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) (ZHOU et al., 2002). Os ácidos graxos insaturados possuem um papel importante em vários processos fisiológicos e que, por não serem sintetizados pelo organismo humano, devem ser supridos pela alimentação (WALTER et al., 2008).

Tanto no estudo realizado por Lee et al (2006) quanto no estudo de Kang et al (2011), os principais ácidos graxos encontrados em amostras de arroz pigmentados e não pigmentados foram oléico, linoléico e palmítico. Esses três ácidos graxos foram responsáveis por mais de 94% do teor de ácidos graxos totais nas amostras.

Boêno et al (2011) encontraram valores entre 1,44 % e 2,09 % para amostras de arroz vermelho polido e atribuíram esses valores, superiores aos encontrados na literatura, à suposição de que polimento tenha sido mal realizado. Paiva et al (2016) confirmaram essa hipótese, uma vez que evidenciaram que o processo de polimento causou redução no teor de lipídeos de 86,2 % e 77,4 % no arroz preto e vermelho, respectivamente. O estudo realizado por Alves et al (2016) evidenciou valores elevados para o conteúdo de lipídeos de uma amostra de arroz vermelho (4,7 %) e grande variação para duas amostras de arroz preto (1,8 % e 5,1 %).

3.1.4 Minerais

A concentração de minerais difere nas frações do grão. As condições de cultivo em relação à fertilização e às condições do solo e o processamento exercem forte influência sobre o conteúdo mineral. De forma geral, os minerais apresentam-se em maior concentração nas camadas externas do grão (PAIVA et al., 2016), do total do seu conteúdo, aproximadamente 72 % encontra-se no farelo e 28 % no grão polido (ITANI et al., 2002).

Além disso, o genótipo também afeta de forma expressiva o conteúdo de minerais, e estudos têm demonstrado maior concentração de alguns minerais em grãos de arroz com pericarpo vermelho e preto (ITANI et al., 2002; MENG, WEY; YANG, 2005).

Na análise realizada por Kang et al (2011), cálcio e magnésio apresentaram níveis significativamente maiores nas amostras pigmentadas (verde, marrom-escuro e preta) em relação a não pigmentada. As análises de Boêno (2008) revelaram valores significativamente maiores para potássio e magnésio para as quatro amostras de arroz vermelho estudadas em relação aos outros micronutrientes. Já o estudo que avaliou o conteúdo de minerais de diferentes grãos de arroz (preto, vermelho, glutinoso e milho), evidenciou o cálcio como micronutriente predominante em todas as amostras, seguido pelo ferro e zinco. Os teores de cálcio e ferro foram praticamente o dobro no arroz preto em relação ao vermelho (MENG; WEY; YANG, 2005).

Walter (2009) observou para todos os minerais avaliados (fósforo, cálcio, magnésio, potássio, ferro, manganês e zinco) que alguns genótipos de arroz integral com pericarpo vermelho e preto apresentaram concentração significativamente maior do que o genótipo com pericarpo marrom-claro. Outros pesquisadores também relataram maior concentração de alguns minerais em grãos com pericarpo vermelho e preto, como ferro (ZHANG et al., 2004; MENG; WEY; YANG, 2005), zinco (YANG et al., 1998; ZHANG et al., 2004), manganês e fósforo (ZHANG et al., 2004).

3.1.5 Fibras

Os polissacarídeos não digeridos pelas enzimas no trato gastrintestinal, como celulose, hemiceluloses, amido resistente e pectinas, fazem parte da fração fibra alimentar, que pode ser dividida em solúvel e insolúvel. Sua concentração é maior nas camadas externas do grão (farelo e o germe) e diminui em direção ao centro, o que

resulta em baixa concentração desses componentes nos grãos submetidos ao polimento. Além disso, as características genótípicas também interferem nos teores de fibra total (WALTER et al., 2008).

As tabelas brasileiras de composição de alimentos descrevem valores de fibras entre 1,3% e 1,7% para arroz polido e entre 3,5 % e 4,8 % para integral (PHILIPPI, 2002; USP, 2004; NEPA, 2006).

Os valores encontrados para fibra bruta de diferentes genótipos de arroz vermelho polido (um tradicional e três geneticamente modificados) no estudo de Boêno (2008) variaram de 2,2 % a 2,9 % e não houve diferença estatística entre as amostras. Já na investigação feita por Walter (2009), foi observada diferença significativa nos teores de fibra total para os grãos avaliados (dezesesseis variedades de arroz vermelho, uma de arroz preto e uma de arroz marrom-claro), com valores entre 6,8 % e 10,7 % (variação de 36,5 %). Desta forma o arroz marrom-claro apresentou teor inferior quando comparado a algumas amostras de pericarpo vermelho e preto. Sompong et al. (2011) encontraram para os genótipos de arroz vermelho valores para fibra total entre 2,5 % a 4,5 % e 3,4 % a 4,1 % para arroz de pericarpo preto.

3.1.6 Compostos fenólicos e antocianinas

Vários autores já identificaram compostos fenólicos no grão de arroz, principalmente ácidos fenólicos e antocianinas (HUDSON et al., 2000; HU et al., 2003; GOFFMAN; BERGMAN, 2004; TIAN et al., 2004; ZHOU et al., 2004; YAWADIO, TANIMORI; MORITA, 2007; PAIVA et al., 2014; PEDRO; GRANATO; ROSSO, 2016; PENGKUMSRI et al., 2015; TIAN et al., 2004; ZAUPA et al., 2015). Os compostos fenólicos do arroz existem nas formas solúvel e insolúvel (conjugados), e aproximadamente 81 % do conteúdo está representado na forma solúvel nos grãos com pericarpo vermelho e preto (MIRA et al., 2009).

A cor do pericarpo está relacionada ao tipo e a concentração de polifenóis no grão, os quais apresentam variação entre os diferentes genótipos. Normalmente, grãos com pericarpo vermelho e preto apresentam maior concentração de compostos fenólicos do que aqueles com pericarpo marrom-claro (TIAN et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Dez genótipos de arroz, 5 não pigmentados, 4 com pericarpo vermelho e 1 com pericarpo preto foram avaliados por Mira et al (2008). Os autores observaram que os ácidos *p*-cumárico e ferúlico foram os majoritários nas amostras de arroz vermelho,

enquanto na amostra de arroz preto o ácido protocateuico foi o predominante, seguido pelos ácidos ferúlico, vanílico e *p*-cumárico.

Além dos ácidos ferúlico e protocateuico, o ácido caféico também foi identificado em grãos com periparcos vermelho e preto no estudo de Morimitsu et al (2002), o qual objetivou quantificar as antocianinas e avaliar o efeito inibitório desses dois tipos de arroz na formação de catarata em ratos.

Ácido sinápico, *p*-cumárico e o ferúlico foram encontrados entre os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos protocateuico e vanílico entre os ácidos bezóicos no estudo de Min, McClung e Chen (2014), no qual objetivaram avaliar os efeitos de diferentes processos hidrotérmicos nos compostos antioxidantes de grãos de arroz marrom, preto e vermelho.

Chung e Shin (2007), Yawadio, Tanimori e Morita (2007), Sompong et al (2011), Shao et al (2014a) e também identificaram os ácidos protocateuico, vanílico e ferúlico como os ácidos fenólicos predominantes em amostras de arroz preto analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas (HPLC-MS). Shao et al (2014b), ao investigar o teor de ácidos fenólicos de grãos de arroz branco integral, vermelho e preto em diferentes estágios de maturação também encontraram esses ácidos como majoritários nas amostras analisadas.

Na pesquisa de Qiu, Liu e Beta (2010) os ácidos ferúlico, sinápico e *p*-cumárico foram os predominantes na fração insolúvel para as duas cultivares de arroz preto analisadas, já na fração solúvel o ácido vanílico predominou. Nenhum ácido fenólico foi encontrado na fração solúvel das cultivares de arroz preto analisadas no estudo de Zhang et al (2015), enquanto na fração conjugada insolúvel foram encontrados os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, isoferúlico e vanílico.

Zaupa et al (2015) identificaram os ácidos protocateuico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e alguns conjugados hexosídeos e hidroxicinâmicos por HPLC-MSⁿ em amostras de arroz vermelho e preto cultivados na Itália e investigaram a influência de dois métodos de cocção na redução desses compostos.

Em estudo que investigou a eficiência do método de extração de compostos fenólicos de arroz pigmentado, o ácido protocateuico foi o composto majoritário em amostra de arroz preto, seguido pelos ácidos ferúlico, vanílico, 4-hidróxibenzóico e *p*-cumárico (ALVES et al., 2016).

No arroz vermelho o ácido ferúlico foi o majoritário, seguido pelos ácidos *trans*-sinápico e sirínico no estudo de Shao et al (2014a). Em investigação realizada por

Sompong et al (2011), o ácido ferúlico também foi o predominante, no entanto os ácidos protocatecuico e vanílico foram os outros ácidos predominantes encontrados.

O conteúdo total de ácidos fenólicos e antocianinas foi determinado em 8 variedades de arroz vermelho por HPLC-MS no estudo de Gunaratne et al (2013), no entanto a identificação desses compostos não foi investigada. No estudo de Chen et al (2012) foi identificada a presença da antocianina malvidina-3-glicosídeo em cultivares de arroz vermelho, enquanto Frank et al (2012) encontraram cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo em três subespécies de arroz vermelho cultivados na China. Em outro estudo foi analisada a composição de antocianinas de diversos grãos de cores preta, azul, rosa, roxa e vermelha. A cianidina-3-glicosídeo foi a mais abundante antocianina identificada, seguida pela peonidina-3-glicosídeo nas amostras de arroz preto e vermelho (ABDEL, YOUNG & RABALSKI, 2006). Pengkumsri et al (2015) afirmam que o arroz preto consiste em uma fonte mais rica de compostos fenólicos em relação a grãos de coloração vermelha e marrom. Em seu estudo foram identificados em análise por HPLC no arroz preto os ácidos protocatecuico, cafeico, siríngico e *p*-cumárico, enquanto no arroz vermelho apenas o ácido *p*-hidroxibenzóico.

No arroz preto ainda foram identificadas as antocianinas cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo (BORDIGA et al., 2014; HU et al., 2003; CHEN et al., 2006; YAWADIO; TANIMORI; MORITA, 2007; CHEN et al., 2012; FRANK et al., 2012; HU et al., 2003; HOU et al., 2013; PEREIRA-CARO et al., 2013; BORDIGA et al., 2014; MIN; MCCLUNG; CHEN, 2014; YAWADIO; TANIMORI; MORITA, 2007, PENGKUMSRI et al., 2015; SHAO et al, 2014a; SOMPONG et al., 2011; ZHANG et al., 2010; PENGKUMSRI et al., 2015; ZHANG et al., 2015), cianidina-3-arabidosídeo (PEREIRA-CARO et al., 2013), -3-glicosídeo (BORDIGA et al., 2014; CHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2006), pelargonidina-3,5-diglicosídeo (ZHANG et al., 2006) e petunidina-3-glicosídeo (MORIMITSU et al., 2002). Assim como na maioria dos estudos, a cianidina-3-glicosídeo foi a antocianina predominante nas cultivares de arroz preto analisadas por Min et al (2012), seguida por peonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Enquanto na cultivar de arroz vermelho foi evidenciada a presença de proantocianinas. Zaupa et al (2015) identificaram sete diferentes antocianinas em amostra de arroz preto, enquanto no arroz vermelho não foi evidenciada nenhuma. A ausência de níveis significativos de antocianinas em arroz vermelho já foi descrita por diferentes pesquisadores (BORDIGA et al., 2014;

FINOCCHIARO; FERRARI; GIANINETTI, 2010; GUNARATNE et al., 2013; PAIVA et al., 2014; PENGKUMSRI et al., 2015; SHAO et al., 2014a).

Estudos *in vitro* e *in vivo* já evidenciaram efeito inibitório no crescimento de células cancerígenas promovido pela ação de antocianinas extraídas de arroz preto (CHEN et al., 2006; HYUN; CHING, 2004), o que sugere que a ingestão desses compostos pode ser benéfica à saúde.

3.2 Atividade antioxidante

Grãos de arroz com pericarpo pigmentado têm sido referidos como potenciais fontes de antioxidantes (SHAO et al., 2014a; SHAO et al., 2014b; CHEN et al., 2016;). Em vista disso, grande interesse tem surgido para que essas matérias primas sejam utilizadas como fontes viáveis de antioxidantes para alimentos funcionais (YAWADIO, TANIMORI; MORITA, 2007). Além disso, pesquisas têm correlacionado positivamente o potencial antioxidante desses grãos com a presença de fenólicos (ITANI et al., 2002; GOFFMAN; BERGMAN, 2004; ZHANG et al., 2006).

Estudos para avaliar a atividade antioxidante de grãos integrais e farelos de arroz branco, vermelho e preto encontraram a maior atividade antioxidante exercida pelos grãos de coloração vermelha e preta em relação aos brancos. Além disso, uma alta correlação foi observada entre essa atividade e o conteúdo de proantocianidinas no arroz vermelho e, com o teor de antocianinas, no caso de grãos com pericarpo preto (OKI et al., 2002; JUN et al., 2012; MIN et al., 2012). As proantocianidinas também foram as principais responsáveis, juntamente com os ácidos fenólicos, pela atividade antioxidante de oito variedades de arroz vermelho cultivado no Sri Lanka, com destaque para as variedades tradicionais que apresentaram teores superiores aos das variedades que sofreram melhoramento (GUNARATNE et al., 2013).

Na investigação realizada por Chen et al (2012), o teor de antocianinas de três cultivares de arroz preto foi muito superior ao das quatro cultivares de arroz vermelho analisadas, no entanto, grande variação foi observada na quantidade desses compostos entre as cultivares de mesma cor. A atividade antioxidante avaliada por ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) foi superior para os grãos de pericarpo vermelho em relação aos pretos, o que indica que as antocianinas contribuíram muito pouco para a atividade antioxidante encontrada, a qual pode ser derivada de outros compostos fenólicos. Sompong et al (2011), ao avaliar nove variedades de arroz

vermelho e três de preto, encontraram diferença significativa no conteúdo de fenólicos totais e na capacidade antioxidante entre as variedades, mas não entre as cores. Resultado similar ao encontrado por Walter et al (2013) que avaliaram 16 cultivares vermelhas de diferentes regiões do Brasil, uma preta e uma marrom claro.

Outro trabalho encontrou maior atividade antioxidante exercida pelo arroz preto, seguida do vermelho, e novamente, alta correlação foi encontrada entre o conteúdo de fenólicos e a capacidade antioxidante ($r=0,96$) (SHEN et al., 2009). Da mesma forma Choi, Jeong e Lee (2007) encontraram coeficiente de correlação superior a 0,99 entre o conteúdo de polifenóis totais e a atividade antioxidante avaliada por ABTS para a amostra de arroz preto analisada, na qual a maior fração de polifenóis do extrato é representada pelas antocianinas, assim como Laokuldilok et al (2011); Zhang et al (2006) e Kaneda, Kubo e Sakurai (2006) que atribuíram a atividade antioxidante de arroz e farelo de arroz preto ao conteúdo de antocianinas do grão.

A análise de duas cultivares de arroz preto e cinco de arroz vermelho cultivadas no norte da Itália evidenciou variação na capacidade antioxidante entre todas as amostras com destaque para um dos genótipos de arroz preto (Artemide), o qual apresentou elevado conteúdo de proantocianidinas, antocianinas e polifenóis e atividade antioxidante em torno de duas vezes superior ao de outros grãos de arroz pigmentados (FINOCCHIARO; FERRARI; GIANINETTI, 2010), mesmo resultado relatado por Bordiga et al (2014). Significante diferença foi encontrada no conteúdo fitoquímico e na atividade antioxidante de farelos de doze variedades de arroz preto. A atividade antioxidante foi determinada pelo método ORAC e mostrou correlação com o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas (ZHANG et al., 2010). Esses resultados sugerem que os fenólicos são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante no grão de arroz (GOFFMAN; BERGAMAN 2004; QIU; LIU; BETA, 2010).

A atividade antioxidante de extratos de arroz vermelho, preto e marrom foi avaliada a partir de diferentes métodos *in vitro* (FRAP, inativação dos radicais ABTS, DPPH, ânion superóxido e óxido nítrico e inibição da peroxidação lipídica), com exceção do ensaio DPPH, cuja inibição evidenciada pelos extratos de arroz vermelho e preto foi similar, para todos os outros ensaios o extrato de arroz preto mostrou a maior capacidade antioxidante (PENGKUMSRI et al., 2015). Da mesma forma, Zaupa et al (2015) também encontraram a maior capacidade antioxidante, realizada a partir do ensaio FRAP, exercida pelo arroz preto, seguida das variedades vermelha e branca.

Além disso, esses mesmos autores revelaram que o processo de cocção do tipo risotto causou redução da capacidade antioxidante nas amostras de arroz vermelho e branco e aumento no arroz preto. Outro estudo demonstrou que uma variedade de arroz preto glutinoso apresentou a maior capacidade de inativação do radical DPPH e valor FRAP, seguida por uma amostra de arroz preto, obtida a partir do cruzamento de duas cultivares, e uma amostra de arroz vermelho, e atribuiu essa característica ao maior conteúdo de antocianinas presente nessa amostra em relação às outras duas. No mesmo estudo, foi realizado o teste de estabilidade oxidativa de óleo de girassol. O resultado final demonstrou que após 30 dias submetidos ao processo de oxidação acelerada, o valor de peróxidos da amostra de óleo controle foi igual a $98,6 \text{ meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$, enquanto da amostra adicionada de extrato de arroz preto foi de $67,8 \text{ meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$, o que não diferiu do valor obtido da amostra adicionada de antioxidante sintético BHT, cujo valor de peróxidos foi igual a $62,9 \text{ meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$. Esse resultado reflete que o antioxidante natural proveniente do arroz preto é tão eficaz quanto o antioxidante sintético na prevenção da peroxidação lipídica de óleo de girassol (CHINPRAHAST; TUNGSOMBOON; NAGAO, 2016). Maior capacidade antioxidante também foi evidenciada para o arroz preto em relação ao vermelho e o branco, em estudo que avaliou dois diferentes métodos de extração de fenólicos totais e antocianinas totais, os autores também encontraram o teor mais elevado desses compostos no grão de arroz preto em comparação às outras amostras (PITCHAON; LADDAWAN, 2014).

Ainda, outro estudo foi realizado para analisar a atividade antioxidante em quatro estágios de desenvolvimento após o florescimento de grãos de arroz com periparco branco, vermelho e preto. Os resultados relevaram que para os grãos de arroz preto o conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante foram mais elevados na maturidade, enquanto para os grãos de arroz branco e vermelho, o maior acúmulo foi encontrado na primeira semana (SHAO et al., 2014b).

Deng et al (2012) investigaram a capacidade antioxidante pelo método de inativação do radical ABTS de 24 grãos produzidos na China, entre os quais, diferentes tipos de arroz, milho, aveia, trigo, sorgo, semente de coix e evidenciaram que o arroz preto e o vermelho foram os cereais com maior capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais entre todos os cereais testados.

Pesquisas *in vivo* também já foram descritas na literatura. Estudos já revelaram que as antocianinas do arroz preto apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias capazes de contribuir para a prevenção de dano ao DNA (HU et al., 2003),

auxiliam na prevenção do câncer através da inibição do crescimento de células tumorais (CHEN et al., 2006; HYUN; CHUNG, 2004), na prevenção das complicações do diabetes por causar inibição da enzima aldose redutase, envolvida no desenvolvimento dessa patologia (MORIMITSU et al., 2002; YAWADIO; TANIMORI; MORITA, 2007) e promovem efeito cardioprotetor em pacientes com doença cardíaca coronariana através de melhora no status antioxidante do plasma e redução da inflamação (WANG et al., 2007).

A influência da suplementação com farelo de arroz preto na formação de placa aterosclerótica em coelhos induzidos a hipercolesterolemia também já foi investigada. Uma vez que os parâmetros colesterol total e frações e apolipoproteína B não diferiram entre os grupos controle e tratamento, foi concluído que a inibição da formação de aterosclerose gerada pelo farelo de arroz preto deve ser mediada por efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (LING; WANG; MA, 2002).

Apesar da importância da realização de ensaios químicos *in vitro* para avaliar atividade antioxidante, esse tipo de estudo apresenta como ponto negativo o fato de não considerar os fatores de biodisponibilidade, absorção e metabolismo dos compostos antioxidantes. Dessa forma, ensaios clínicos com animais e humanos se fazem necessários. No entanto, esses, apresentam a inconveniência de demandarem um custo elevado e ainda um período mais extenso de estudo. Com base nesse contexto, uma alternativa pode ser encontrada na utilização de culturas de células para avaliar a atividade antioxidante, uma vez que os resultados podem ser obtidos em um curto espaço de tempo e ainda englobam uma abordagem sobre absorção, distribuição e metabolismo dos antioxidantes. Além disso, podem ser utilizados como rastreio inicial da ação antioxidante em alimentos (WOLFE; LIU, 2007). Uma série de estudos sobre o efeito neuroprotetor de compostos bioativos tem abordado o modelo celular SH-SY5Y (FERNÁNDEZ-MORIANO et al., 2015; VENUPRASAD; KUMAR; KHANUM, 2013; RABELO et al., 2012). A linhagem de células SH-SY5Y representa uma sublinhagem clonada três vezes do neuroblastoma SK-N-SH, sua utilização data da década de 80, período no qual foi denominada como modelo “neuron-like”, devido suas propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes aos neurônios (HONG-RONG; LIN-SEM; GUO-YI, 2010).

Apesar de haver uma expressiva quantidade de estudos sobre a avaliação da atividade antioxidante dos extratos de arroz vermelho e preto utilizando métodos de capacidade de eliminação dos radicais ABTS e DPPH, capacidade de absorção de

radicais de oxigênio (ORAC) e testes de capacidade de quelação de ferro (Paiva et al., 2014), até o presente momento não há estudos sobre os efeitos protetores de extratos de farelo de arroz vermelho e preto em células semelhantes a neurônios. Na literatura, apenas um estudo avaliou e evidenciou efeito antioxidante e anti-apoptótico de um extrato rico em orizanol de farelo de arroz contra a toxicidade de H₂O₂ em células SH-SY5Y (ISMAIL; IMAM e UMAR, 2014).

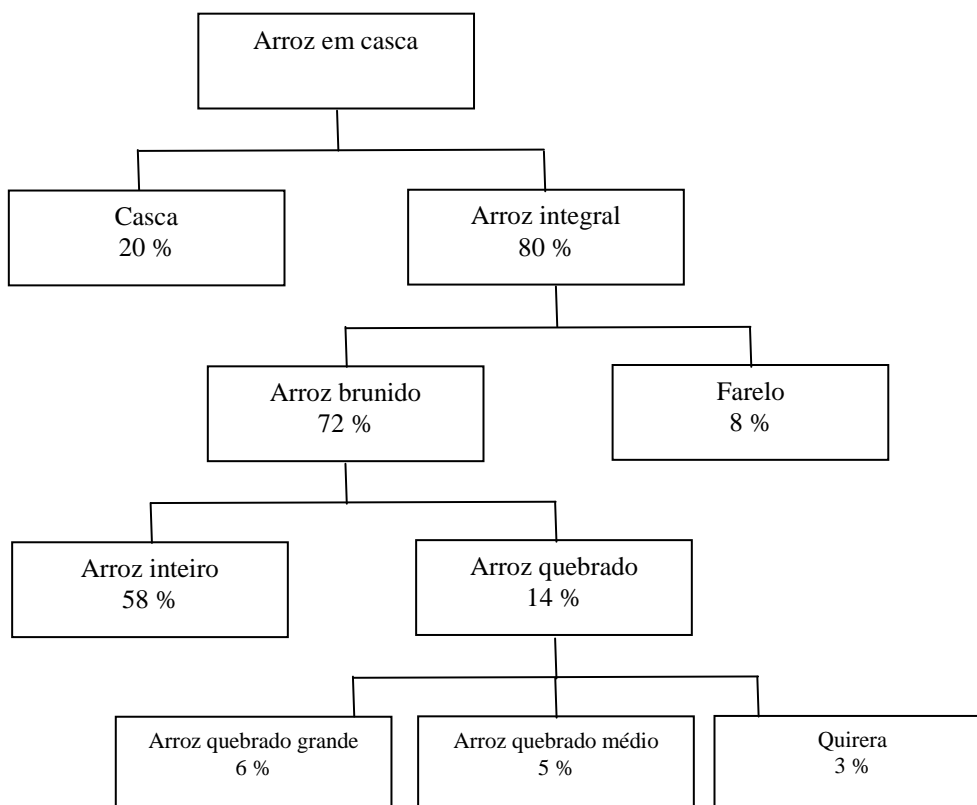
3.3 Beneficiamento

O beneficiamento dos grãos de arroz inicia-se após a limpeza e compreende o descascamento, onde é removido cerca de 20% de casca, seguida pelas etapas de brunimento e polimento do arroz integral, onde é extraído, parcial ou totalmente, o embrião e a maior parte do pericarpo que recobre o grão. Desta etapa, resulta o farelo que representa aproximadamente 8% da massa do produto. Em seguida, segue-se a etapa de separação das frações de grãos quebrados (14 %) e inteiros (58 %). Ao final, realiza-se a separação das frações dos grãos quebrados em grandes, médios e quirera, conforme demonstrado na Figura 1 (CASTRO et al., 1999).

Os grãos quebrados representam comprimento inferior a 75% do comprimento mínimo da classe que predominam e ficam retidos na peneira de furos circulantes de 1,6 mm de diâmetro, enquanto a quirera de arroz corresponde ao fragmento que passa por essa peneira (BRASIL, 2009).

No entanto ainda não existe um padrão oficial do grau de polimento do arroz vermelho, razão pela qual no trabalho de Boêno, Ascheri e Bassinello (2011) foi utilizado como referência o grau de polimento de uma amostra comercial encontrada em mercado local do Nordeste. Apesar de os grãos de arroz vermelho e preto serem culturalmente comercializados e consumidos na forma integral, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de investigar o efeito do polimento sobre as propriedades antioxidantes (WALTER et al., 2013), composição centesimal e propriedades estruturais desses grãos (PAIVA et al., 2015).

Figura 1. Beneficiamento do arroz em casca com as proporções aproximadas de seus produtos e subprodutos.



Fonte: Castro et al (1999)

3.4 Subprodutos do arroz

3.4.1 Farelo de arroz

O farelo constitui em média 8% do grão e possui conteúdos variáveis de amido provenientes do endosperma, de resíduos de casca e de fragmentos de grão, o que representa um subproduto que possui teores variáveis de nutrientes, que dependem do sistema de beneficiamento, do grau de polimento dado ao arroz, do tratamento do grão antes do beneficiamento e da cultivar (JÚNIOR et al., 2009).

Os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas, que dão origem ao farelo, apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. Assim, o polimento reduz o teor de nutrientes, exceto de amido, o que

origina as diferenças na composição entre o arroz polido e o integral (WALTER et al., 2008).

O farelo contém uma quantidade substancial de minerais como K, Ca, Mg e Fe (SHARIF et al., 2014). A maior concentração de fenólicos também está localizada majoritariamente nas camadas externas do grão, assim, em torno de 70 % a 90 % da totalidade dos ácidos fenólicos encontra-se na fração farelo dos grãos com pericarpo marrom-claro (ZHOU et al., 2004). Da mesma forma, em grãos com pericarpo preto, o maior teor (aproximadamente 85 %) de antocianinas também está presente principalmente na fração mais externa desses grãos (HU et al., 2003), com variação que depende da cultivar e dos compostos considerados. A presença de antioxidantes como tocoferóis, tocotrienóis e γ -orizanol atrai perspectivas de utilização do farelo de arroz para os seres humanos como ingrediente funcional (SHARIF et al., 2014).

Não somente o teor de compostos fenólicos torna esse subproduto atrativo para seu emprego na indústria alimentícia como também o conteúdo de fibras presentes, propriedades que podem contribuir para o desenvolvimento de diversos novos produtos (JÚNIOR et al., 2009). Outra vantagem atrelada ao farelo está no fato de que esse alimento não possui glúten e pode assim atender a um nicho específico de mercado que vem crescendo nos últimos anos representado por pessoas portadoras da doença celíaca (LACERDA et al., 2010).

Apesar do conteúdo de lipídios no grão de arroz ser muito baixo, o farelo, por sua vez, contém quantidades significativas desse macronutriente, cerca de 20 % (USP, 2004). Entre os quais, os principais são os ácidos graxos insaturados - oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) (ZHOU et al., 2002).

No entanto, mesmo com todos os benefícios socioeconômicos e nutricionais, sua utilização ainda é modesta (HEISLER et al., 2008). O farelo de arroz apresenta abundância e baixo valor comercial, com aplicação na indústria brasileira, para extração de óleo, como ração animal e fertilizante (LACERDA et al., 2010). Entretanto, na literatura científica há poucos estudos sobre as aplicações do farelo de arroz em produtos para a alimentação humana (JÚNIOR et al., 2009).

A adição de diferentes teores de farelo de arroz já foi avaliada na formulação de pães (JÚNIOR et al., 2008; SAIRAM; KRISHNA; UROOJ, 2011; AMEH; GERNAH; IGBABUL, 2013;) e biscoitos (LACERDA, 2008), como alternativa ao uso exclusivo da farinha de trigo, e os resultados demonstraram aumento no conteúdo de proteínas,

fibras e minerais em relação à formulação convencional a base de trigo, além de boa aceitação nos testes sensoriais.

Os atributos químicos e funcionais de macarrão à base de trigo suplementado com farelo de arroz preto também já foram investigados, e os resultados demonstraram uma melhora no perfil nutricional (maior teor de lipídeos, proteínas e minerais em relação ao controle) e na atividade antioxidante, atribuído ao elevado teor de compostos fenólicos presentes no arroz preto (KONG et al., 2012). Ainda, a utilização de farelo de arroz como antioxidante natural em linguiça de frango foi analisada e considerada um método eficiente para retardar a oxidação lipídica desse produto, tanto na forma crua, como cozida (BONIN; SARTOR, 2011).

3.4.2 Quirera

Os grãos quebrados e a quirera, subprodutos do beneficiamento do arroz, representam aproximadamente 14 % do total de arroz beneficiado, o que gera um problema econômico, uma vez que o valor comercial da quirera corresponde em média a quinta parte do valor do grão inteiro e sua utilização se restringe basicamente na indústria cervejeira, em vinícolas e na alimentação animal (CASTRO et al., 1999; LIMBERGER et al., 2008). Ao considerar que a composição centesimal desse subproduto é muito similar a do grão inteiro polido, ou seja, uma rica fonte de amido (75 %-80 %), uma das alternativas para agregar valor aos grãos quebrados seria a produção de farinha de arroz (SHENG, 1995).

O uso da farinha de quirera de arroz representa uma alternativa de inovação tecnológica para os rizicultores, uma vez que agrega valor a esse subproduto. Além disso, oferece uma alternativa de substituição parcial da farinha de trigo pela de arroz, o que proporciona uma redução da dependência pelo trigo existente no cenário atual brasileiro (FROES, 2012).

Outro fator relevante é o fato de ser um componente que apresenta baixo teor de alergenicidade e pode ser aplicado como ingrediente em produtos para populações especiais, como o caso dos pacientes celíacos, que possuem alergia à proteína do trigo, aveia, centeio e cevada (TEDRUS et al., 2001; NABESHIMA; EL-DASH, 2004).

3.4.3 Amido

O amido é considerado o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados, em razão das características texturais, possui aplicações industriais como espessante, estabilizador de colóides, agente gelificante e de volume, adesivo, na retenção de água, dentre outros (SINGH et al., 2003).

Assim como os demais constituintes dos grãos de arroz, a quantidade de amido pode variar entre diferentes cultivares devido a fatores genéticos e ambientais. Este fato foi comprovado no trabalho de Storck, Silva e Fagundes (2005), que evidenciou valores entre 82,2 % e 88,0 % (b.s.) entre nove cultivares reproduzidas geneticamente e cultivadas em uma fazenda experimental no sul do Brasil. Da mesma forma Frei, Siddhuraju e Becker (2003), que avaliaram seis cultivares de arroz, cultivadas em sistema de agricultura de subsistência orientada em terras indígenas das Filipinas, observaram teores de amido entre 72 % e 82 %. O processamento também influenciou o percentual de amido e foi maior no arroz branco polido (87,58 %) e no parboilizado polido (85,08 %) comparado ao integral (74,12 %), devido à remoção do farelo (FREI; SIDDHURAJU; BECKER, 2003). Quatro cultivares de arroz vermelho, estudadas por Boêno, Ascheri & Bassinello (2011), também apresentaram diferença em relação ao teor de amido, com variação de 81,7 % a 89,1 %.

As propriedades texturais, como maciez, coesão, cor, brilho e volume de expansão estão intimamente relacionadas ao teor de amilose do grão. A maciez do arroz é inversamente proporcional ao teor de amilose, assim cultivares com baixo teor de amilose apresentam grãos muito macios e pegajosos após o cozimento (FERREIRA et al., 2005).

O teor de amilose do amido do arroz pode variar de 1 % a 37 %, podendo ser classificado em quatro diferentes grupos: baixo teor de amilose (12-20 %), conteúdo intermediário de amilose (20-25 %), alto teor de amilose (> 25 %) e ceroso (pouco a nenhum teor de amilose) (TECHAWIPHARAT; SUPHANTHARIKA; BEMILLER, 2008).

Nas diferentes variedades de grãos vermelho, branco e preto avaliados no estudo de Walter (2009), os valores variaram entre 17,82 % e 28,04 % (variação de 36,4%), na qual a maioria apresentou teor de amilose de intermediário a alto, com exceção da variedade IAC 600 com pericarpo preto (teor de amilose baixo).

Na investigação realizada por Sompong et al (2011) a maioria das cultivares de arroz com pericarpo vermelho apresentou alto conteúdo de amilose, sendo o maior teor 41,95 %. Entre as cultivares com pericarpo preto duas amostras apresentaram baixo teor (8,90 % e 9,66 %) e, uma amostra, alto teor (25,49 %). No trabalho de Boêno, Ascheri e Bassinello (2011) o teor de amilose das quatro cultivares de arroz vermelho variou de 14,6 % a 26,1 %. Variação similar foi encontrada na pesquisa realizada por Patindol et al (2006), na qual o conteúdo de amilose variou de 15,9 % a 26,5 % entre as dezesseis variedades de arroz vermelho cultivadas no sul dos Estados Unidos da América.

Da mesma forma, a análise de quatro diferentes variedades de arroz com pericarpo vermelho oriundas de um programa de beneficiamento genético do nordeste brasileiro revelou variação entre as variedades, com uma variedade com baixo teor de amilose (15,0 %) e três com teores intermediários (24,0 % - 25,0 %) (PEREIRA et al., 2009).

As características físico-químicas de cinco variedades de arroz preto e de uma variedade branca foram avaliadas por Kang et al (2011). Os resultados deste estudo sugeriram que as variedades de arroz preto têm menor teor de amilose do que o arroz branco comum, sendo esse resultado determinado através de ensaio colorimétrico em que o iodo se liga a amilose produzindo um complexo de coloração azul.

Entretanto, o volume de produção do amido de arroz ainda não é expressivo e suas características especiais deveriam ser melhor exploradas. O pequeno tamanho dos grânulos deste tipo de amido e sua ampla faixa de teores de amilose aumentam as oportunidades para aplicações comerciais (ZHONG et al., 2009).

3.5 Aproveitamento de subprodutos para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis

Atualmente existe uma grande pressão política e social em relação à redução da carga poluente proveniente de atividades industriais. Essa tem sido uma preocupação dos órgãos ambientalistas não somente do Brasil, como também de países do mundo todo. Praticamente todos os países, desenvolvidos e em desenvolvimento, tentam se adaptar a essa realidade por meio da modificação dos seus processos de forma a reciclar ao máximo todo e qualquer resíduo ou subproduto produzido em suas estações de processamento. Nesse sentido, a maioria das grandes empresas tem hoje uma visão na qual os resíduos e os subprodutos não devem ser considerados inutilizáveis, mas sim matérias-primas para outras indústrias. Nesta linha de pensamento, além de deixarem de

ser problema, os resíduos e os subprodutos passam a fazer parte de novas tecnologias para desenvolvimento de produtos de interesse, entre os quais merece destaque nesta revisão os filmes biodegradáveis (DRAGONE, 2007).

O mercado de embalagens para alimentos é um grande consumidor de polímeros sintéticos. Devido a sua grande disponibilidade e baixo custo, as embalagens sintéticas são as mais utilizadas, pois apresentam boas características mecânicas e boa barreira aos gases e aromas. Dessa forma, o aumento do uso de embalagens sintéticas tem contribuído fortemente para os problemas ecológicos devido a sua não biodegradabilidade (AHMAD et al., 2015).

Nesse sentido, têm-se reconhecido à necessidade de que haja redução na produção e descarte de embalagens plásticas, fato que tem incentivado pesquisadores no mundo inteiro a desenvolver embalagens biodegradáveis provenientes de fontes renováveis (PELLISSARI et al., 2013; GUTIÉRREZ et al., 2015; PAGNO et al., 2015).

Os filmes biodegradáveis e comestíveis são classificados como embalagens biodegradáveis que podem ou não interagir com o alimento, e apresentam a capacidade de conservar suas propriedades nutricionais e aumentar sua vida de prateleira. Filme biodegradável é o termo dado a uma fina película formada a partir de macromoléculas biodegradáveis e pode ser dividido em três categorias: hidrocoloide (amido, proteínas, celulose, alginatos, pectinas e outros polissacarídeos), lipídico (ceras, acilglicerois e ácidos graxos) e composto (hidrocoloides combinados a lipídicos) (PETERSSON; STADING, 2005).

A formação dos filmes biodegradáveis ocorre na presença de macromoléculas, para formar uma rede polimérica, solvente (água ou etanol) e plastificante, geralmente polióis, como o glicerol e o sorbitol, os quais atuam para redução da fragilidade dos filmes (ORTEGA-TORO et al., 2016; SELIGRA et al., 2016). A formação dos filmes geralmente envolve associações inter e intramoleculares ou ligações cruzadas de cadeias de polímeros formando uma rede tridimensional semi-rígida que retém o solvente (RINDLAV-WESTLING; STADING; GATENHOLM, 2002; THARAHATHAN, 2003).

Uma das técnicas de preparação de filmes bastante difundida na literatura é a de *casting*, que consiste no espalhamento de uma solução filmogênica (macromoléculas, solvente e plastificante) em um suporte, seguido de desidratação lenta a baixa temperatura (VICENTINI, 2003; DOLE et al., 2004; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008).

O uso do amido como material formador de filme comestível tem recebido grande interesse, uma vez que além de apresentar custo muito baixo, constitui o polissacarídeo mais abundante e importante na natureza (BLÁCIDO; SOBRAL; MENEGALLI, 2005). Amidos de diferentes fontes vegetais, tais como batata, milho (LI et al., 2011), trigo (FAKHOURI et al., 2007), arroz (DIAS et al., 2010), pinhão (LUCHESE et al., 2015); mandioca (MALI et al., 2005; CHINMA; ARIAHU; ALAKALI, 2013; GUTIERREZ et al., 2015; MARAN et al 2013; GUTIERREZ et al., 2015), quinoa (ARAUJO-FARRO et al., 2010); banana (PELISSARI et al., 2013), naturais ou modificados, têm sido utilizados para essa finalidade (AVÉROUS et al., 2001; LAROTONDA et al., 2005).

O uso de amido de arroz extraído por método alcalino, adicionado de óleo de coco e extrato de chá em diferentes combinações, foi utilizado na formulação de filmes biodegradáveis e coberturas aplicadas sobre tomates para estender sua vida de prateleira (DAS; DUTTA; MAHANTA, 2012). As análises do amido revelaram níveis insignificantes de lipídeos, proteínas e cinzas e alto teor de amilose (28,8 %). Os resultados revelaram que a adição de lipídios e de extrato de chá na solução filmogênica de amido/glicerol melhorou a integridade da superfície dos filmes, mas diminuiu a solubilidade e estabilidade das coberturas e dos filmes. A retrogradação do amido foi reduzida pela formação de complexo amilose-lípido que ocorreu durante a adição de óleo de coco, conforme sugerido pela análise de calorimetria diferencial de varredura. Ainda, esses filmes foram capazes de aumentar a vida útil dos tomates à temperatura ambiente, além de apresentar propriedades de barreira microbiológica.

Filmes compostos de gelatina combinados com diferentes fontes de amidos nativos (trigo, sorgo, batata e arroz) foram produzidos e caracterizados quanto às propriedades físico-químicas e mecânicas. As mesmas soluções filmogênicas foram preparadas e aplicadas como coberturas em uvas para avaliação sensorial e acompanhamento da perda de massa durante 22 dias. O filme com amido de sorgo apresentou as melhores características entre os filmes formulados e as coberturas de sorgo e arroz foram as mais eficientes na extensão da vida útil das uvas (FAKHOURI et al., 2007). Estudo semelhante avaliou a produção de filmes comestíveis feitos a partir de ágar, amido de mandioca, amido de arroz normal e amido de arroz ceroso. Essas formulações foram testadas para uso potencial como coberturas. Os resultados revelaram melhores propriedades funcionais para os filmes feitos de ágar e amido de

mandioca ao invés daqueles formulados à base dos dois tipos de amido de arroz (PHAN et al., 2005).

Um estudo que desenvolveu filmes biodegradáveis de amido de arroz e quitosana, pela técnica de *casting*, evidenciou que a incorporação de quitosana à solução filmogênica melhorou as características mecânicas, mas causou aumento da permeabilidade ao vapor de água (BOURTOOM; CHINNAN, 2008). No intuito de melhorar essa característica foi avaliado o efeito da incorporação de diferentes fontes de lipídeos (ácido oleico, óleo de palma e margarina) nesses filmes. A permeabilidade ao vapor de água foi reduzida após a incorporação das fontes lipídicas nos filmes, o que pôde ser comprovado por meio da aplicação dos filmes em biscoitos que mantiveram a dureza, menor teor de umidade e tiveram vida de prateleira estendida em comparação ao grupo controle (sem filme) (BOURTOOM; CHINNAN, 2009).

A análise da interferência da umidade relativa e do plastificante nas propriedades físicas e mecânicas de filmes de amido com alto teor de amilose de arroz e de amido de ervilha foi realizada por Mehyar e Han (2004). Os resultados revelaram que a adição do plastificante sorbitol gerou filmes mais homogêneos. A resistência à ruptura de ambos os filmes diminuiu quando a umidade relativa aumentou de 51% para 90%, enquanto a alongação aumentou. A permeabilidade ao vapor de água dos dois filmes foi similar. A permeabilidade ao oxigênio foi muito baixa com umidade relativa abaixo de 40% e ocorreu um aumento da umidade relativa. Finalmente, o filme de amido de arroz com alto teor de amilose apresentou maior solubilidade em água comparado ao filme de amido de ervilha. Concluiu-se que as duas matérias-primas possuem excelente propriedade de barreira de oxigênio e grande capacidade de alongação, com propriedades comparáveis ou superiores àsquelas de filmes de outras fontes como proteína do soro do leite, proteína de soja e glúten.

Colussi et al (2014) avaliaram a produção de filmes biodegradáveis de amido de arroz branco nativo e acetilado com diferentes teores de amilose e referiram que os filmes elaborados a partir de amido nativo não apresentaram características adequadas, enquanto que a acetilação propiciou melhor homogeneidade, maior alongação e maior resistência à temperatura dos filmes elaborados com amidos de média e alta amilose, entretanto aumentou a deficiência nas propriedades de solubilidade em água e em ácido e reduziu a resistência à tração. A modificação de amido de arroz com carboximetilcelulose de sódio submetido ao aquecimento exerceu melhoria nas propriedades de filmes biodegradáveis, uma vez que os filmes modificados mostraram

aumento na resistência à tração e redução da permeabilidade ao vapor de água e oxigênio. Ficou evidenciado que esse processo de modificação forneceu propriedades desejáveis a filmes à base de amido (LI et al., 2008). As características e as propriedades de filmes biodegradáveis feitos a partir de amido de arroz nativo e amido de arroz hidroxipropilado com óxido de propileno em diferentes concentrações foram investigadas por Woggum, Sirivongpaisal e Wittaya (2015). As análises demonstraram que os filmes biodegradáveis produzidos a partir do amido de arroz modificado apresentaram aumento no alongamento na ruptura, na permeabilidade ao vapor de água, na solubilidade e na transparência. No entanto, o valor de resistência à tração diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de óxido de propileno.

O efeito de diferentes plastificantes nas propriedades mecânicas e de barreira de filme de amido de arroz foi investigado por Laohakunjit e Noomhorm (2004). Esse trabalho revelou que tanto o sorbitol quanto o glicerol são eficazes na confecção de soluções filmogênicas, auxiliando na produção de filmes homogêneos, claros e lisos. Com maior resistência e menor taxa de transmissão de oxigênio e taxa de transmissão de vapor de água, o plastificante sorbitol na concentração de 30 % revelou apresentar o melhor desempenho. No entanto, filmes desenvolvidos a partir de um agente formador isolado, muitas vezes apresentam deficiências em relação a algumas propriedades tecnológicas fundamentais para a obtenção da manutenção das características do alimento durante seu processo de estocagem. Enquanto filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas possuem excelentes propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, com eficientes barreiras contra migração de óleos e gorduras e ainda apresentam efetiva barreira aos gases (CO_2 e O_2), são sensíveis à umidade e, por isso, têm alto coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (KROCHTA, 2002; PALMU et al., 2003). Ao contrário, filmes desenvolvidos a partir de lipídios são usados pela excelente propriedade de barreira contra umidade, mas são opacos e pouco flexíveis, além de que podem oxidar, o que pode causar alterações das características sensoriais do alimento (GUILBERT; CUQ; GONTARD, 1997).

A adição de ácido ascórbico e BHT na formulação de filmes cuja matriz era constituída de amido de arroz e glicerol também foi investigada. A incorporação desses antioxidantes promoveu modificações benéficas nas propriedades dos filmes. O BHT gerou redução na elasticidade, mas também na PVA, o que foi atribuído ao seu caráter hidrofóbico (ASHWAR et al., 2015).

Uma alternativa para melhorar as propriedades físicas dos filmes biodegradáveis é a preparação de filmes compostos através do uso combinado de polissacarídeos, proteínas e lipídios ou a adição de fibras, nos quais a combinação tem como vantagem agregar os pontos positivos de cada um dos constituintes utilizados (GALLO et al., 2000).

Isso tem despertado interesse dos pesquisadores e, nos últimos anos, pesquisas têm sido realizadas com farinhas de diferentes fontes vegetais como matéria-prima para a preparação de filmes (GUTIÉRREZ et al., 2016). No estudo de Dias et al (2010) filmes biodegradáveis foram desenvolvidos a partir de farinha e de amido de arroz branco e suas propriedades físico-químicas, microscópicas e mecânicas foram analisadas. Foi observado que os filmes de ambas as matérias-primas apresentaram características mecânicas similares, com diferenças apenas na permeabilidade ao vapor de água, na qual o filme produzido a partir da farinha apresentou valores maiores em relação a esse parâmetro quando comparado ao de amido. A fim de melhorar essa característica, esses mesmos pesquisadores desenvolveram outro estudo no qual adicionaram fibras de celulose aos filmes de farinha de arroz. Os resultados demonstraram que a adição dessas fibras gerou 35 % de redução na permeabilidade ao vapor de água, com redução na deficiência desse parâmetro dos filmes de farinha em relação aos filmes de amido. Além disso, mudanças em algumas propriedades mecânicas também foram observadas, como o aumento da tensão de ruptura e do módulo de elasticidade e redução da capacidade de alongação dos mesmos (DIAS et al., 2011).

A produção e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de farinha de arroz, poli (adipato co-tereftalato de butileno) (PBAT), glicerol e sorbato de potássio produzidos por extrusão-sopro em balão, para aplicação como embalagem ativa de massa alimentícia fresca tipo lasanha foi realizada por Sousa, Soares Júnior e Yamashita (2013). Após aplicação durante 45 dias a 7 °C, os autores evidenciaram que os filmes mantiveram-se íntegros e manuseáveis, garantiram a segurança do produto e promoveram extensão de sua vida útil, próximo ao das massas distribuídas comercialmente. Esses mesmos autores posteriormente investigaram e quantificaram a concentração de ácido sórbico que migrava a partir dos filmes para o produto. Foi concluído que a adição de $3\text{g}/100\text{g}^{-1}$ de sorbato de potássio nesses filmes biodegradáveis era suficiente para prolongar a vida de prateleira e manter uma baixa concentração de ácido sórbico no produto final (SOUSA; YAMASHITA; SOARES JÚNIOR, 2016).

Todos esses resultados indicaram que a farinha de arroz representa uma alternativa para uso em filmes biodegradáveis e apresenta menor valor comercial em relação ao do amido (DIAS et al., 2011).

Majzoob et al (2015) comparam as propriedades físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de farinha e amido de arroz nativos e modificados fisicamente. Os resultados demonstraram que os filmes de farinha de arroz apresentavam menor solubilidade em água, porém maior permeabilidade ao vapor de água. A modificação das matérias-primas reduziu a firmeza, resistência à tração, e o alongamento das películas.

Outro estudo investigou as propriedades de filmes compostos de farinha de arroz e gelatina de peixe em diferentes proporções. As propriedades de filmes compostos por essas duas matérias-primas, foi significativamente afetada pela adição de farinha de arroz. O aumento do conteúdo de farinha de arroz promoveu redução da rigidez e elasticidade, formando assim um filme mais fraco. Por outro lado, esses filmes apresentaram uma capacidade de absorção de radiação UV mais elevada quando comparados aos filmes só de gelatina, que pode ser benéfico para a prevenção da oxidação de lipídios em alimentos (AHMAD et al., 2015).

CAPÍTULO 4

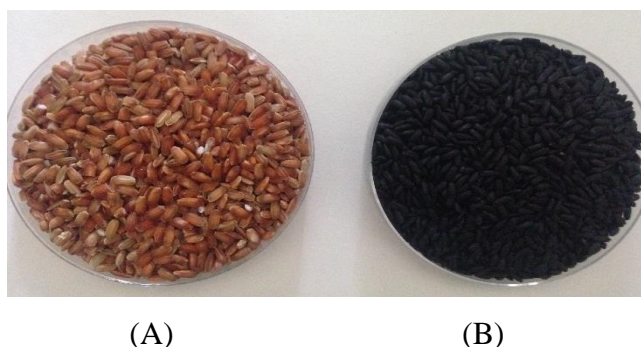
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria-prima

Foram utilizadas uma espécie de arroz vermelho (*Oryza glaberrima*) e uma cultivar de arroz preto (*Oryza sativa* - IAC 600) cultivadas de forma orgânica na cidade de Camaquã (RS - Brasil) (30° 51' 3" S, 51° 48' 43" W) e na cidade de Sentinela do Sul (RS – Brasil) (30° 36' 39" S 51° 34' 44"), respectivamente, (Figura 2). Também foram utilizados os farelos e os amidos extraídos destas amostras.

Figura 2. Arroz vermelho (A) e preto (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

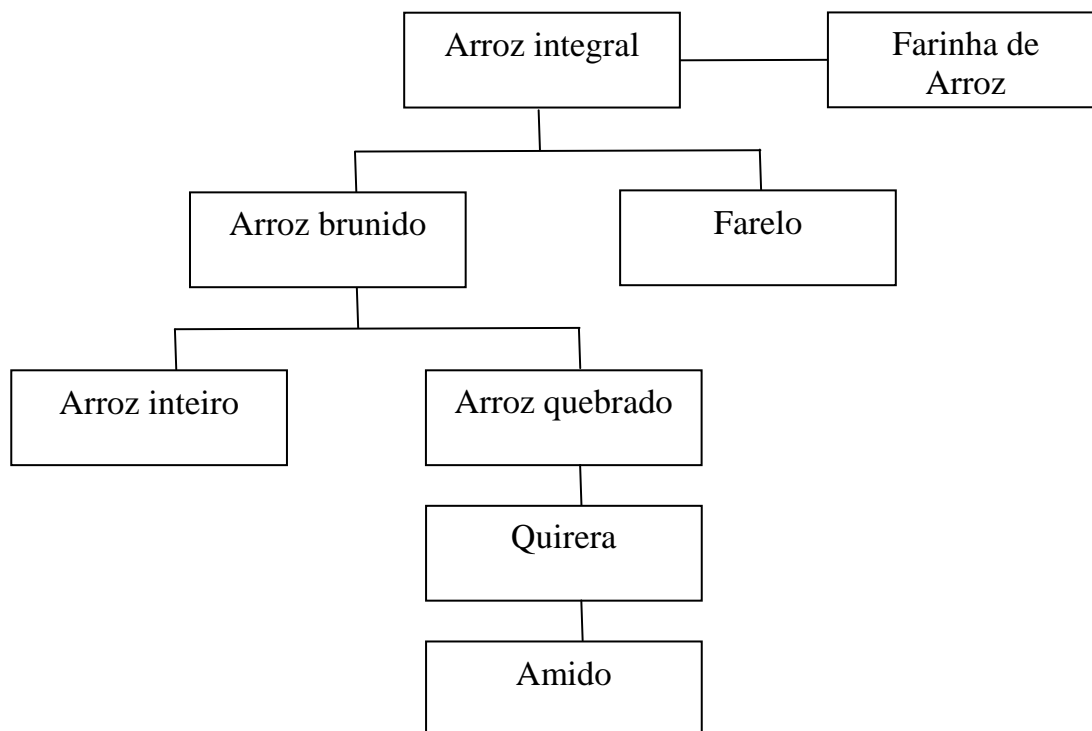
4.2 Métodos

4.2.1 Processamento das farinhas do grão integral, farelo e quirera de arroz

Os farelos e as quireras foram obtidos a partir do beneficiamento de arroz vermelho e preto, o qual foi realizado em mini engenho de provas (Suzuki) no Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), localizado no município de Cachoeirinha (RS - Brasil). Os grãos de arroz vermelho e preto integrais e as quireras foram moídos, separadamente, em moinho de facas (Modelo SL-31 – Solab – Brasil) no Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS e posteriormente os grãos, os farelos foram peneirados em peneiras de 115 mesh e as farinhas e quireras em peneiras de 100 mesh para a obtenção das respectivas

farinhas (Figura 3). Todo o material foi mantido sob refrigeração (5 °C) antes de ser utilizado.

Figura 3. Obtenção das matérias-primas (farinha, farelo e amido de arroz).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

Figura 4. Farinha, farelo e quirera de arroz vermelho (A, B e C), farinha, farelo e quirera de arroz preto (D, E e F).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.2 Composição centesimal

A composição das matérias-primas foi analisada seguindo os métodos da AOAC (2005). O teor de umidade foi analisado por gravimetria em estufa (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil) a 105°C por 24 horas. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl ($N \times 5,95 \%$). O teor de lipídios foi determinado pelo método de Bligh e Dyer (1959). O teor de cinzas foi determinado por incineração de uma quantidade conhecida da amostra, em mufla a 550 °C, até obtenção de peso constante. O conteúdo de fibra dietética (total e insolúvel) foi determinado por método gravimétrico enzimático utilizando o kit de Megazyme (Sigma, Ireland). A composição mineral foi determinada usando espectrofotômetro de absorção atômica conforme descrito por Onwuka (2005), e o conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença. Os resultados foram expressos em gramas por 100 g em base seca (BS).

4.2.3 Determinação de amilose nas farinhas de arroz integral, quirera, farelo e no amido de quirera

As amostras de farinha foram caracterizadas pelo conteúdo de amilose determinado por método colorimétrico, conforme descrito por Martinez e Cuevas (1989), com adaptações. Uma amostra de 100 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, acrescida de 1 mL de álcool etílico 96% GL e 9 mL de solução de NaOH 1 N e colocada em banho-maria a 100°C por 10 minutos, resfriada durante 30 minutos e o volume completado com água destilada. De cada amostra, foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em que foi adicionado 1 mL de ácido acético 1 N e 2 mL de solução de iodo 2% (p/v) preparada três horas antes da análise, sendo, então, completado o volume de cada balão volumétrico com água destilada. Para a construção da curva padrão, foi utilizado 40 mg de amilose pura (Sigma) submetida ao mesmo procedimento utilizado nas amostras de farinha e amido de arroz. Foram retiradas alíquotas de 1, 2, 3, 4, e 5 mL do balão volumétrico e foram acrescidos de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL de ácido acético e de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mL de iodo, respectivamente, completando-se o volume a 100 mL com água destilada. A leitura de absorbância foi realizada 30 minutos após adição da solução de iodo a 610 nm.

4.2.4 Extração dos compostos fenólicos nos farelos de arroz vermelho e arroz preto

Os compostos fenólicos livres, os conjugados solúveis e os insolúveis presentes nos farelos de arroz vermelho e no preto foram isolados utilizando o método descrito por Naczki e Shahidi (1989) com algumas modificações.

Inicialmente, 0,5 g de amostra foi submetida a extrações com metanol:acetona:água (7:7:6) em Ultra-Turrax (IKA T25 Digital). Após centrifugação (4000 g/ 5 min), o sobrenadante foi evaporado até um volume de 40 mL e submetido a extrações com éter etílico, originando a fração de ácidos fenólicos livres. Para obtenção dos compostos fenólicos conjugados solúveis, foi realizada hidrólise com NaOH 4M por 4 h e o hidrolisado acidificado (pH 2) e submetido a extrações com éter etílico. Por fim, a massa residual das extrações foi também hidrolisada com NaOH 4M, por 2h, acidificada (pH 2), centrifugada (4000 g/ 5 min) e o sobrenadante extraído com éter etílico para obtenção dos compostos fenólicos conjugados insolúveis.

4.2.5 Determinação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-MSⁿ

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Quioto, Japão) com detecção de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu) ligado em série a um espectrômetro de massas com um analisador quadrupolar (Q-TOF MS) foi utilizada para caracterizar os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos conjugados solúveis e insolúveis, os ácidos fenólicos livres e as antocianinas foram separados em uma coluna Atlantis T3 (5 µm, 250 x 4,6 mm) a 0,7 mL/min a 29 °C, com fase móvel consistindo em água:ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente B) em gradiente linear de A:B 99:1 (v/v) a 50:50 (v/v) em 50 min; depois de 50:50 (v/v) a 1:99 (v/v) em 5 min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e o cromatograma processado a 320 nm. Os espectros de massas foram adquiridos com um intervalo de varredura de m/z 100 a 800, e os parâmetros do MS foram: fonte ESI no modo de ionização negativo; voltagem do capilar: 4000 V, *end plate offset*: -500 V, saída do capilar: -110 V, *skimmer* 1: 10 V, *skimmer* 2: 5 V, temperatura do gás de secagem (N₂): 310° C, fluxo: 5L/min, nebulizador: 30 psi; energia de fragmentação MS/MS: 1,4 V.

A identificação dos compostos fenólicos conjugados solúveis e insolúveis, dos ácidos fenólicos livres e das antocianinas presentes nos farelos de arroz vermelho e no arroz preto foi realizada considerando os seguintes parâmetros: tempo de retenção em

uma coluna C18, características do espectro UV-visível (comprimento de onda de absorção máxima - $\lambda_{\text{máx}}$), co-cromatografia com padrões, espectro de massas comparado a padrões analisados sob as mesmas condições e dados da literatura.

4.2.6 Avaliação do efeito neuroprotetor *in vitro* dos farelos de arroz vermelho e preto

4.2.6.1 Cultura de células

Para a avaliação do efeito neuroprotetor dos extratos dos farelos de arroz vermelho e preto, foi utilizada uma linhagem de células derivada de neuroblastoma humano, denominadas células SH-SY5Y. Uma vez que esta linhagem exibe propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes a neurônios humanos, ela tem sido utilizada como modelo celular *in vitro* para estudo de possíveis mecanismos de neurotoxicidade (RABELO et al., 2012).

As células SH-SY5Y eram provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil). As mesmas foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) acrescido de 10% de soro fetal bovino, sob temperatura de 37 °C em ambiente umidificado com 5% de CO₂. O meio de crescimento celular foi substituído a cada 2 dias e os tratamentos foram realizados quando as células atingiram 90% de confluência.

4.2.6.2 Ensaio da diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)

O ensaio 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) proposto por Wang e Joseph (1999) foi usado para determinar a influência dos extratos dos farelos de arroz vermelho e preto sob a produção de espécies reativas intracelulares, uma vez que se baseia na capacidade das espécies reativas de oxidar a DCFH-DA a diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF). Inicialmente, a semeadura de células foi realizada em placas de cultura de 96 poços e adicionou-se 100 μM de DCFH-DA dissolvido em meio contendo soro fetal bovino a 1% e deixou-se incorporar nas células durante 2 h. Posteriormente, o meio foi descartado e as células foram tratadas com extratos de farelo de arroz em diferentes concentrações (10 e 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), na presença ou ausência de 500 μM de H₂O₂. As concentrações de extratos foram determinadas com base no estudo de Ismail et al. (2012), onde concentrações semelhantes de arroz integral germinado foram capazes de contrariar o efeito deletério do H₂O₂. Após 1 h de incubação a 37 °C, a fluorescência DCF foi lida em leitor de placas de fluorescência (Spectra Max M2,

Molecular Devices, EUA) com um comprimento de onda de emissão ajustado a 535 nm e um comprimento de onda de excitação definido a 485 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem de fluorescência DCF e Trolox (250 μ M) foi usado como um antioxidante padrão.

4.2.6.3 Viabilidade celular

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi utilizado com a finalidade de investigar se os extratos dos farelos de arroz vermelho e preto poderiam afetar a viabilidade celular *per se*. Este método é baseado na quantificação do teor de proteínas celulares (células viáveis) por coloração utilizando o corante SRB (Sigma Chemical, EUA) (SKEHAN et al., 1990). As células SH-SY5Y foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.6.1. Após descarte do meio, as células foram tratadas com extratos dos farelos de arroz vermelho e preto na maior concentração utilizada nos demais testes (50 μ g/mL) e que possivelmente poderia gerar citotoxicidade. Após 1 h de incubação a 37 °C, o tratamento foi removido das placas e as células foram fixadas pela adição de 100 μ L com ácido tricloroacético (TCA) 40% durante 1 h a 4 °C. Após, o sobrenadante foi removido, as placas lavadas 5 vezes com água deionizada e deixadas para secar a temperatura ambiente. SRB (50 μ L; 0,4% em ácido acético a 1%) foi adicionada a cada poço e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com ácido acético 1% (4 vezes) para remoção da SRB não aderente às células e deixadas secar a temperatura ambiente. 100 μ L do tampão Tris 10 mM (pH 10,5) foram adicionados para diluição da SRB e a absorbância foi lida em um leitor de placas no comprimento de onda fixado em 515 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de incorporação da SRB. A morfologia celular também foi analisada em microscópio (Nikon Eclipse TE 300) por profissional sem conhecimentos dos grupos experimentais.

4.2.6.4 Cálculo da concentração inibitória 50

A concentração inibidora (IC_{50}) para o ensaio de DCFH-DA foi determinada por análise de regressão não-linear usando GraphPad Prism Program versão 5.0. (La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram expressos como valores IC_{50} (média \pm erro padrão da média). Os valores de IC_{50} do ensaio de DCFH-DA foram calculados como a

concentração de cada extrato de farelo de arroz capaz de inibir 50% do aumento da fluorescência DCF induzida por H₂O₂.

4.2.7 Extração de amido de farinha de quirera de arroz vermelho e preto por método alcalino

A extração do amido foi baseada no método descrito por Dias (2010), com algumas modificações. A farinha de quirera de arroz foi moída em água destilada e peneirada em peneira de 115 mesh, com descarte da torta resultante. O filtrado contendo os grãos de amido foi centrifugado a 1000 g por 15 minutos (HITACH –High-Speed Refrigerated Centrifuge CR 21GIII) para a retirada da água em excesso. O sedimento obtido foi ressuspensão em água destilada, centrifugado e o sobrenadante descartado, essa operação foi repetida 3 vezes. O sedimento foi ressuspensão em solução de NaOH 0,1%, mantido em agitação por 5 minutos, centrifugado e o sobrenadante foi novamente descartado, essa etapa é realizada para que ocorra completa separação dos grânulos de amido ligados às proteínas do arroz e a solubilização destas na fase aquosa. O sedimento foi ressuspensão em água destilada e a solução neutralizada tendo seu pH ajustado para 7 utilizando solução de HCl 1%, logo após foi centrifugado. O material sedimentado foi ressuspensão em água destilada e centrifugado, em operação repetida cinco vezes. O amido resultante foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C overnight e apresentou rendimento de aproximadamente 10 % (ZAVAREZE et al., 2009) (Figura 5).

Figura 5. Amido de arroz vermelho (A) e preto (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.8 Caracterização dos amidos obtidos da farinha de quirera

A composição centesimal foi realizada conforme descrito no item 4.2.2 e serviu para determinar a pureza dos amidos, enquanto a determinação do teor de amilose dos amidos foi determinada conforme item 4.2.3.

4.2.9 Desenvolvimento dos filmes biodegradáveis

4.2.9.1 Desenvolvimento dos filmes de farinha e de amido de arroz

O desenvolvimento dos filmes de farinha e de amido de arroz, representado pela Figura 6, foi realizado pela técnica de *casting*, conforme descrito por Dias (2010). Com base em testes preliminares, os subprodutos do arroz vermelho evidenciaram características mais promissoras para o desenvolvimento dos filmes e por isso foram escolhidos para tal finalidade neste trabalho. Uma solução aquosa de 5% do amido extraído ou da farinha seca (100 mesh) foi preparada e agitada por 15 minutos a 4000 rpm. Em seguida, o plastificante glicerol, na concentração de 40% do amido seco foi adicionado e a solução filmogênica foi aquecida em banho até $85\text{ C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos, a fim de provocar a gelatinização do amido. A solução filmogênica foi depositada em placas de Petri com 14 cm de diâmetro ($0,52\text{ g cm}^{-2}$). A solução filmogênica nas placas foi desidratada em estufa com circulação e renovação de ar a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por 18 horas.

Figura 6. Filme biodegradável de farinha de arroz vermelho (A) e de amido de arroz vermelho (B).



4.2.10 Caracterização dos filmes obtidos

4.2.10.1 Espessura

A espessura dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (Modelo IP40, Digimess, Brasil) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001mm (Figura 7). Os valores apresentados representam a média de cinco medições realizadas de forma aleatória ao longo de cada uma das amostras avaliadas. A espessura final é a média aritmética dos cinco pontos de cada amostra aleatória (KECHICHIAN et al., 2010).

Figura 7. Análise da espessura dos filmes utilizando micrômetro digital.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.10.2 Conteúdo de umidade

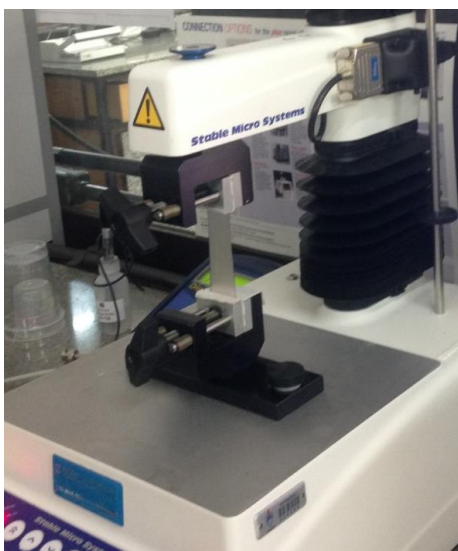
Amostras de filmes (2 cm de diâmetro) foram secas a 105 °C durante 24 h em estufa de laboratório (Modelo B5 AFD, Mark DeLeo) e o seu conteúdo de umidade foi analisado por gravimetria.

4.2.10.3 Análise das propriedades mecânicas

A resistência à tração, porcentagem de alongação na ruptura e o módulo de Young foram investigados segundo ASTM D882-09 (2009), utilizando um texturômetro (TA-Xt plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) com uma célula de carga de 5 kg, sendo a distância entre as garras de 55 mm e a velocidade do teste de 1mm/seg (Figura

8). Os filmes foram recortados formando corpos de prova de 100 mm de comprimento e 10 mm de largura. Os filmes foram acondicionados por dois dias à temperatura ambiente e umidade relativa de 58 % antes da medição.

Figura 8. Texturômetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) utilizado para análise das propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.10.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

As amostras, triplicatas de cada filme, foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C, umidade relativa de 52% ± 2, por 48 horas antes da medição, de acordo com o método ASTM E96-95 (1995) (Figura 9). O ganho de massa foi determinado para cada célula de difusão através de pesagens em balança analítica (AY 220, Shimadzu) no tempo 0 e após 24 h. A permeabilidade ao vapor de água das amostras foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico da ASTM E96-00 descrito por Sarantópoulos *et al.* (2002) utilizando a Equação descrita abaixo:

$$PVA = \frac{W \cdot L}{A \cdot t \cdot \Delta p}$$

Onde W é a taxa de ganho de massa (água) pela célula de permeação ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$), L a espessura (mm), A área (m^2), t é o tempo de permeação (h), diferença de pressão entre os dois lados da película (Pa).

Figura 9. Células de permeação para análise de PVA.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.10.5 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada em triplicata, de acordo com metodologia descrita por Colla, Sobral e Menegalli (2006), com modificações. Essa análise foi realizada seqüencialmente à avaliação da umidade, uma vez que para sua determinação a amostra deve estar seca. Após a primeira pesagem dos discos de filmes de 2 cm de diâmetro previamente secos, foram adicionadas 30 mL de água destilada às amostras acondicionadas em recipientes metálicos, em seguida procedeu-se agitação lenta e periódica por 24 horas a 25 °C (modelo NT145, Novatecnica, Brasil). Após este período, a água do recipiente foi retirada e filtrada, a fim de analisar a presença de fragmentos de filme solúveis em água. Os recipientes contendo as amostras sem água foram novamente submetidos à secagem a 105 °C por 24 horas, sendo pesados antes e após a desidratação do filme para determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água (Figura 10).

Figura 10. Análise de solubilidade dos filmes em água.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.10.6 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água dos filmes foi realizada de acordo com Cao et al (2007). As amostras de filmes secas (2,5 cm x 2,5 cm) primeiro foram pesadas (p1), e depois submersas em um frasco com água desionizada (25 °C ± 2 °C). Dois minutos depois, as amostras foram removidas da água e o excesso de água foi removido com papel de filtro. Os filmes foram pesados (p2) e a seguinte equação foi usada para calcular a água adsorvida:

$$CRA (\%) = [(p2-p1)/p1] \times 100$$

4.2.10.7 Cor

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro (modelo CR-300, Minolta Co. LTDA, Japão), que opera com D65 (luz natural), utilizando os parâmetros de cor CIELAB. Os parâmetros L* (luminosidade), a* (verde-vermelho) e b* (amarelo-azul) foram determinados.

Um disco branco foi utilizado como padrão. A diferença de cor (ΔE^*), em comparação com um padrão branco foi calculada usando a equação (ROTTA et al., 2009):

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Onde: $\Delta L^* = L^* - L0^*$; $\Delta a^* = a^* - a0^*$, $\Delta b^* = b^* - b0^*$; $L0^*$, $a0^*$, $b0^*$ são os valores de cor dos padrões e L^* , a^* , b^* são os valores de cor dos filmes.

4.2.10.8 Opacidade

A opacidade foi determinada medindo a absorvância do filme a 210 e 500 nm utilizando um espectrofotômetro UV (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão). Os filmes foram cortados em pedaços retangulares e diretamente colocados numa célula de teste do espectrofotômetro. Uma célula de teste vazia foi utilizada como referência. A opacidade dos filmes foi calculada, dividindo os valores de absorvância (nm) pela espessura da película (mm) (WANG et al., 2013).

4.2.10.9 Transparência dos filmes

A transparência dos filmes foi realizada em triplicata e medida através de espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800), numa varredura de 200 a 800nm. De acordo com método proposto por Wang et al. (2013), tiras dos filmes foram cortadas de forma retangular e colocadas em uma cubeta de quartzo. A transparência dos filmes foi calculada através da média da triplicata dos valores de absorvância (nm) nessa faixa de comprimento de onda a fim de determinar a transparência dos filmes na região do UV até o visível.

4.2.10.10 Morfologia dos filmes

A morfologia da superfície dos filmes foi observada utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL modelo JSM 5800). Imagens foram obtidas a 5KV com aumentos entre 200 a 1000 vezes.

4.2.10.11 Análise térmica

O método termogravimétrico foi realizado para análise das propriedades térmicas dos filmes em atmosfera de Argônio, em equipamento Shimadzu model TGA-50. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 600 °C com a velocidade de aquecimento de 10 °C / min.

4.2.10.12 Biodegradabilidade: degradação em solo

A análise da degradação em solo foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Martucci e Ruseckaite (2009) com algumas modificações. O solo orgânico

natural foi acondicionado em recipientes de plástico (6 cm × 6 cm x 6,5 cm) para serem utilizados como meios de degradação para os filmes. Primeiramente, filmes cortados em quadrados (2 cm x 3 cm) foram secos a 60 °C (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) durante 24 horas (m0). Posteriormente, os filmes foram colocados em malha de alumínio e enterrados no solo (4 cm de profundidade). Água (20 ml) foi adicionada ao solo, a cada 2 dias, para manter a umidade em aproximadamente 40%. O grau de degradação dos filmes foi determinado após 15 dias como perda de peso (PP;%), de acordo com a equação:

$$PP(\%) = [(mf - m0) / m0] \times 100$$

Onde m0 é a massa inicial e mf a massa seca remanescente depois de 15 dias.

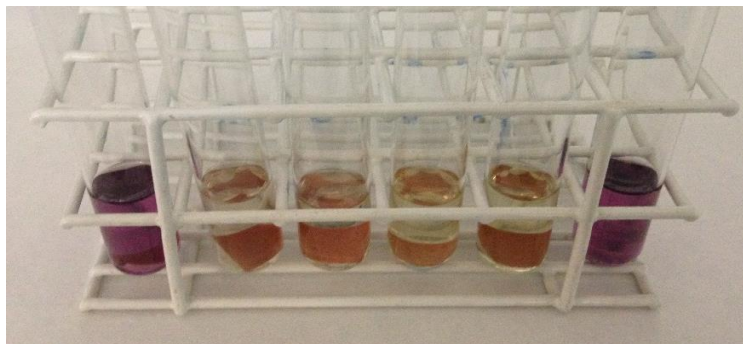
4.2.10.13 Determinação da atividade antioxidante dos filmes biodegradáveis pelo método DPPH

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Assim, a atividade antioxidante dos filmes (I) foi determinada através de uma adaptação do método de captura do radical DPPH descrito por Huang, Ou, and Prior (2005) (Figura 11). Para isso, 1 cm² de cada filme foi adicionado a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mmol /L). A mistura foi mantida no escuro, sob agitação em vórtex (Quimis, Modelo Q920-A2, Brasil) a cada 30 min. Após 2 h 30 min, a absorbância da mistura foi medida a 517 nm em um espectrofotômetro (model PC, Shimadzu, Kyoto, Japão). Solução metanólica de DPPH sem filme foi utilizada como branco, e a propriedade antioxidante foi calculada da seguinte forma:

$$I(\%) = [(A_b - A_f) \div A_b] \times 100$$

onde I é a porcentagem de inibição do radical DPPH, Ab é a absorbância do branco e Af é a absorbância do filme.

Figura 11. Tubos de ensaio contendo as amostras de filmes biodegradáveis e a solução do radical DPPH após 2h 30min de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

4.2.10.14 Determinação do potencial antioxidante através do método acelerado de oxidação de óleo de girassol

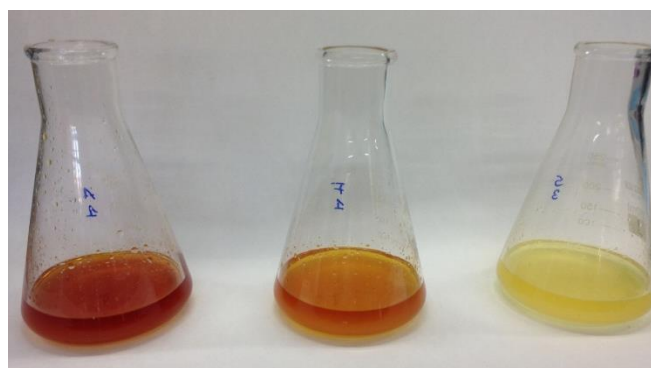
A atividade antioxidante dos filmes também foi medida através da capacidade dos filmes em retardar a oxidação primária de óleo de girassol, pela metodologia de Colín-Chávez et al. (2013), com adaptações. Filmes retangulares (110 mm x 60 mm) foram selados em três extremidades de modo a formar sacos. Antes de serem fechados, foram adicionados 8 ml de óleo de girassol no seu interior. Os sacos foram armazenados em placas de Petri e submetidos às seguintes condições: 30 °C, exposição à luz fluorescente com a intensidade entre 900 e 1000 lux e umidade relativa de aproximadamente 60 %. Óleo de girassol armazenado em potes plásticos de PVC tampados e óleo de girassol armazenado em placas de Petri abertas e submetidos às mesmas condições das amostras experimentais serviram como controles (Figura 12). O experimento teve duração de 28 dias. O índice de peróxidos (mEq/kg), e o teor de dienos e trienos conjugados (g/100g) das amostras foram determinados de acordo com o método IUPAC, nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 21 (Figura 13).

Figura 12. Disposição dos filmes biodegradáveis e controles aberto (placas de Petri abertas) e fechado (potes plásticos de PVC tampados) contendo óleo de girassol, armazenados sob condições extremas de degradação acelerada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

Figura 13. Análise de índice de peróxidos, após 21 dias sob armazenamento, determinada para amostras de óleo de girassol embalados em (A) = potes plásticos de PVC tampados; (B) = placas de Petri abertas; (C) = filmes biodegradáveis de farinha de arroz vermelho e amido de arroz vermelho (9:1).



(A)

(B)

(C)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de

5% de significância utilizando programa estatístico Statística 12.0 (Statsoft, Inc. São Paulo, Brasil).

CAPÍTULO 5

ARTIGO 1: Bioactive Compounds and Protective Effect of Red and Black Rice Brans Extracts in Human Neuron-like Cells (SH-SY5Y)

Formatado para publicação em: Journal of Functional Foods

Carolina Galarza Vargas¹, Jeferson Delgado da Silva Junior², Thallita Kelly Rabelo³, José Cláudio Fonseca Moreira², Daniel Pens Gelain², Eliseu Rodrigues¹, Paula Rossini Augusti^{1*}, Alessandro de Oliveira Rios¹, Simone Hickmann Flôres¹

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS, CEP 90035-035, Brazil.

³Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Av. Marechal Rondon. s/n, São Cristóvão, Aracaju, SE, CEP 49100-000, Brazil.

*** Corresponding Author**

E-mail: paularaugusti@gmail.com; Phone: +55-51 3308 6676

Running title: Protective Effect of Pigmented Rice Brans Extracts in SH-SY5Y cells

ABSTRACT

Rice bran is obtained from the rice polishing process, and this by-product contains many bioactive compounds. In this study, the composition of phenolic compounds from red and black rice brans was determined by HPLC–DAD–MS. Additionally, the neuroprotective ability of these brans in SH-SY5Y cells insulted with hydrogen peroxide (H₂O₂) was evaluated. The phenolic constituents of rice bran were separated into hydrophilic and pellet fractions. The major phenolic compound in both samples was ferulic acid. Cyanidin 3-glucoside was the main anthocyanin in black rice bran. The hydrophilic and pellet fractions showed a protective effect (38–94%) on SH-SY5Y cells insulted by H₂O₂ in DCFH-DA assay. No extract showed cytotoxicity in the SRB assay. These results suggest a neuroprotective effect of red and black rice brans extracts due to their high antioxidant capacity, along with the absence of cytotoxicity. Thus, they may potentially be used as sources of bioactive compounds.

KEYWORDS

Antioxidant capacity, anthocyanin, dichlorofluorescein-diacetate assay, phenolic acid, reactive oxygen species.

1. Introduction

Pigmented rice grains, such as red and black rice, have the highest content of phenolic compounds distributed in their bran layers (Paiva et al., 2014), mainly *p*-coumaric, ferulic, and protocatechuic acids (Min, McClung, & Chen, 2014). While in black rice the main phenolic constituents are anthocyanins, especially cyanidin 3-glycoside and peonidin 3-glycoside (Min, Gu, McClung, Bergman, & Chen, 2012) in red rice, proanthocyanidins or condensed tannins are the most prominent compounds (Gunaratne et al., 2013).

Because of their high nutrient contents, including fiber, minerals, and phytochemicals, these types of rice have received increasing attention and popularity (Slavin, Martini, Jacobs, & Marquart, 1999). A recent report showed that the ingestion of high cholesterol diet supplemented with red rice promoted hypocholesterolemic effect and increased the concentration of high-density lipoprotein (HDL) in mice (Park, Park, Kim, & Chung, 2014). Furthermore, supplementation with extracts of black rice reduced hepatic steatosis in mice fed a high fat diet (Jang et al., 2012).

Despite these benefits, the consumption of polished rice is still prevalent. The rice polishing process involves a reduction in the nutritional value of the grain as it removes the bran, which is the richest part of the grain in proteins, fibers, vitamins, fat and bioactive compounds. Furthermore, it triggers an economic problem for the processing mills and the rice industry, since it generates a considerable amount of bran (around 8 g/100g of product)

Thus, the beneficial effects generated in the organism related to the action of the compounds present mainly in the outer layer of red and black rice grains have been reported in some studies using *in vitro* and *in vivo* models. For example, the black rice bran (BRB) fraction prevented DNA damage induced by reactive oxygen species (ROS), namely peroxy (ROO•) and hydroxyl radicals (HO•) *in vitro* (Hu, Zawistowski,

Ling, & Kitts, 2003). Moreover, this same fraction has been reported to reduce oxidative stress and inflammation in apoE-deficient mice (Xia, Ling, Ma, Kitts, & Zawistowski, 2003). Another research has shown that the red rice bran (RRB) extract exhibited inhibitory effects on several cancer cells (Chen, Choi, Kozukue, Kim, & Friedman, 2012) and supplementation of BRB decreased the risk of cardiovascular diseases in humans (Wang et al., 2007). These effects are possibly associated with the high concentration and antioxidant activity of phenolic compounds found in these types of rice.

Oxidative stress underlies the pathogenesis of various neurodegenerative diseases, particularly the damage mediated by ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) (Melo et al., 2011). Since neuronal cells exhibit high metabolic activity, non-replicative nature, and low antioxidant capacity, they are very susceptible to ROS actions (Lee, Giordano, & Zhang, 2012). Thus, the development of studies using neuron-like cells, such as the SH-SY5Y cell line, allows the evaluation of the antioxidant activity of compounds in human cells with biochemical characteristics similar to neurons (Ruffels, Griffin, & Dickenson, 2004). In fact, the extract of germinated brown rice was able to prevent H_2O_2 -induced oxidative damage in SH-SY5Y cells (Azmi, Ismail, Imam, & Ismail, 2013). Despite the existing reports on the antioxidant activity of red and black rice, the methodology employed is based on scavenging DPPH radical and ABTS radical (cell-free assays) (Paiva et al., 2014). Furthermore, until the present moment, none study is available about the phenolic composition of different fractions from the RRB and BRB and their relationship with antioxidant capacity using a neuron-like cellular system.

Therefore, the goal of this study is to determine the composition of phenolic compounds along with the evaluation of the neuroprotective effects of pigmented rice brans extracts in SH-SY5Y cells.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Standards of *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, hydroxybenzoic acid, caffeic acid, and catechin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All standards had at least 95% purity, as determined by HPLC-DAD. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), and ferulic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrile and methanol (HPLC-grade solvents) were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Formic acid was acquired from Merck (Darmstadt, Germany) and acetone, diethyl ether, and sodium hydroxide were purchased from Dinâmica Ltda (Brazil). Ultrapure water was obtained with a Milli-Q system (Billerica, MA). The samples and solvents were filtered through membranes of 0.22 and 0.45 μm pore size, respectively. DMSO (dimethyl sulfoxide), DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) and SRB (sulforhodamine B) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and H_2O_2 (hydrogen peroxide) was purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil).

2.2. Samples

The RRB used in this study was obtained from the processing of red rice (*Oryza glaberrima*) planted in organic soil from southern Brazil (Camaquã, Rio Grande do Sul, Brazil; 30° 51' 3" S, 51° 48' 43" W) and harvested in April 2013. The BRB was obtained from the processing of organic black rice (*Oryza sativa* – cultivar IAC 600) planted in the city of Sentinela do Sul (Rio Grande do Sul, Brazil; 30° 36' 39" S, 51° 34' 44" W) and harvested in April 2014. Rice samples (100 g/batch) were polished at Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) in a mini mill (Suzuki, Japan) for 1.5 min to

obtain approximately 10% (w/w) of fresh rice bran. The brans were stored in plastic bags sealed under vacuum at -18 °C until use.

2.3. Extraction of Phenolic Compounds

Free phenolic acid, and insoluble-bound phenolic acid from RRB and BRB were extracted using the procedure described by Naczk & Shahidi (Naczk & Shahidi, 1989) with modifications regarding the amount of sample used and the time during which they were subjected to nitrogen (N₂) flow. The sample was weighed (0.5 g) in a test tube followed by the addition of a mixture of acetone/methanol/water (7:7:6, v/v/v) (40 mL). This mixture was homogenized with a Turrax homogenizer (Quimis, Germany) for 4 min, centrifuged at $4.000 \times g$ for 5 min (Hitachi CR 21G III centrifuge, Japan) and the supernatant was collected. This procedure was repeated six times, and the supernatants were combined. The extract was concentrated in a rotary evaporator ($T \leq 30$ °C) to approximately 60 mL, transferred to a separator funnel and six extractions were performed with diethyl ether at 1:1 (v/v). From this washing, the hydrophilic fraction was obtained which contains free phenolic acids. In parallel, the pellet fraction, characterized by the solid residue, which is resulting from the extractions was subjected to hydrolysis with 20 mL of 4 M NaOH under N₂ flow for 2 h at room temperature (21 °C). The hydrolysate was acidified to pH 2 using 6 M HCl, centrifuged at $4.000 \times g$ for 5 min, and the supernatant was transferred to a separator funnel and subjected to six extractions with diethyl ether at 1:1 (v/v). The combined extracts were evaporated in a rotary evaporator ($T \leq 30$ °C) in order to obtain the insoluble-bound phenolic acids. The both extracts were stored at freezing temperature (-18 °C) until analysis.

2.4. HPLC-DAD-MSⁿ Analysis

A HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) connected in series to a diode array detector (DAD) (Shimadzu) and a mass spectrometer with a quadrupole-time-of-flight analyzer (Q-TOF MS) and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, MicroTOF-QIII, Bremen, Germany) was used to characterize the phenolic compounds.

The phenolic compounds were separated on a C₁₈ column (5 μm, 250 x 4.6 mm, Atlantis) at a flow rate of 0.7 mL/min and column temperature of 29 °C using a mobile phase consisting of water/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent B) in a linear gradient from A/B 99:1 (v/v) to 50:50 (v/v) in 50 min; then from 50:50 (v/v) to 1:99 (v/v) in 5 min. The latter ratio (1:99, v/v) was maintained for a further 5 min (Rodrigues et al., 2013). The column eluate was split to allow only around 0.35 mL/min to enter the ESI interface. The UV-vis spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms were processed at 280, 320, and 360 nm. The mass spectra were acquired with a scan range from 100 to 800 *m/z* (Rodrigues et al., 2013). The phenolic compounds were quantified by HPLC-DAD using eight-point analytical curves of ferulic acid and coumaric acid (0.5 to 12 μg/mL). The analytical curves were linear ($r^2 = 0.9923$ and $r^2 = 0.9919$), the limits of detection (LOD) were 1.45 μg/mL and 1.38 μg/mL, and the limits of quantification (LOQ) were 4.09 μg/mL and 4.19 μg/mL for ferulic acid and coumaric acid, respectively. LOD and LOQ were calculated according to the parameters of analytical curves (Ribani, Collins, & Bottoli, 2007). Anthocyanins were quantified by HPLC-DAD using a six-point analytical curve of cyanidin 3-glucoside (3.76 to 37.64 μg/mL). The analytical curve was linear ($r^2 = 0.9987$), LOD was 1.77 μg/mL, and LOQ was 5.38 μg/mL.

Phenolic compounds were identified considering the results of the following parameters obtained from the HPLC-DAD-MSⁿ system: elution order in the C₁₈

column, UV–vis spectral features (maximal absorption wavelength (λ_{max}) and spectrum profile), co-elution with standard, mass spectrum characteristics compared to characteristics of the standard analyzed under the same conditions, and data available in the literature (Qiu, Liu, & Beta, 2010); Shao, Xu, Sun, Bao, & Beta, 2014a).

The MS parameters for both analyses were set as follows: ESI source in negative ion mode (non-anthocyanic phenolic compounds) and positive ion mode (anthocyanins); capillary voltage: 2.500 V, end plate offset: -500 V, dry gas (N₂) temperature: 310 °C, flow rate: 5 L/min, nebulizer: 30 psi. MS² was set to automatic mode applying fragmentation energy of 34 eV.

2.5. Neuroprotective Effects of RRB and BRB Extracts

2.5.1. Cell Culture

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was acquired from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in a mixture of Ham's F12 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained at a temperature of 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂, being sub-cultured once every two days, since they reached 90% of confluence (cells covering 90% of flask surface). All the treatments were performed when cells reached 70–90% of confluence, as determined by optical microscopy.

2.5.2. Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA) Assay

The DCFH-DA assay proposed by Wang and Joseph (H. Wang & Joseph, 1999) was used to determine the production of intracellular reactive species since it is based on the ability of the reactive species of oxidizing the DCFH-DA to highly fluorescent

dichlorofluorescein (DCF). Initially, the cells seeding was performed in 96-well culture plates and 100 μM DCFH-DA dissolved in medium containing 1% FBS was added and left to incorporate in cells for 2h. Subsequently, the medium was discarded, and cells were treated with rice brans extracts at different concentrations (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), in the presence or absence of 500 μM H_2O_2 . The extracts concentrations were determined based on the study of Ismail et al. (Ismail et al., 2012), where similar concentrations of germinated brown rice were able to counteract the deleterious effect of H_2O_2 . After 1 h incubation at 37 °C, DCF fluorescence was read in a fluorescence plate reader (Spectra Max M2, Molecular Devices, USA) with an emission wavelength set at 535 nm and an excitation wavelength set at 485 nm. The results were expressed as a percentage of DCF fluorescence, and Trolox (250 μM) was used as a standard antioxidant.

2.5.3. Cell Viability

In order to determine the safety of rice brans on cells, the sulforhodamine B (SRB) assay was carried out. The SRB incorporation reflects the cellular protein content (Skehan et al., 1990) and, after cells had been incubated with rice bran extracts at the highest concentration (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the quantification of this incorporation was conducted at 515 nm. Besides, the morphology of SH-SY5Y cells was evaluated by a blinded professional, using phase-contrast light microscopy (Nikon Eclipse TE 300).

2.5.4. Calculation of the Half Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50})

The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for DCFH-DA assay was determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism Program version 5.0. (La Jolla, CA, USA). The results were expressed as IC_{50} values (mean \pm standard error of the mean, SEM). IC_{50} values DCFH-DA assay were calculated as the

concentration of each rice bran extract capable of inhibiting 50% of the increase in DCF fluorescence induced by H₂O₂.

2.6. Statistical analyses

Data of cell cultures were evaluated by ANOVA using GraphPad Prism Program version 5.0. (La Jolla, CA, USA). All data had differences between the means were assessed using Tukey's test for multiple comparisons and statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Phenolic Compounds

The phenolic compounds found in the hydrophilic fractions and pellets of RRB and BRB are shown in **Figure 1** and **Table 1**. The proanthocyanidins were the main compounds identified in the hydrophilic fraction of RRB, while the same fraction of the BRB exhibited cyanidin 3-glucoside as the major component. In the pellet fraction of both rice bran, ferulic acid was the main component.

Phenolic compounds are the main bioactive compounds present in rice bran and are most likely responsible for the beneficial properties attributed to the bran. These phenolic compounds are present in three forms: (1) free phenolic compounds, (2) soluble-conjugated phenolic compounds, which are esterified with sugars and other low-molecular-weight molecules, and (3) insoluble-bound phenolic compounds, which are esterified within cell-wall components (Madhujith & Shahidi, 2009). In this study, we found phenolic compounds representative of the first and the third fractions, which disagrees with a recent study on black and white rice bran in which no phenolic acid was found in the hydrophilic fraction (Zhang, Shao, Bao, & Beta, 2015).

The hydrophilic fraction is composed of free phenolic compounds. In the RRB, five phenolic compounds were tentatively identified. **Peak 1** was identified as vanillic acid (exact MW = 168.04226) (**Figure 1c**). In negative ion mode, the MS spectrum showed deprotonated molecule $[M - H]^-$ at m/z 167.0341, and the MS^2 spectrum showed base peak at m/z 124.0250 [vanillic acid derivative - CO_2], arising from the loss of a carbon dioxide molecule (m/z 44) (Shao, Xu, Sun, Bao, & Beta, 2014b). **Peak 5** was identified as procyanidin B1 (exact MW = 578.1424) (**Figure 1c**). The MS spectrum showed $[M - H]^-$ at m/z 577.1785 and the MS^2 spectrum showed base peaks at m/z 289.0954/407.1094, at m/z 407 ($[M-H-170]^-$) resulting from the retro-Diels-Alder fission of the heterocyclic ring and loss of H_2O (Sun, Liang, Bin, Li, & Duan, 2007), and at m/z 289 ($[M-H-289]^-$) from cleavage of the interflavanic bond (Sun et al., 2007). **Peak 6** was identified as a trimer of procyanidin (exact MW = 866.2058) (**Figure 1c**). The MS spectrum showed $[M - H]^-$ at m/z 865.2626, and the MS^2 spectrum showed base peaks at m/z 577.1781/407.1103/289.0954. **Peak 7** was identified as catechin (exact MW = 290.0790) (**Figure 1c**), and the MS spectrum showed $[M - H]^-$ at m/z 289.0940 and MS^2 base peaks at m/z 123.0538/137.0413/151.0491/221.0949. **Peak 9** was identified as procyanidin B2 (exact MW = 578.1424) (**Figure 1c**), with $[M - H]^-$ at m/z 577.1785 and the fragments (MS^2) showed base peaks at m/z 289.0954 and 407.1094.

The profile of free phenolic compounds identified in the hydrophilic fraction of BRB was quite different from that identified in RRB. **Peak 4** was identified as cyanidin 3-glucoside (exact MW = 449.10839) (**Figure 1d**). In positive ion mode, the MS spectrum showed a molecular ion $[M]^+$ at m/z 449.0984 and the MS^2 spectrum showed a base peak at m/z 287.0475 [cyanidin 3-glucoside - glucose] $^+$. **Peak 8** was identified as peonidin 3-glucoside (exact MW = 463.12404) (**Figure 1d**). The MS spectrum showed $[M]^+$ at m/z 463.1099 and the MS^2 spectrum showed a base peak at m/z 301.0622

[peonidin 3-glucoside - glucose]⁺, while both peaks showed fragmentation patterns similar to previously reported data (Shao et al., 2014b).

The existence of a large unresolved hump in the chromatogram of the free phenolic compounds of red rice bran suggests the presence of high concentration of proanthocyanidins. Due to the separation profile of these compounds, it was not possible to perform their quantification. A similar result has been previously reported in the literature in a study that found the same separation profile (Gunaratne et al., 2013).

Different studies have shown that the major anthocyanins present in black rice are cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside (Hu et al., 2003; Hou, Qin, Zhang, Cui, & Ren, 2013); (Pereira-caro, Watanabe, Crozier, Fujimura, & Yokota, 2013). Accordingly, in this study, the BRB had the same profile of anthocyanin pigments. No anthocyanin was found in RRB and, therefore, the red color of the grain pericarp seems to be attributed to the accumulation of tannins (M.-H. Chen, McClung, & Bergman, 2016). The absence of detectable levels of anthocyanins was also previously reported by different researchers (Gunaratne et al., 2013; Shao, Xu, Sun, Bao, & Beta, 2014a; Bordiga et al., 2014).

Only two phenolic compounds were found in the pellet fraction of RRB. **Peak 10** was identified as *p*-coumaric acid (exact MW = 164.0473) (**Figure 1a**), with [M - H]⁻ at *m/z* 163.0582 and the MS² spectrum showed a base peak at *m/z* 119.0638 [*p*-coumaric acid - H - CO₂]⁻. Moreover, **peak 10** showed retention time, UV-visible, and mass spectrum values similar to the authentic standard of *p*-coumaric acid. The identity of this compound was also positively confirmed by co-elution with the *p*-coumaric acid standard. **Peak 11** was identified as ferulic acid (exact MW = 194.0579) (**Figure 1a**) with [M - H]⁻ at *m/z* 193.0726 and the MS² spectrum showed a base peak at *m/z* 134.0526 [ferulic acid - H - C₂H₃O₂]⁻. Moreover, **peak 11** showed retention time, UV-visible, and mass spectrum values similar to the ferulic acid standard. The identity of

this compound was also positively confirmed by co-elution with the ferulic acid standard.

Peak 2 was positively identified as gallic acid (exact MW = 170.0215) (**Figure 1b**) with $[M - H]^-$ at m/z 169.0352 and retention time, UV-visible, and MS spectrum values were similar to the those of gallic acid standard.

Peak 3 was identified as protocatechuic acid (exact MW = 154.0266) (**Figure 1b**) with $[M - H]^-$ at m/z 153.0358 and MS² spectrum with a base peak at m/z 108.0306 [$\text{protocatechuic acid} - H - \text{CO}_2$]⁻ (Sun et al., 2007).

In general, the pellet fraction of BRB and RRB showed similar profiles of phenolic compounds, highlighting the presence of *p*-coumaric and ferulic acids of which the sum represents 100 % and 66 % of the phenolic compounds of this fraction, respectively. The remarkable difference concerning the composition of phenolic compounds in these fractions is the presence of protocatechuic acid in BRB, which accounts for 34% of the total phenolic compounds of the pellet fraction. Our results are in agreement with previous studies that also found ferulic acid as the major phenolic compound in red and black rice (Shao et al., 2014a; Zhang et al., 2015). In addition, the total phenolic compound contents found were also similar to those reported in the literature (Shao et al., 2014a).

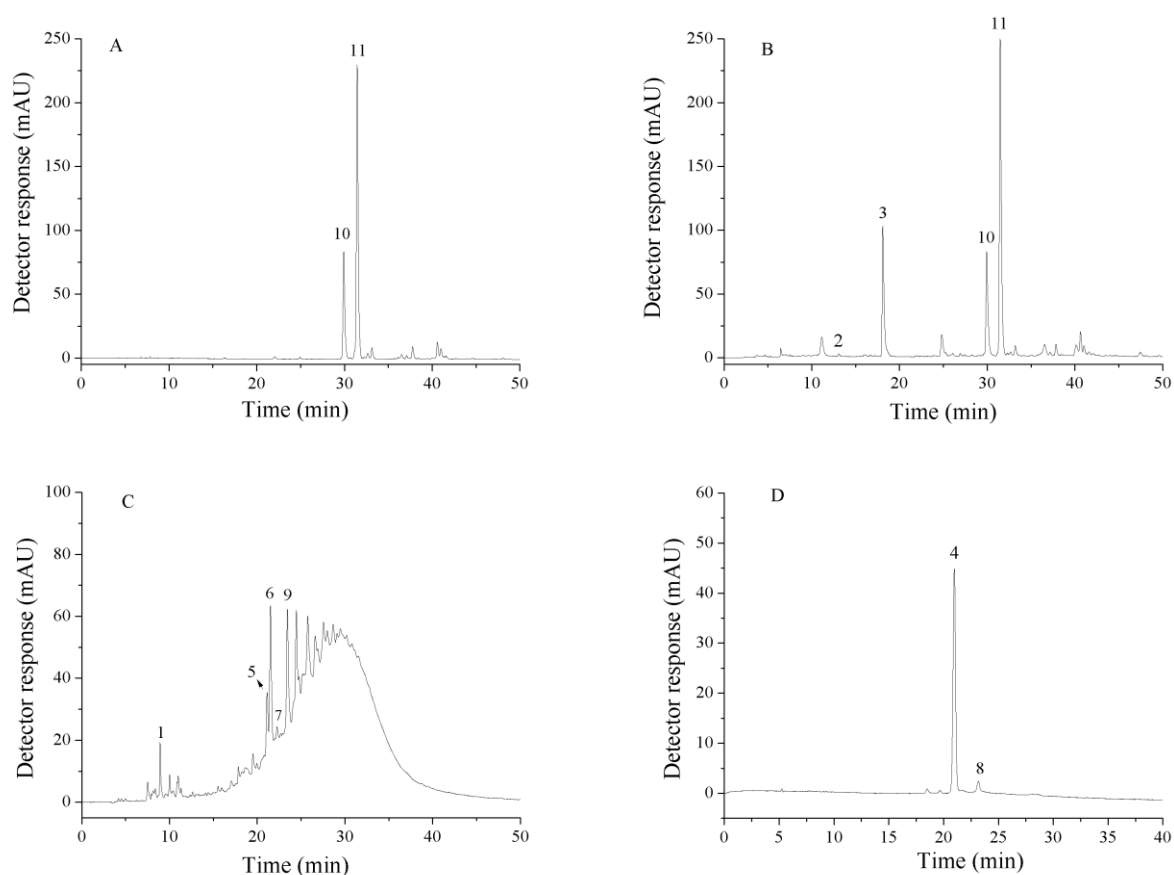


Figure 1 - Chromatogram obtained by HPLC-DAD of the phenolic compounds from rice bran at 280 nm: (A) Insoluble-bound phenolic compounds of RRB, (B) insoluble-bound phenolic compounds of BRB, (C) free phenolic compounds of RRB, and (D) free phenolic compounds of BRB. Peak characterization is given in Table 1.

3.2. Neuroprotective Effects of Pigmented Rice Brans Extracts

3.2.1. Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA) Assay

The evaluation of the antioxidant activity of BRB and RRB extracts using the scavenging capacity of the ABTS and DPPH radicals, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and iron chelating capacity assays have already been described in the literature (Paiva et al., 2014). However, there are no studies about the protective effects

of these rice bran extracts in neuron-like cells. Thus, to verify the neuroprotective effects of pigmented rice brans extracts in a cellular system (insulted by a pro-oxidant agent), this study used human SH-SY5Y cells. These cells are well characterized and accepted as a neuronal-like model, due to the similarity of their biochemical characteristics with human neurons, their capacity to undergo neurite growth and morphological changes induced by oxidative stress (Xie, Hu, & Li, 2010; Frota Junior et al., 2011; Yu, Ye, Liu, Han, & Wang, 2011). Accordingly, SH-SY5Y cells were a valuable model to demonstrate the antioxidant and anti-apoptotic effects of an oryzanol-rich fraction extract from rice bran against H₂O₂ toxicity (Ismail, Imam, & Umar, 2014).

In the present study, the exposure of SH-SY5Y cells to H₂O₂ caused a rapid increase in the generation of intracellular reactive species when compared to untreated cells (control) ($p < 0.05$, **Figure 2**). High ROS production is the main contributing factor to the oxidative stress that is implicated in the neuronal damage related to diseases like Alzheimer, Parkinson, Huntington, amyotrophic lateral sclerosis and cerebral ischemic stroke (Ruffels et al., 2004). Besides, H₂O₂ has been indicated as a potent mediator of neuronal oxidative stress (Melo et al., 2011), as it triggers a complex cascade of events, which may eventually promote the apoptotic death of the cells, depending on the severity of the damage (Martindale & Holbrook, 2002).

All fractions of BRB and RRB extracts, at both concentrations tested (10 and 50 µg/mL), were able to protect the cells, in a concentration-dependent manner, against H₂O₂ ($p < 0.05$). Furthermore, the decrease in DCF fluorescence ranged from 38 to 94% (**Figure 2**, $p < 0.05$). Besides, excepting the RRB pellet fraction, all cells treated with the BRB (pellet and hydrophilic fractions) and RRB (hydrophilic fraction) extracts at 10 and 50 µg/mL showed prevention of the generation of ROS, significantly higher than that presented by Trolox (standard antioxidant) and did not show any significant difference when compared to treated cells and untreated cells (control).

The pellet fraction of BRB showed higher protective effect than the same fraction of RRB (**Figure 2a** and **2b**), with a decrease in DCF fluorescence ranging from 81–91% compared to 38–53%, respectively. The pellet fraction extract from BRB showed a significantly higher protective effect compared to Trolox (standard antioxidant) ($p < 0.05$) and was able to return ROS generation to basal levels (no differences when compared to control). However, the extract of the same fraction from RRB was not able to return ROS to levels similar to control ($p > 0.05$), despite the greater antioxidant capacity when compared to Trolox ($p < 0.05$). Moreover, IC_{50} of BRB pellet fraction was approximately twelve-fold lower than that of RRB (2.5 vs. 32.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The half maximal inhibitory concentration 50 (IC_{50}) is a measure of the inhibitory efficacy of a compound in biological or biochemical function. This quantitative measure indicates how much of a substance is needed to inhibit a given biological process by half. Therefore, these values indicate that the concentration of BRB pellet extract required to inhibit 50% of the increase in DCF fluorescence induced by H_2O_2 is lower compared with the RRB pellet extract. In agreement, previous studies have already shown higher scavenging capacity against ROS for black rice extracts compared with red rice (Shao et al., 2014a).

These differences can be most likely due to the presence of protocatechuic acid and other compounds, which have been determined only in BRB. The protective effects of protocatechuic acid against H_2O_2 -induced oxidative stress in SH-SY5Y cells have already been described (Tarozzi et al., 2007). Thus, the role of the protocatechuic acid in inhibits H_2O_2 -induced ROS formation at cytosolic level suggests that this compound may be considered a neuroprotective molecule and play an important role in brain health promotion (Tarozzi et al., 2007).

All investigated concentrations of the hydrophilic fractions of the BRB and RRB promoted very similar protection in SH-SY5Y cells insulted with H_2O_2 , in a

concentration-dependent manner. The extracts of both brans, in the two concentrations tested (10 and 50 $\mu\text{g/mL}$), showed antioxidant activity with significant differences when compared Trolox ($p < 0.05$) and without significant differences in relation to control (untreated cells) (**Figure 2c** and **2d**). The hydrophilic extract of the RRB exhibited IC_{50} of 2.49 $\mu\text{g/mL}$ and provided to the cells 82-93% protection, while the hydrophilic extract of BRB showed IC_{50} of 2.39 $\mu\text{g/mL}$ and promoted protection between 84-94%.

The protective effect observed in the BRB and RRB extracts is related to the presence of bioactive compounds, especially phenolic acids and anthocyanins. Similarly, other studies have documented the reduction of the ROS levels in H_2O_2 -insulted neuronal cells after treatment with extracts rich in anthocyanins obtained from different food sources like boysenberry, blackcurrant and blueberries (Ghosh, McGhie, Zhang, Adaim, & Skinner, 2006; Torma et al., 2017; Meng et al., 2017). Different studies *in vitro* and *in vivo* have shown the ability of anthocyanins to cross a brain barrier and reach the brain (Andres-Lacueva et al., 2005; Talavéra et al., 2005). However, the antioxidant action of the polyphenolic compounds is related not only to the redox properties of their phenolic hydroxy groups but also to the structural relationships between the different parts of the chemical structures (Bors, Heller, & Michael, 1998). The study developed by Tarozzi et al., 2007 corroborates this statement, once the inhibition of H_2O_2 induced ROS formation occurred at different cellular levels, depending on the compound structure. In agreement, phenolic compounds of BRB and RRB extracts seem to scavenge ROS by three mechanisms: (1) hydrogen transfer, (2) transfer of electrons, and (3) formation of adducts (Anouar et al., 2009).

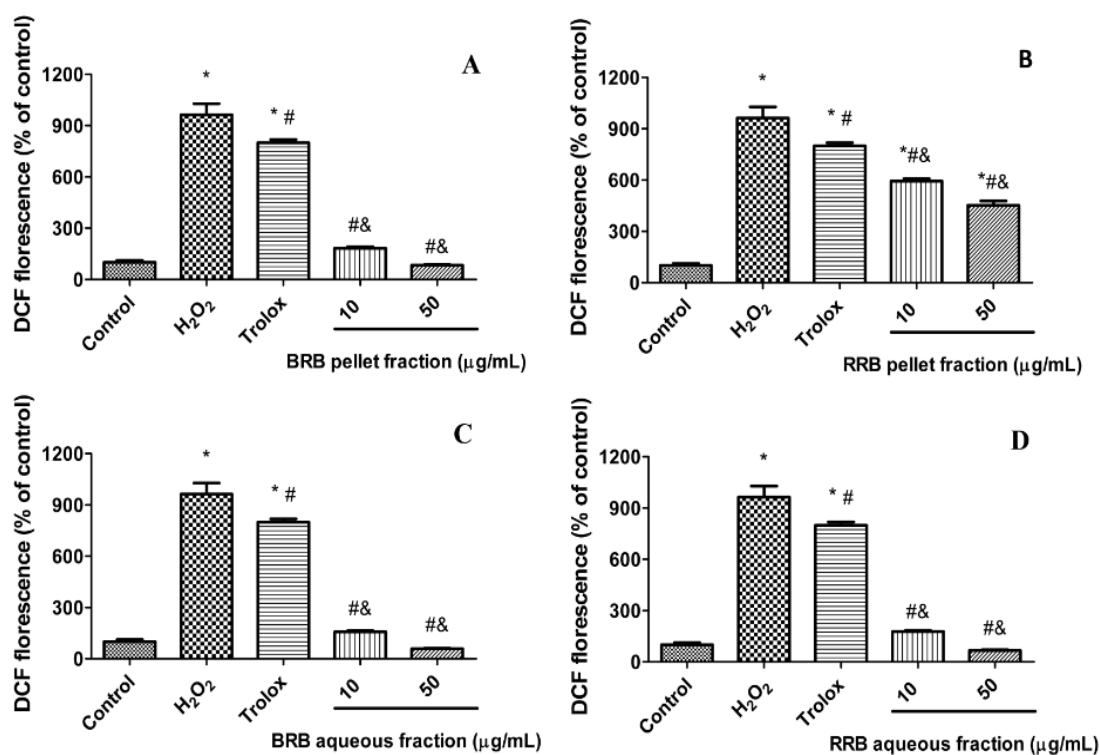


Figure 2 - Effect of RRB and BRB extracts on intracellular reactive species production (DCFH assay) in SH-SY5Y cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=6). *Different from untreated cells (control) ($p < 0.05$); #Different from H₂O₂-treated cells ($p < 0.05$); &Different from Trolox-treated cells ($p < 0.05$). Control = cells incubated without RRB or BRB extracts//Trolox or 500 μ M H₂O₂; Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox® (standard antioxidant) in the presence of 500 μ M H₂O₂; RRB and BRB hydrophilic and pellet fractions = cells incubated with hydrophilic and pellet fractions extracts from RRB and BRB (10 – 50 μ g/mL) in the presence of 500 μ M H₂O₂.

3.2.2. Cell Viability

The cell viability assay was performed to verify whether treatment of SH-SY5Y cells with RRB and BRB extracts could result in any cytotoxicity. Morphology of untreated SH-SY5Y cells and treated with rice brans extracts was observed under a light microscope, to evaluate possible changes in the features of the cells. **Figure 3a** shows that both the untreated (control) and those cells treated with the rice brans extracts for 1 hour presented a normal architecture of SH-SY5Y cells, with elongated and flattened

shape and with axon-like outgrowths. As shown in **Figure 3b**, all rice brans extracts did not cause loss of cell viability at the highest concentration tested (50 µg/mL) compared to the control. Similar to this, the exposure of SH-SY5Y cells to extracts of brown rice and germinated brown rice (over the concentration range of 1-200 µg /mL, up to 24h), produced no significant alteration in cell viability (Ismail et al., 2012). In another study, extracts from the oryzanol-rich fraction obtained from rice bran (0-100 µg/mL) also did not cause toxicity in SH-SY5Y cells treated for 24 h (Ismail et al., 2014). Besides, Azmi et al., 2013 showed that extracts of germinated brown rice improved cell viability of human SH-SY5Y neuronal cells, most likely due to the high amounts of antioxidants present in the grain. In fact, previous findings supported that dietary components with higher antioxidant capacity can promote neuronal cell survival (Butterfield et al., 2002). These results suggest that the studied rice brans extracts would be safe for a possible practical application by the food industry.

According to the results, the present research supported the idea that the phenolic compounds present in RRB and BRB extracts are the bioactive compounds related to the neuroprotective effects of these pigmented rice grains in SH-SY5Y cells. The results contribute to the development of future researches to elucidate the therapeutic potential of these brans and suggest that they are promising and safe to be applied in the pharmaceutical and food industries.

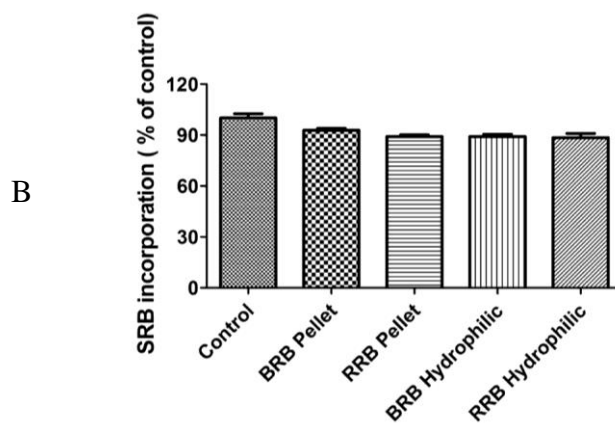
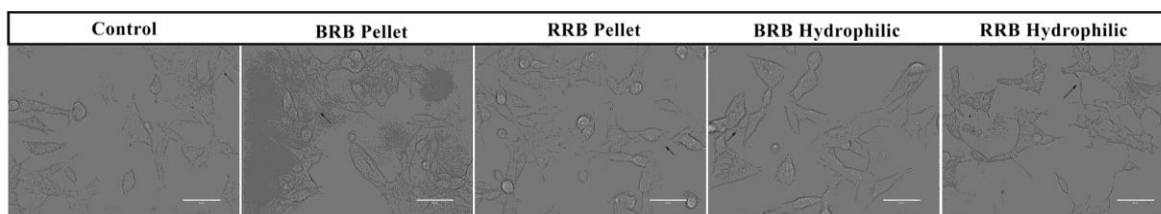


Figure 3 - Effect of RRB and BRB extracts on qualitative morphology (A, 600 \times) and viability (B) of SH-SY5Y cells. SRB assay data are expressed as means \pm SEM (n = 6). Control = cells incubated without RRB or BRB extracts; RRB and BRB hydrophilic and pellet fractions = cells incubated with hydrophilic and pellet fractions extracts from RRB and BRB (50 μ g/mL). Observe that control cells and those treated with RRB or BRB extracts preserved the morphology with small neurites (fine cytoplasmic extensions, black arrows), as confirmed by the SRB assay (B).

Abbreviations

ABTS, (2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid; BRB, black rice bran, DCFH-DA, (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate); DMSO, (dimethyl sulfoxide), DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; HDL, high-density lipoprotein; HO $^{\bullet}$, hydroxyl; HPLC-MS-DAD, high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector and a mass spectrometer; LOD, limits of detection; LOQ limits of

quantification; ROS, reactive oxygen species; ROO[•], peroxy; RRB, red rice bran; SRB, (sulforhodamine B); Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid;

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) for the financial support.

References

- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M., & Joseph, J. A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience*, *8*(2), 111–120.
- Anouar, E., Košinová, P., Kozłowski, D., Mokrini, R., Duroux, J. L., & Trouillas, P. (2009). New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *11*(35), 7659–7668.
- Azmi, N. H., Ismail, N., Imam, M. U., & Ismail, M. (2013). Ethyl acetate extract of germinated brown rice attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of anti-apoptotic, pro-survival and antioxidant genes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(1), 177.
- Bordiga, M., Gomez-alonso, S., Locatelli, M., Travaglia, F., Daniel, J., Hermosin-gutierrez, I., & Arlorio, M. (2014). Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa* L. cultivars grown in Piedmont

- (Italy). *Food Research International*, 65, 282-290.
- Bors, W., Heller, W., & Michael, M. (1998). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. Edited by CA Rice, E Vans and L Packer. Marcel Dekker, New York.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Pocernich, C. B., Drake, J., Scapagnini, G., & Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(8), 444–461.
- Chen, M.-H., McClung, A. M., & Bergman, C. J. (2016). Concentrations of oligomers and polymers of proanthocyanidins in red and purple rice bran and their relationships to total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity and whole grain color. *Food Chemistry*, 208, 279–287.
- Chen, M. H., Choi, S. H., Kozukue, N., Kim, H. J., & Friedman, M. (2012). Growth-inhibitory effects of pigmented rice bran extracts and three red bran fractions against human cancer cells: Relationships with composition and antioxidative activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9151–9161.
- Frota Junior, M. L. C., Pires, A. S., Zeidán-Chuliá, F., Bristot, I. J., Lopes, F. M., de Bittencourt Pasquali, M. A., Gelain, D. P. (2011). In vitro optimization of retinoic acid-induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 358(1–2), 325–334.
- Ghosh, D., McGhie, T. K., Zhang, J., Adaim, A., & Skinner, M. (2006). Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), 678–686.
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., & Cai, Y. Z. (2013). Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing

- proanthocyanidins. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1153–1161.
- Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., & Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International*, 50(2), 691–697.
- Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W., & Kitts, D. D. (2003). Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Pigmented Fraction Suppresses both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical and Biological Model Systems. *Society*, 5271–5277.
- Ismail, N., Imam, M., & Umar, M. (2014). Mechanistic basis for protection of differentiated SH SY5Y cells by oryzanol rich fraction against hydrogen peroxide induced neurotoxicity, 122(7), 2014–2015.
- Ismail, N., Ismail, M., Fathy, S. F., Musa, S. N. A., Imam, M. U., Foo, J. B., & Iqbal, S. (2012). Neuroprotective effects of germinated brown rice against hydrogen peroxide induced cell death in human SH-SY5Y cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9692–9708.
- Jang, H.-H., Park, M.-Y., Kim, H.-W., Lee, Y.-M., Hwang, K.-A., Park, J.-H., Kwon, O. (2012). Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 27.
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 441(2), 523–540.
- Madhujith, T., & Shahidi, F. (2009). Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. *Food Chemistry*, 117(4), 615–620.
- Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1–15.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M. F., De Oliveira, D. M., De Cerqueira, M. D., & El-

- Bachá, R. S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011.
- Meng, L. shuai, Li, B., Li, D. nan, Wang, Y. hua, Lin, Y., Meng, X. jun, Liu, N. (2017). Cyanidin-3-O-glucoside attenuates amyloid-beta (1–40)-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells through a Nrf2 mechanism. *Journal of Functional Foods*, 38, 474–485.
- Min, B., Gu, L., McClung, A. M., Bergman, C. J., & Chen, M. H. (2012). Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry*, 133(3), 715–722.
- Min, B., McClung, A., & Chen, M. H. (2014). Effects of hydrothermal processes on antioxidants in brown, purple and red bran whole grain rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chemistry*, 159, 106–115.
- Naczka, M., & Shahidi, F. (1989). The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chemistry*, 31(2), 159–164.
- Paiva, F. F., Vanier, N. L., Berrios, J. D. J., Pan, J., de Almeida Villanova, F., Takeoka, G., & Elias, M. C. (2014). Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35(1), 10–17.
- Park, Y., Park, E. M., Kim, E. H., & Chung, I. M. (2014). Hypocholesterolemic metabolism of dietary red pericarp glutinous rice rich in phenolic compounds in mice fed a high cholesterol diet. *Nutrition Research and Practice*, 8(6), 632–637.
- Pereira-caro, G., Watanabe, S., Crozier, A., Fujimura, T., & Yokota, T. (2013). Phytochemical profile of a Japanese black – purple rice. *Food Chemistry*, 141(3), 2821-2827.
- Qiu, Y., Liu, Q., & Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial wild rice and

- analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry*, *121*(1), 140–147.
- Ribani, M., Collins, C. H., & Bottoli, C. B. G. (2007). Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, *1156*(1), 201–205.
- Ruffels, J., Griffin, M., & Dickenson, J. M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European Journal of Pharmacology*, *483*(2), 163–173.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014a). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, *59*(2), 211–218.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014b). Phenolic acids , anthocyanins , and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L .) grains at four stages of development after flowering. *Food Chemistry*, *143*, 90–96.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107–1112.
- Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs, D. R., & Marquart, L. (1999). Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *70*(3), 459s–463s.
- Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., & Duan, C. (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, *12*(3), 679–693.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.-L., &

- Rémésy, C. (2005). Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3902–3908.
- Tarozzi, A., Morroni, F., Hrelia, S., Angeloni, C., Marchesi, A., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2007). Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 424(1), 36–40.
- Torma, P. do C. M. R., Brasil, A. V. S., Carvalho, A. V., Jablonski, A., Rabelo, T. K., Moreira, J. C. F., Rios, A. de O. (2017). Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Food Chemistry*, 222, 94–104.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5), 612–616.
- Wang, Q., Han, P., Zhang, M., Xia, M., Zhu, H., Ma, J., Ling, W. (2007). Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(SUPPL.1), 295–301.
- Xia, M., Ling, W. H., Ma, J., Kitts, D. D., & Zawistowski, J. (2003). Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. *The Journal of Nutrition*, 133(3), 744–751.
- Xie, H., Hu, L., & Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086–1092.
- Yu, J., Ye, J., Liu, X., Han, Y., & Wang, C. (2011). Protective effect of L-carnitine against H₂O₂-induced neurotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells.

Neurological Research, 33(7), 708–716.

Zhang, H., Shao, Y., Bao, J., & Beta, T. (2015). Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chemistry*, 172, 630–639.

Table 1. Chromatographic and spectroscopic characteristics and contents of insoluble-bound phenolic compounds and free phenolic compounds of red (RRB) and black (BRB) brans obtained by HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

	Peak ^a	Compound	Concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	Exact molecular weight	RT (min) ^b	max (nm) ^c	[M - H] ⁺ /[M] ⁺ (m/z) ^e	Fragments (m/z) MS ² (-)
Insoluble conjugated phenolic compounds								
Pellet fraction of RRB (A)	10	<i>p</i> -coumaric acid	445 \pm 85	164.0473	29.96	298(sh) ^d , 309	163.0582	119.0638
	11	Ferulic acid	1.092 \pm 190	194.0579	31.52	296(sh) ^d , 323	193.0726	134.0526
		Total	1.538 \pm 476					
Pellet fraction of BRB (B)	2	Gallic acid	-	170.0215	13.10	269	169.0352	-
	3	Protocatechuic acid	594 \pm 104	154.0266	18.09	259, 294	153.0358	108.0306
	10	<i>p</i> -coumaric acid	281 \pm 34	164.0473	29.94	298(sh) ^d , 309	163.0572	119.0638
	11	Ferulic acid	849 \pm 336	194.0579	31.52	293(sh) ^d , 323	193.0704	134.0494
		Total	1.725 \pm 304					
Free phenolic compounds								
Hydrophilic fraction of RRB (C)	1	Vanillic acid	-	168.04226	8.9	277	167.0341	124.0250
	5	Procyanidin B1 ou B2	-	578.1424	21.1	278	577.1785	289.0954/407.1094/ 245.0914/125.0344
	6	Procyanidin (trimer)	-	866.2058	21.5	279	865.2626	577.1781/407.1103/ 289.0954/245.0696
	7	Catechin	-	290.0790	22.3	277	289.0940	123.0538/137.0413, 151.0491/221.0949
	9	Procyanidin B1 ou B2	-	578.1424	23.4	278	577.1785	289.0954/407.1094/ 245.0914/125.0344
		Total						
Hydrophilic fraction of BRB (D)	4	Cyanidin 3-glucoside	411 \pm 6	449.10839	20.9	280, 519	449.0984	287.0475
	8	Peonidin 3-glucoside	172 \pm 1	463.12404	23.2	276, 521	463.1099	301.0622
		Total	583 \pm 131					

^a Numbered according to the chromatogram shown in **Figure 1**. ^b Retention time (RT) in the C₁₈ Atlantis T3 (5 μm) column. ^c Linear gradient of 0.5% formic acid in water and acetonitrile with 0.5% formic acid. ^d sh: shoulder. ^e Anthocyanins: positive mode [M]⁺.

CAPÍTULO 6

ARTIGO 2: Comparative study on the properties of films based on red rice (*Oryza glaberrima*) flour and starch

Carolina Galarza Vargas, Tania Maria Haas Costa, Alessandro de Oliveira Rios, Simone Hickmann Flôres

Artigo publicado na revista: Food Hydrocolloids

Abstract

Biodegradable films based on red rice flour (RRF) and red rice starch (RRS) with glycerol as plasticizer were developed and formulated with different RRF:RRS ratios (10:0, 9:1, 7:3, 5:5 and 0:10, w/w). The mechanical, physicochemical, barrier, optical, antioxidant and biodegradability properties were evaluated. The morphology, thermal stability and protective effect of the films against sunflower oil oxidation were investigated only for selected films. The films presented interesting results for moisture content, solubility, water holding capacity, water vapor permeability, color and light transmission. Among the studied films, RRF-RRS (9:1) film showed improved mechanical properties and lower cost compared with rice starch based film. The films presented great activity in scavenging the DPPH radical (> 90 %). Regarding the biodegradability, all the films lost around 60% of weight after 15 days in soil degradation analysis. The selected RRF-RRS films (10:0, 9:1 and 0:10) were thermally stable until approximately 150°C. SEM analyzes revealed that flour based films present less smooth surfaces and that the incorporation of starch improved their homogeneity. The film RRF-RRS (9:1) demonstrated an interesting protective effect of sunflower oil and retarded its oxidation process. Therefore, this study suggests that red rice flour and starch are promising raw materials with potential to be used as active food packaging.

Key-words: antioxidant; biopolymers; casting; composite films; packaging

1. Introduction

The accumulation of petroleum-based plastics packaging has gained attention throughout the world. These materials does not suffer natural degradation, consequently, their extensive usage and improper disposal have caused serious environmental problems (Rogovina, Alexanyan & Prut, 2011).

As a result, the use of eco-friendly materials for packaging development has been brought into focus, since they have the ability to form films, are abundant in nature, are not toxic to the environment, are inexpensive, biodegradable and recyclable (Lin & Zhao, 2007). Thus, protein, polysaccharides, lipids or the combination of these components have been used in the development of biodegradable packaging (Cao, Fu & He, 2007; Cuq et al., 1997). The production of films from biopolymers materials can increase value to low-cost raw materials and plays a key role in food preservation (Plackett, 2011).

Starch is a constituent used in the production of biodegradable films because it is a natural and abundant polysaccharide. Different sources of starch, including cassava, potatoes, bananas, quinoa, rice and wheat, have been used as film-forming materials whose physicochemical properties were evaluated (Chinma, Ariahu & Alakali, 2013; Dias et al., 2010; Pelissari et al., 2013; Pagno et al., 2015; Zavareze, et al., 2012). However, studies have shown that most of the films obtained from starch presents poor mechanical properties, low gas permeability, low transparency, and that these deficiencies can be improved by the addition of protein, fibers, lipids, or plasticizers (Colla, Do Amaral Sobral & Menegalli, 2006; Sun et al., 2014).

Although most of studies reports the use of starch as the main ingredient in the preparation of films, there is an increasing interest in the flour as a raw material for films production (Pelissari et al., 2013). The combination of different components (polysaccharides, lipids, proteins and fibers) from the same agricultural source has the advantage that components are in their original system. Thereby, the flour seems to be a promising ingredient on biodegradable materials development (Tapia-Blácido et al., 2005).

Moreover, flour is a low cost raw material, easier to obtain and more available when compared to individual pure components, such as starch or proteins (Mazjoob et al., 2015). Previous studies evaluated the production of biodegradable films from different sources of flour, such as amaranth, corn, rice, and banana (Colla, Do Amaral & Menegalli, 2006; Daudt et al., 2016; Dias et al., 2010; Dick et al., 2015; Pelissari et al., 2013).

Rice is a food staple for the majority of the population and one of the most important crops in the world (Dias et al., 2010). Although white rice is the most popular variety, there are pigmented rice grains, such as red or black, which possess phenolic compounds in their structure (Paiva et al., 2016). Among the various benefits that these compounds can exert, the antioxidant activity is an important property. Phenolic compounds may lead to an increase in the shelf life of perishable food by delaying the oxidative process during food storage.

Therefore, the objective of this investigation was to develop biodegradable films from red rice flour (RRF) and red rice starch (RRS), and to evaluate the influence of different ratios of these two materials on the film's characteristics.

2. Materials and Methods

2.1 Production of Red Rice Flour (RRF)

The red rice (*Oryza glaberrima*) was grown in November 2012 and harvested in April 2013 in an organic production system in southern Brazil (Camaquã, Rio Grande do Sul, Brazil) (latitude 30° 51' 3" S, longitude 51° 48' 43" W). The grains were ground in a knife mill (model SL-31; Solab, Brazil) and then sieved (100 mesh; model Tamis; Bertel, Brazil) to obtain a powder with average particle size smaller than 125 μ m. The flour was stored plastic bags until the period of use and analysis.

2.2 Extraction of Starch from the Red Rice

The red rice starch (RRS) was obtained from the flour by the alkaline extraction method described by Lawal, et al. (2011). The starch was dried at 45°C in a forced-air oven for 12 hours, sifted on a sieve of 115 mesh and stored in the same way as flour.

2.3 Chemical Composition

The chemical composition of the flour and starch regarding protein, lipid, ash and moisture content was analyzed following the AOAC methods (2005). The total dietary fiber (TDF), insoluble dietary fiber (IDF), and soluble dietary fiber (SDF) content was performed for the flour. Amylose content of starch was measured by iodine method (Morrison & Laignelet, 1983). Total carbohydrate content was obtained by subtracting the sum of the moisture, protein, lipid, total dietary fiber and ash content from 100. The results were expressed as gram per 100 g on a dry basis (DB).

2.4 Film Preparation

The filmogenic solution (FS) was prepared by solubilization of 5g of flour or starch in distilled water under continuous stirring to obtain a final concentration of 5 % (w/v). The solutions were stirred at ambient temperature (20°C –22 °C) for 5 minutes and then added of glycerol at 40 % (w/w) based on the content of dry raw material. The dispersions were gelatinized by heating at 80 ± 5 °C for 30 min, to ensure disintegration of starch granules and formation of a homogeneous FS. Subsequently, the FS was prepared by mixing the RRF and RRS at different ratios (9:1, 7:3 and 5:5, w/w), according to previous tests. The FS was then poured into polystyrene Petri dishes (0.52 g cm^{-2}) and dried in air circulation oven (model B5AFD; DeLeo) at 30 °C for 18 h. The films were conditioned for 48h under a controlled relative humidity of 58% at 25 °C (maintained by a saturated NaBr solution) before characterization.

2.5. Film characterization

2.5.1 Thickness

Films thickness was determined by using a digital electronic micrometer (model IP40; Digimess, Brazil) with 0.001 accuracy and 0 to 25 mm resolution. Five random positions on each film sample were used to measure the thickness. Mean thickness values for each sample were taken and used in the calculation of water vapor permeability (WVP) and tensile strength (TS).

2.5.2 Mechanical Properties

The mechanical properties [tensile strength (TS; MPa), percent elongation at break (EAB; %), and Young's Modulus (YM; MPa)] were determined by using a texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, United Kingdom), following the methodology described by ASTM D882-09 (ASTM, 2009) with initial grid separation of 50 mm and crosshead speed of 0.8 mm s^{-1} . Ten strips of each film (100 mm \times 25 mm) were used for testing.

2.5.3 Moisture Content

The moisture content was analyzed gravimetrically by drying the films (2 cm in diameter) at 105 °C for 24 h in a dryer oven (model TLK48; DeLeo, Brazil).

2.5.4 Water Solubility

The water solubility (WS) was measured according to a methodology described by Colla, Do Amaral & Menegalli, (2006) with some modifications. Previously, film samples (2 cm in diameter) were dried in a dryer oven (105 °C for 24 h), then they were immersed in distilled water (30 ml), and maintained under stirring at 25 °C for 24 h using a shaker (model NT145; Novatecnica, Brazil). The results were expressed as the percentage of solubilized matter from dry films after immersion.

2.5.5 Water Holding Capacity (WHC)

The WHC of the films was measured according to Cao et al (2007). The films samples (2.5 cm × 2.5 cm) were first weighed (w_1) in air-dried conditions, and then submersed in a flask with deionized water (25 °C ± 2 °C). Two minutes later, the samples were removed from the water, and the excess of water was removed with filter paper. The films were weighed (w_2) and the following equation was used to calculate the adsorbed water:

$$\text{WHC (\%)} = [(w_2 - w_1) / w_1] \times 100$$

where w_1 and w_2 are the weights of the air-dried and wet samples, respectively.

2.5.6 Water Vapor Permeability (WVP)

The water vapor permeability of the films was determined gravimetrically based on a standard method (ASTM E96, 1996) and as described by Talja et al (2008) with some modifications. The samples were set in aluminum permeation cells (inner diameter: 63 mm; height: 25 mm) containing granular anhydrous CaCl_2 and maintained in glass vessel with saturated saline solution in order to ensure the relative humidity gradient of 0/75 %. The test was performed at 25 °C and the mass gain was measured in an interval of 24 h.

2.5.7 Color Parameters

Color of the films was determined using a CIELab colorimeter (model CR-300; Minolta, Co., Ltd., Japan). Color was expressed as L^* (lightness/brightness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness) values. The films were placed on a white plate (L_0^* 97.44, a_0^* 0.10, and b_0^* 1.73), which was used as a standard background. The total difference in color (ΔE^*) was calculated as follows (Gennadios et al., 1996):

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

2.5.8 Light Transmission and Opacity

The light transmission of films was taken from ultraviolet region (UV) to visible light wavelengths, between 200 and 800 nm, using a UV–vis spectrophotometer (model UV-1800; Shimadzu, Japan) according to the method described by Fang et al. (2002). The opacity value of the films was calculated by the ratio between the absorbance at 600 nm and the film thickness (mm) (Han & Floros, 1997).

2.5.9 DPPH Radical Scavenging Capacity

The method described by Huang, Ou & Prior (2005) was adapted to determine the scavenging capacity of DPPH radical by the antioxidant compounds present in films. Assay tubes were added of 1 cm² of each film and 3.9 mL of a methanolic DPPH solution (0.06 mmol/L). The solution (film + methanolic DPPH solution) was maintained under protection from light for 2 h 30 min. The absorbance of the complex was measured at a wavelength of 517 nm using a spectrophotometer (model UV-1800; Shimadzu, Japan). A methanolic DPPH solution without any film was used as blank. A synthetic plastic film was used as control. The DPPH Radical Scavenging Capacity was calculated as follows:

$$I (\%) = [(A_b - A_f) \div A_b] \times 100$$

where I is the percentage inhibition of the DPPH radical, A_b the blank absorbance, and A_f the film absorbance.

2.5.10 Biodegradability: Indoor Soil Burial Degradation

The soil burial degradation analysis was executed according to the methodology described by Martucci and Ruseckaite (2009) with some modifications. Natural organic soil was added in plastic containers (6 cm × 6 cm × 6.5 cm) to be used as the degradation means for the films. Firstly, square pieces of the films (2 cm × 3 cm) were dried at 60 °C (model TLK48, DeLeo, Brazil) for 24 hours (m_0). Subsequently, the films were put into aluminum mesh and buried in the soil (4 cm depth). Water (20 ml) was added to the soil, every 2 days, to maintain the humidity at approximately 40 %. The degree of degradation of the films was determined after 15 days as the weight loss (WL; %), according to equation:

$$WL(\%) = [(m_f - m_0) / m_0] \times 100$$

where m_0 is the initial mass and m_f the remaining dried mass after 15 days.

2.6 Characterization of selected films

Among the different RRS-RRF ratio formulations, the RRF-RRS (9:1) film showed the most adequate and interesting mechanical properties. Consequently, it was chosen to be further characterized regarding its morphology and thermal stability, and compared to the films based only in starch and flour. Additionally, the efficacy of RRS-RRF (9:1) on protecting sunflower oil from oxidation was investigated due to its potential as a food packaging material.

2.6.1 Scanning electron microscopy

The morphology of the surface film in contact with the Petry dish was analyzed by scanning electron microscope (model JSM 6060; JEOL, Japan) at an accelerating voltage of 5.0 kV. Prior to visualization, the films were placed on bronze stubs with double-sided adhesive and sputtered with gold in order to make the sample conductive. Micrographs were observed at a magnification of 1000×.

2.6.2 Thermo-gravimetric analysis (TGA)

The selected films were scanned using a thermo gravimetric analyzer (model TGA-50; Shimadzu, Japan) in a dynamic atmosphere of nitrogen, from room temperature to 600 °C, at a rate of 10 °C/min (Nuthong, Benjakul & Prodpran, 2009).

2.6.3 Effect of the Film on the Retardation of Sunflower Oil Oxidation

The antioxidant efficacy of the RRF-RRS (9:1) film against sunflower oil was investigated. The films were cut in rectangles shape (110 mm × 60 mm) and sealed (model F 200 Flash; Fastvac, Brazil) on three edges. Then, 10 ml of sunflower oil containing no artificial antioxidants was added to the interior of each film bag and the top edges of the films were sealed. Two control systems were used: sunflower oil stored in closed plastic bottles (PLA) and in open-glass Petri dishes (GLA). All samples containing the sunflower oil (film bags and closed and open controls) were maintained in a chamber and exposed to fluorescent light at intensity of 900–1000 lux (Luxometer; model MS6610; V&A Instrument, China), at 30 °C and 54% RH.

The oxidative stability of packaged sunflower oil was carried out by determining peroxide value (PV) and dienes and trienes content at 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 21 days of storage. For determining the PV of the samples, it was employed the titrimetric method (IUPAC, 1987). The data were expressed in milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (mEq/kg). The conjugated diene and conjugated trienes were quantified by the spectrophotometric method of European Regulation EC 2568/91, at the absorbance of 232 nm and 268 nm, respectively, and the data were expressed in g/100g.

2.7 Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was applied to the data and the mean comparisons by Tukey's. All results were presented as means ± standard deviation and the level of significance at 5%. Statistica 12.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) was the software used for data analysis. All experiments were performed in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1 Chemical Composition of the Red Rice Flour and Starch

Different parameters may have great influence on the chemical composition of flour and starch, including rice variety, cultivation conditions, and starch extraction method. The centesimal composition of flour and starch is presented in Table 1. Chemical analysis evidenced that flour represents a rich source of carbohydrates (80.20 %), considerable protein content [8.47 % (DB)], and lower contents of fiber, lipids and ash. These values are close to the values reported to red rice analyzed by Paiva et al., (2016), who found carbohydrate values around 85 %, protein content of 8.1 % and lower values for the other nutrients. Starch extracted from flour presented 94.4% purity with 16.87 % of amylose. The amylose content depends on the rice genotype. Boêno, Ascheri & Bassinello (2011) found amylose content between 14.6 % and 26.1 % for different genotypes of red rice, while Paiva et al (2016) evidenced amylose content of 32.0 % to another genotype. Usually, the amylose percentual of most starches native comprises a range between 15% and 30 % (Wong et al., 2007), which is in accordance with the results obtained for this study.

Table 1. Chemical Composition (g/100g DB) of the Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) used to prepare biodegradable films.

	Red Rice Flour (RRF)	Red Rice Starch (RRS)
Moisture (%)	14.63 ± 0.12	13.57 ± 0.28
Protein	8.47 ± 0.28	4.87± 0.08
Lipid	2.67 ± 0.18	0.33 ± 0.04
Ash	1.82 ± 0.11	0.45 ± 0.01
Total fiber	6.84 ± 0.20	nd
Insoluble fiber	6.62 ± 0.29	nd
Amylose	7.26 ± 0.54	16.87 ± 0.88
Total carbohydrate	80.20	-

Values are the average of triplicates ± standard deviation (SD)
nd: not determined.

3.2 Film Thickness and Mechanical Properties

The thickness and mechanical properties values of the RRF-RRS composite films are shown in Table 2. Film thickness ranged from 0.242 mm to 0.297 mm. The RRS film had the smaller thickness among the film formulations ($p < 0.05$) and no difference was found among the films which contained RRF in the composition. The difference in particle size of the raw materials (flour and starch) may be an interfering factor in this characteristic. Besides that, the structure of the molecules, the chemical composition of the filmogenic solution's materials and their interaction during the film formation process can also interfere on film thickness (Mazjoob et al., 2015).

The TS, MY and EAB values of RRS film were higher than the values found for RRF film, and the incorporation of starch to the film matrix in all the studied ratios have significantly improved the TS and EAB properties. These results may be justified by the existence of irregularities, pores and fissures at the microstructure level of the RRF film. The cohesion of constituents of the polymer matrix also has a direct influence on mechanical strength of biopolymers (Guilbert, Cuq & Gontard et al., 1997), and, the presence of lipids in the flour may not contribute to form continuous and cohesive matrices (Péroval et al., 2002). Moreover, the difference of amylose content in the films may also contribute for this behavior, since films with higher amylose content usually present good mechanical strength (Lourdin, Valle & Colonna, 1995). In this study, the starch presented around 17 % of amylose, while flour presented 7 %. During the filmogenic solution drying process, it occurs water evaporation, which leads to a starch network formation. A higher content of amylose may cause a greater proximity of the chains, which facilitates the formation of a matrix with more polymer content per area and contributes to obtain improved mechanical properties (Alves et al., 2007).

Table 2. Film Thickness (FT), Tensile Strength (TS), Elongation at Break (EB), and Young's Modulus (YM) of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.

Sample	FT (mm)	TS (MPa)	EAB (%)	YM (MPa)
RRF	0.286 ± 0.010 ^a	0.55 ± 0.08 ^c	28.29 ± 4.96 ^b	12.71 ± 3.52 ^b
RRF-RRS (9:1)	0.297 ± 0.014 ^a	0.93 ± 0.06 ^b	46.21 ± 3.36 ^a	12.59 ± 2.94 ^b
RRF-RRS (7:3)	0.282 ± 0.022 ^a	0.99 ± 0.14 ^b	46.00 ± 7.88 ^a	13.63 ± 2.41 ^b
RRF-RRS (5:5)	0.292 ± 0.011 ^a	1.05 ± 0.14 ^b	48.28 ± 3.20 ^a	13.71 ± 3.82 ^b
RRS	0.242 ± 0.014 ^b	1.29 ± 0.02 ^a	49.73 ± 11.00 ^a	19.08 ± 3.16 ^a

Mean values ± SD (n = 3). Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences (P<0.05).

3.3 Solubility in Water (SW)

Although the moisture content of RRS and RRF films have not presented statistical difference, the solubility in water of the RRF film (24.59 %) was higher (p < 0.05) than that of the RRS film (21.05 %) (Table 3). These results are very similar to ones found for banana flour film (SW: 27.9 %) and banana starch film (SW: 21.3 %). The lower solubility found for starch films in comparison to the flour films is explained by the interactions between amylose-amylose, amylose-amylopectin and amylopectin-amylopectin that occur during drying of the film, and consequently reduces the amount of polar groups available to react with water (Pelissari et al., 2015).

Table 3. Moisture Content (MC), Solubility in water (SW), Water holding capacity (WHC) and Water Vapor Permeability (WVP) of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.

Sample	MC (%)	SW (%)	WHC (%)	WVP (g mm h ⁻¹ m ⁻² kPa ⁻¹)
RRF	26.16 ± 1.38 ^{a,b}	24.59 ± 1.16 ^a	49.49 ± 2.36 ^a	1.56 ± 0.05 ^a
RRF-RRS (9:1)	27.69 ± 0.33 ^{a,b}	24.15 ± 1.04 ^{a,b}	47.46 ± 3.37 ^a	1.34 ± 0.02 ^b
RRF-RRS (7:3)	29.58 ± 1.62 ^a	22.61 ± 1.77 ^{a,b}	48.99 ± 2.17 ^a	1.30 ± 0.02 ^b
RRF-RRS (5:5)	28.01 ± 0.10 ^{a,b}	24.37 ± 0.80 ^{a,b}	51.92 ± 1.17 ^a	1.30 ± 0.05 ^b
RRS	24.00 ± 2.80 ^b	21.05 ± 1.34 ^b	48.26 ± 3.13 ^a	1.25 ± 0.12 ^b

Mean values ± SD (n = 3). Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences (P<0.05).

3.4 Water Holding Capacity

The water holding capacity of the films was not different among the five film formulations (Table 3). A film with very high WHC can present damage during its application as food packaging, since it will tend to dissolve when in contact with food that have high moisture content in its structure (Gómez-Guillén et al., 2011). Therefore, the obtained results may be considered excellent when compared to other biodegradable films, such as gelatin based films, which have WHC values 4 to 7 times higher than those of the present study (Iahnke et al., 2016; Kavooosi et al., 2014).

3.5 Water Vapor Permeability (WVP)

The choice of packaging material with adequate WVP is a major factor which influences the preservation of the food quality during storage (Mazjoob et al., 2015). Table 3 shows WVP values of RRF-RRS composite films prepared at different blend ratios. The RRF film showed the highest permeability among all samples ($1.56 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$), while the starch film showed the lowest permeability ($1.25 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$). Furthermore, the addition of starch in the formulations caused reduction of this parameter in the RRF-RRS composite films. Similarly, other studies have reported higher WVP of rice flour films compared to rice starch films with the justification that rice flour films present a more open structure, irregular surface, and higher diffusion coefficients (Dias et al., 2010; Mazjoob et al., 2015). The polymeric matrix of rice flour films is composed of different molecules, including starch, proteins and lipids, which results in a surface with irregularities. In addition, the WVP can be increased by the presence of micro-cracks and pores on the surface (Dias et al., 2010). This result is in agreement with the microstructure observed by SEM analysis (Fig. 2) which revealed a more open and porous structure for the RRF film as compared to the RRS film.

However, the WVP of all films was high compared to films based on quinoa starch ($0.204 \text{ g m mm}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) (Araujo-Farro et al., 2010) and based on passion fruit mesocarp flour ($0.351 \text{ g m mm}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) (Nascimento, Calado & Carvalho, 2012). This result can be explained by the fact that both the starch and the glycerol present hydrophilic nature. The presence of the plasticizer allows greater water vapor entry through the structure of the film, as it increases the free volume and chain movements, causing reduced stiffness and increased molecular mobility of the film (Cerqueira et al., 2012). Additionally, the increase in thickness

may be associated with higher WVP, which corroborates to the findings of this study (Sobral, 2000).

3.6 Film Color

Color properties of the films are shown in Table 4. Based on the L^* and a^* values, the RRF film is darker and more reddish than the RRS film. A previous study also reveals higher luminosity to films obtained from banana starch compared banana flour films (Pelissari et al., 2013). The increase in the parameters a^* , b^* e ΔE^* was proportional to the concentration of flour in RRF-RSS composite films. These results suggest that the RRF-RRS composite films became redder as the amount of flour was increased, which indicates that color pigments such as tannins and proanthocyanidins present in red rice may influence these color parameters (Gunaratne et al., 2013).

The increased yellowness in RRF-RRS composite films, which can be observed based on the increase of the parameter b^* , can be due to Maillard Reaction that occurs between amines and carbonyl groups present on red rice. The addition of higher amounts of rice flour in gelatin films caused increased in yellow color of films, which was attributed to the coloring components produced during the Maillard Reaction (Ahmad et al., 2015). It was noticed that the a greater content of RRF resulted in an increase the color difference, which may be observed from higher value ΔE^* for the film RRF:RRS (9:1) ($\Delta E^*=47.67$).

Table 4. Color of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.

Sample	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
RRF	57.18 ± 0.27^c	17.33 ± 0.14^a	29.42 ± 0.17^b	51.81 ± 0.20^a
RRF-RRS (9:1)	64.28 ± 1.35^d	16.33 ± 0.40^a	32.04 ± 0.94^a	47.67 ± 0.86^b
RRF-RRS (7:3)	70.19 ± 1.84^c	13.45 ± 0.86^b	28.67 ± 0.99^b	40.32 ± 2.16^c
RRF-RRS (5:5)	78.55 ± 0.49^b	9.17 ± 0.27^c	21.66 ± 0.52^c	28.92 ± 0.73^d
RRS	83.44 ± 1.32^a	4.58 ± 0.39^d	14.44 ± 0.42^d	19.44 ± 1.24^e

Mean values \pm standard deviation (n=3). Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

3.7 Light Transmission and Opacity

The light transmission at 200 and 280 nm, was less than 1 % for all the film formulations, which suggests that these films can act as barriers against UV light (Table 5). In the visible range, at wavelength of 500 nm -600 nm, the transmission of light was very low for RRF-RRS composite films, compared to RRS film. A previous study attributed this feature the structural composition of rice, justifying that the chains of amylose and amylopectin are polarizable, and thus can absorb the energy of the received light. Moreover, the protein content both rice flour and starch, 8.47 % and 4.87 %, respectively, presents aromatic amino acids in its structure, which have the ability to absorb light energy (Ahmed et al., 2015). Ashwar et al. (2005) justify the fact that the lowest transmittance may be due to the presence of antioxidants components in the matrix.

The addition of different levels of flour (Figure 1) caused a linear increase in opacity, which agreed with the color results. Similar results were found for flour and starch films of banana (Pelissari et al., 2013). Ahmed et al (2015) adds that the homogeneity of the film structure is associated with greater transparency, which agrees with the results obtained by SEM of the present study, in which the starch films showed more homogeneous structure compared to rice flour (Figure 2).

The type of application, appearance and marketability are dependent parameters of the optical properties of the films (Hoque et al., 2011). Thus, RRF - RRS composite films showed ability to protect the packaged foods from light, and therefore they present the potential to increase shelf life and quality of the packaged food products.

Table 5. Light Transmittance and Opacity of Red Rice Flour (RRF) and Red Rice Starch (RRS) composite films prepared at different blend ratios.

Light transmittance (%) at different wavelengths (nm)*										
Sample	200	280	300	350	400	500	600	700	800	Opacity**
RRF	0.01	0.01	0.01	0.25	1.85	3.61	6.21	8.60	10.06	4.21 ± 0.09
RRF-RRS (9:1)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.48	1.70	5.01	9.31	12.64	4.13 ± 0.17
RRF-RRS (7:3)	0.01	0.01	0.01	0.02	0.67	2.24	6.06	10.77	14.50	3.67 ± 0.13
RRF-RRS (5:5)	0.01	0.01	0.01	0.10	1.53	3.39	6.40	9.17	11.04	3.16 ± 0.14
RRS	0.01	0.50	2.54	7.24	14.65	19.99	24.00	27.04	29.02	2.57 ± 0.26

*Each value represents the mean value of three determinations. **Mean values ± standard deviation (n=3). Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences (P<0.05).



Figure 1. Visual appearance of the RRF-RRS composite films at different ratios.

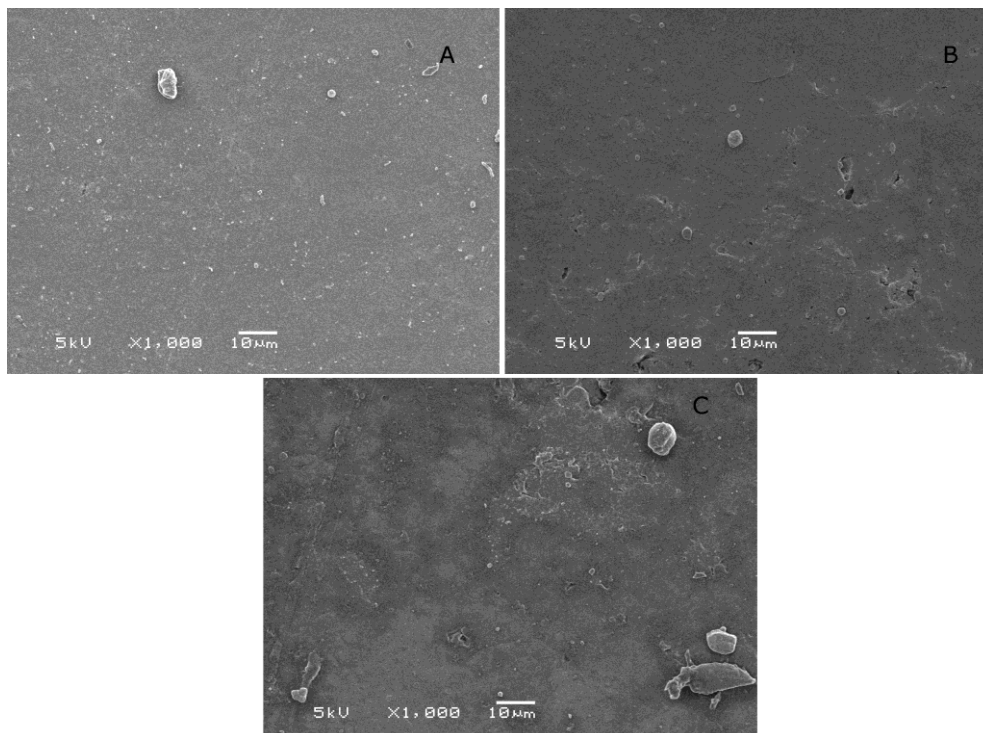


Figure 2. SEM micrographs of the surfaces of the RRS (A), RRF (B) and RRF-RRS (9:1) (C).

3.8 DPPH Radical Scavenging Capacity

All films containing RRF in their formulation showed scavenging capacity of DPPH radical higher than 90 %, while the RRS film had 6.43 % and the control film (plastic) showed no activity (Figure 3). There was no statistical difference between the film containing 100 % RRF and RRF-RRS composite films, indicating that the lowest concentration of RRF (50%) contains high levels of compounds with antioxidant properties. Several studies have investigated the antioxidant activity of red rice, so it is possible to assign the scavenging capacity of DPPH to the phenolic compounds present in these grains (Shao et al., 2014; Walter et al., 2013; Paiva et al., 2016).

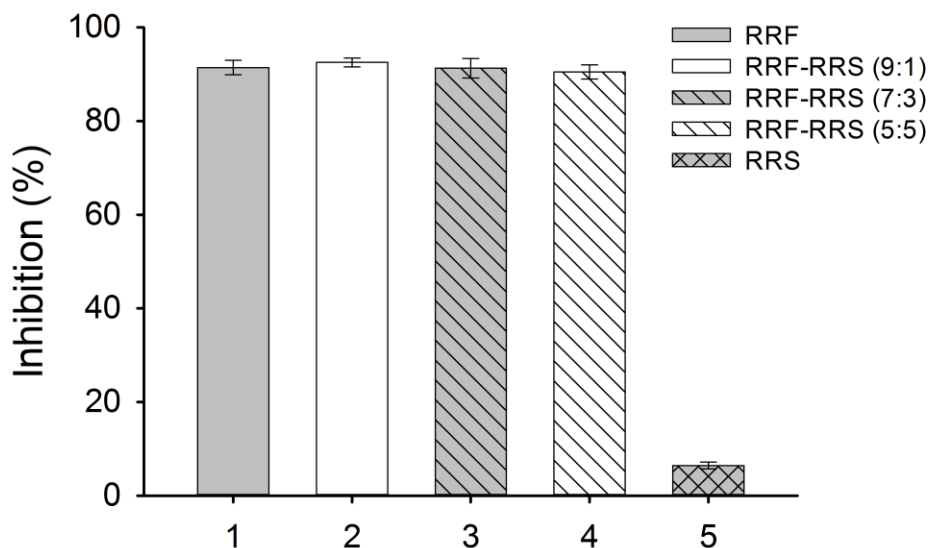


Figure 3. DPPH radical scavenging activity (I) of RRF-RRS composite films at different ratios.

3.9 Biodegradability: Indoor Soil Burial Degradation

Biodegradation is a natural process that evaluates the susceptibility to get breakdown of the constituent molecules of a material through the action of microorganisms. The evaluation of the biodegradation behavior of films based on RRF and RRS is important to understand their interaction with the environment. One of the most used methods for determining biodegradability of polymeric films is the soil burial method (Martucci & Ruseckaite, 2009; Maran et al., 2013; Iahnke et al., 2016). The microflora present in the soil acts in synergy in the film degradation process, using the film as an energy source, thereby, reproducing the conditions that occur in nature (Abrusci et al., 2006; Maran et al., 2013). Figure 4 shows the appearance of the films in the previous stage the burial of the films in the soil and after 15 days of experiment. Due to the hydrophilic character of starch and glycerol, these materials exhibit increased water absorption, this process causes instability of intermolecular interactions of the polymer matrix, causing its disintegration (Carvalho et al., 2009). The degradation indicator of the films buried in the soil was the weight loss at the end of 15 days. Weight loss of the films ranged from 52.98 % to 61.22 %, with no statistical difference between the samples. The films exhibited loss of the original shape, which

evidences the process of degradation occurred. Another study found that tapioca starch films showed losses between 41.58 % and 53.42 %, when subjected to experiment similar to the present study. The weight loss was directly proportional to the amount of starch and glycerol from the films by two factors: the hydrophilic character of these two compounds, which promotes an increase in their water activity and thus favors the growth of microorganisms and due to the starch tapioca serve as the sole carbon source for these microorganisms, resulting in partial degradation of the films (Maran et al., 2013). The results of this analysis clearly demonstrate that RRF-RRS composite films have a short lifetime in biotic environment, which makes them suitable for being returned to the environment without causing damage.

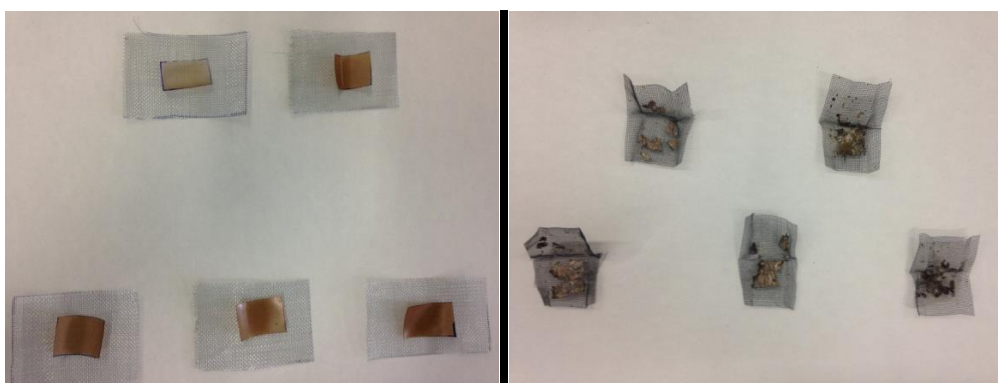


Figure 4. Visual aspect of RRF-RRS composite films at different ratios prior and after 15 days of exposure to soil burial degradation

3.10 Scanning electron microscopy (SEM)

The scanning electron microscopy of the surfaces of the RRF-RRS (9:1) film and RRF and RRS films, the last two used as controls, can be seen in Figure 2. Regarding the surface microstructure, the RRS film displays a smooth and uniform surface, while the RRF film showed a non-homogenous structure, with imperfections, like pores and cracks. The addition of starch in the flour film promoted the development of a film with compact structure, more homogeneous and without pores. In a previous study, the surfaces of films prepared with rice flour were more irregular than those of films prepared with rice starch (Dias et al., 2010). Similarly, surface microstructure of banana flour films presented a non-homogenous structure when compared with banana starch films, which showed an uniform surface (Pelissari et al., 2013). These authors justified that the irregularities on the surface of these films must be

related to the presence of different macromolecules in the polymeric matrix, like starch, lipids, proteins and fiber, and to the interactions between these components.

3.11 Thermal Stability of the Films

The thermal stability of the films was analyzed by thermogravimetric analysis (TGA). The thermograms are shown in Figure 5. For all films were observed three stages of weight loss (Δw) with a very similar behavior. As previously reported in literature, the thermal decomposition of glycerol-starch based films occurs in three main stages (Ayala et al., 2012; Pelissari et al., 2013). The first stage weight loss (0 °C – 150 °C) is due to the evaporation of free and bound water adsorbed in the film. The total weight loss related to the evaporation of water content was 12%, at 150 °C.

The second transition region was observed at the temperature range of 150 - 280 °C, where the weight loss was associated with the degradation of low molecular weight proteins, polysaccharide components and glycerol. The same trend was reported for rice flour films (Ahmad et al., 2015). The corresponding loss at this stage was approximately 19.0 % for the RRF and RRF-RRS (9:1) films and 14.7 % for the RRS film.

In the third peak (280°- 450 °C), RRS film presented higher loss when compared to RRF and RRF-RRS (9:1) films: 73.3%, 49.3% and 52.6% respectively. This was due to the degradation backbone of starch polymer membrane, as evidenced in a previous study (Ayala et al., 2011). The residual mass at 600 °C was higher for RRF and RRF-RRS (9:1) films (15.1% and 12.0%, respectively) compared with RRS film (7.45%), most likely by a higher fiber and ash content in the film with RRF in their composition. Thus, it is possible to affirm that the addition of RRF affects the thermal stability of the RRF-RRS (9:1) composite film as shown by TGA curves.

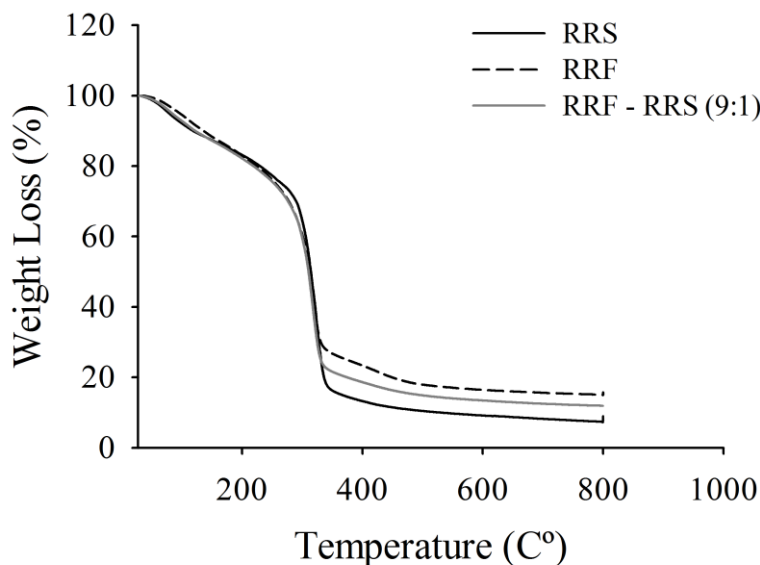


Figure 5. TGA curves of RRF-RRS composite films at different ratios.

3.12 Antioxidant Efficacy of the Films

The antioxidant efficacy of the RRF-RRS (9:1) composite film was evaluated through the analysis of the peroxide value (PV) and the content of conjugated dienes and trienes of sunflower oil samples stored during 21 days. The initial PV of the sunflower oil was 2.77 mEq/kg and the initial content of conjugated dienes and conjugated trienes was 3.36 g/100ml and 3.18 g/100ml, respectively.

The process of oxidation of the polyunsaturated fatty acid involves the formation of hydroperoxides and the displacement of the double bond with formation of conjugated dienes, which absorb 232 nm (Jadhav et al. 1996). The secondary products of the oxidation have maximum absorption at 270 nm. This difference is interesting as it allows to separate oxidative evolution states based on the ratio $A_{270\text{ nm}} / A_{232\text{ nm}}$: the higher the absorbance value at 232 nm, the higher will be the content of peroxides, corresponding to the beginning of the oxidation process. In contrast, the higher the absorbance value at 270 nm, larger will be the content of secondary products presents (Srinivasan et al., 1996).

The RRF-RRS (9:1) composite film prevented the oxidation of sunflower oil until the end of the experiment, since it was able to keep the peroxide content below the limit of peroxides established by the Codex Alimentarius to refined oils (10 mEq/kg). Meanwhile, in

the same period, the oil stored in the open and closed controls (PLA and GLA) suffered severe degradation, with PVs 113.87 mEq/kg and 45.59 mEq/kg, respectively (Figure 6).

To confirm this result, the dienes values - which represent primary degradation products of oils - also remained low for the oil packed in the RRF-RRS (9:1) composite film, and had increased proportionally to the increase of peroxides. The conjugated trienes remained constant throughout the experiment, indicating that the oil did not reach a stage of degradation able to form such products in any of the samples.

As shown by the inhibition of DPPH analysis, the presence of antioxidant compounds such as phenolic compounds and procyanidins in red rice should exert a protective action against lipid oxidation of sunflower oil. A mechanism proposed in the literature suggests that the phenolic compounds act as free radical receptors, and thus prevent the oxidation in its initial stage avoiding the formation of new radicals in the oxidation process (O'Sullivan et al., 2005).

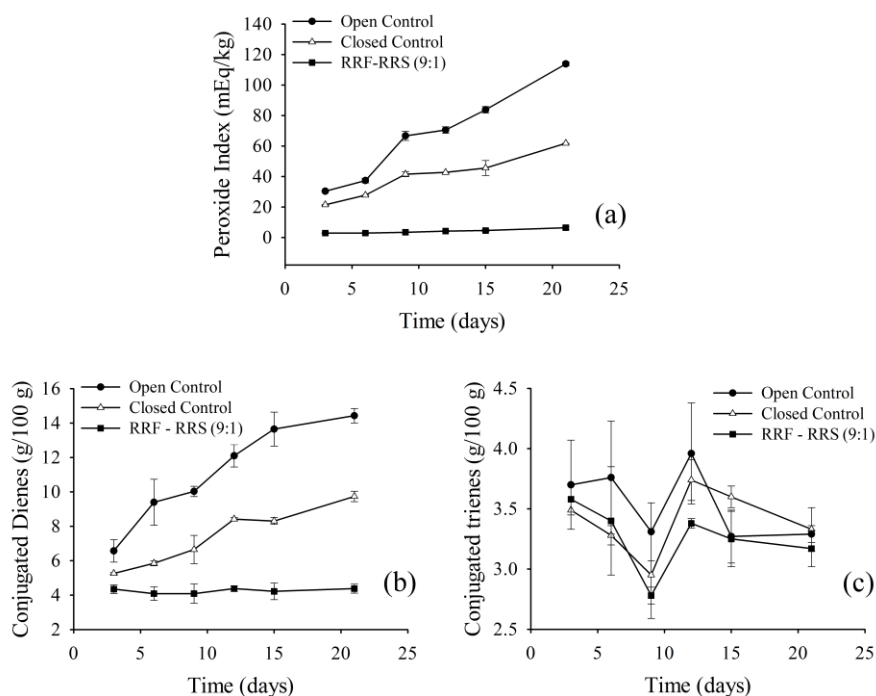


Figure 6. Peroxide Values, conjugated dienes and conjugated trienes of Sunflower Oil Packed in RRF-RRS (9:1) film, in Closed Plastic Bottles (PLA) and Placed in Open Glass Petri Dishes (GLA).

4. Conclusions

The incorporation of starch into the film matrix has positively influenced the mechanical and morphological properties of the films, and contributed to the formation of a more resistant and more elastic film, with lower WVP and with a more smooth and homogeneous surface. The biodegradability analysis revealed that the films exhibit biodegradable character and can be used as synthetic plastics substitute and as organic material for composting. RRF-RRS composite films were significantly less transparent and presented red color related by presence of compounds such as tannins and proanthocyanidins, as well as, a higher UV absorption capacity that could be beneficial to prevent lipid oxidation in foods. The results obtained by this study suggest that RRF-RRS (9:1) composite film have great potential to be used as a food packaging material with antioxidant properties. Finally, the production of films based on red rice flour and red rice starch contributes to a sustainable use of these raw materials, which are underutilized, and to the development of environmentally friendly technologies.

5. References

- Abrusci, C., Marquina, D., Del Amo, A., Corrales, T., & Catalina, F. (2006). A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *58*, 142–149.
- Ahmad, M., Hani, N. M., Nirmal, N. P., Fazial, F. F., Mohtar, N. F., Romli, S. R. (2015). Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings*, *84*, 115–127.
- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A., & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, *7*, 941-946.
- American Society for Testing and Materials. In Annual Book of ASTM Standards; Designation D882-09: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, 2009.
- American Society for Testing and Materials. In Annual Book of ASTM standards; Designation E96: Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, 1996.
- Araujo-Farro, P C.; Podadera, G.; Sobral, P. J. A.; Mmenegalli, F. C. (2010). Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, *81*, p. 839–848, 2010.

Ashwar, B. A.; Shah, A.; Gani, A.; Shah, U.; Gani, A.; Wani, I. A.; Wani, S. M.; Masoodi, F. A. (2015). Rice starch active packaging films loaded with antioxidants development and characterization. *Starch/Stärke*, 67, 294–302.

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC; Association of Official Analytical Chemists: Washington, 2005.

Ayala, G., Agudelo, A., & Vargas, R. (2012). Effect of glycerol on the electrical properties and phase behavior of cassava starch biopolymers. *Dyna*, 79, 138-147.

Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., & Baker, R. A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 509-524.

Boêno, J. A., Ascheri, D. P. R., & Bassinello, P. Z. (2011). Qualidade tecnológica de grãos de quatro genótipos de arroz-vermelho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 15,718–723.

Cano, A., Jimenez, A., Chafer, M., Gonzalez, C., Chiralt, A. (2014). Effect of amylose: amylopectin ratio and rice bran addition on starch films properties, *Carbohydrate Polymers*, 111, 543–555.

Cao, N., Fu, Y., & He, J. (2007). Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21, 575-584.

Cao, N., Fu, Y., & He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatine composite films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1153–1162.

Carvalho, R. A., Maria, T. M. C., Moraes, I. C. F., Bergo, P. V. A., Kamimura, E. S., Habitante, A. M. Q. B., Sobral, P. J. A. (2009). Study of some physical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol) using a response surface methodology. *Materials Science and Engineering*, 29, 485–491.

Cerqueira, M. A., Souza, B., Texeira, J., & Vicente, A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – a comparative study, *Food Hydrocolloids*, 27,175–184.

Chinma, C. E., Ariahu, C. C., & Alakali, J. (2013). Moisture sorption and thermodynamic properties of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2400–2407.

Codex-Alimentarius. Codex-Standards for fats and oils from vegetable sources. 1999, 210, p 1.

Colla, E., Do Amaral Sobral, P. J., & Menegalli, F. C. (2006). Amaranthus cruentus flour edible films, influence of stearic acid addition, emulsification stirring speed and plasticizer concentration in amaranth flour based film forming solutions on barrier and mechanical properties of its films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6645–6653.

Colla, E., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2006). Effect of composite edible coating from *Amaranthus cruentus* flour and stearic acid on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 6645.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers, *Food Chemistry*, *45*, 622–626.

Dias, A. B., Muller, M. O. C., Fabio, D. S., Larotonda, D. S., Laurindo, J. B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, *51*, 213–219.

Dick, M.; Pagno, C. H. ; Costa, T. M. H. ; Goma, A. ; Subirade, M. ; Rios, A. O. ; Flores, S. H. (2015). Edible films based on chia flour: Development and characterization. *Journal of Applied Polymer Science (Print)*, *132*.

Fang, Y., Tung, M. A., Britt, I. J., Yada, S., & Dalgleish, D. G. (2002). Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. *Journal of Food Science* *67*, 188-193.

Gennadios, A., Weller, C. L., Hanna, M. A., & Froning, G. W. J. (1996). Mechanical and Barrier Properties of Egg Albumen Films *Food Science*, *61*, 585-589.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1813-1827.

Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT – Food Science and Technology*, *29*, 10-17.

Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y. Z. (2013). Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry*, *138*, 1153–1161.

Han, J. H., & Floros, J. D. J. (1997). Casting Antimicrobial Packaging Films and Measuring Their Physical Properties and Antimicrobial Activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, *13*, 287-298.

Hoque, M.S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Songtipya, P. (2011). Properties of blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin and mungbean protein isolate, *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*, 663–673.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. J. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.

Iahnke, A. O. e S., Costa, T. M. H., Rios, A. de O., Flôres, S. H. (2016). Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris L. var. Conditiva*) residues. *Journal of Applied Polymer Science*, *43094*, 1-10.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry; *Standard methods for analysis of oils, fat and derivatives*, 6th ed., Thiais: Pergamon Press Ltd, 1979, vol. 2.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives; Paquot, C., Hautfenne, A. Blackwell Scientific Publications: London, U.K., 1987.

Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., Madhavi, D. L., Rajalakshmi, D., Narasimhan, S. (1996). In Madhavi, D. L.; Deshpande, S. S.; Salunkhe D. K., (Eds.), *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* (PP. 5-63). New York: Marcel Dekker Inc.

Kavoosi, G.; Rahmatollahi, A.; Dadfar, S. M. M.; Purfard, A. M. (2014). Effects of essential oil on the water binding capacity, physicochemical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 556-561.

Lawal, O. S., Lapasin, R., Bellich, B., Olayiwola, T. O., Césaro, A., Yoshimura, M., Nishinari, K. (2011). Rheology and functional properties of starches isolated from five improved rice varieties from west Africa. *Food Hydrocolloids*, 25, 1785–1792.

Lin, D. & Zhao, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 60–75.

Lourdin, D., Valle, G. D., & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27, 261-270.

Majzoobi, M., Pesaran, Y., Mesbahi G., Golmakani, M. T. & Farahnaky, A. (2015). Physical properties of biodegradable films from heat-moisture-treated rice flour and rice starch. *Starch/Stärke*, 67, 1053–1060.

Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar, R. (2014). Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. *Carbohydrate Polymers*, 101, 20– 28.

Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 1307-1313.

Morrison, W. R., & Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, 1, 9–20.

Nascimento, T. A.; Calado, V.; Carvalho C.W.P. (2012). Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. *Food Research International*, 49, p. 588–595.

Nuthong, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2009). Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, *44*, 143–148.

O’Sullivan, A., Mayr, A., Shaw, N.B., Murphy, S.C., & Kerry, J.P. (2005). Use of natural antioxidants to stabilize fish oil systems. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *14*, 75–94.

Pagno, C. H.; Costa, T. M. H. ; De Menezes, E.W. ; Benvenuti, E. V.; Hertz, P. F.; Matte, C. R.; Tosati, J. V.; Monteiro, A. R. ; Rios, A. O. (2015). Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa W.*) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *173*, p. 755-762.

Paiva, F. F., Vanier, N. L., Berrios, J de J., Pinto, V. Z., Wood, D., Williams, T., Pan, J., Elias, M. C. (2016). Polishing and parboiling effect on the nutritional and technological properties of pigmented rice. *Food Chemistry*, *191* 105–112.

Paiva, F. F., Vanier, N. L., Berrios, J. de J., Pan, J., Villanova, F. de A., Takeoka, G., Elias, M. C. (2014). Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. *Journal of Food Composition and Analysis*, *35*, 10–17.

Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. do A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, *30*, 681-690.

Pelissari, F. M., Andrede-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C. (2013). Optimization of process conditions for the production of films based on the flour plantain banana (*Musa paradisiaca*). *LWT-Food Science and Technology*, *52*, 1–11.

Péroval, C., Debeaufort, F., Despré, D., & Voilley, A. (2002). Edible arabinoxylan based films. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3977–3983.

REGULATION, C. No. 2568/91 of July 1991. On the characteristics of olive and olive pomace oils and on their analytical methods. Off. J. Eur. Commun L, v. 248, p. 29- 32.

Rogovina, S. Z., Alexanyan, C. V., & Prut, E. V. J. (2011). Biodegradable blends based of chitin and chotisan: production, structure and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, *121*, 1850–1859.

Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., Beta, T. (2014) . Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and Black rice kernels (*Oryza sativa L.*). *Journal of Cereal Science*, *59*, 211-218.

Sobral, P. J. do A. (2000). Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *35*, 1251-1259.

Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1996). Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi by antioxidants or a combination of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 119-125.

Talja, R. A., Helen, H.; Roos, Y. H., & Jouppila, K. (2008). Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, *71*, 269-276.

Tapia-Blácido, D. R., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2005). Development and characterization of biofilms based on amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*, *67*, 215-223.

Walter, M., Marchesan, E., Massoni, P. F. S., da Silva, L. P., Sartori, G. M. S., Ferreira, R. B. (2013). Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and Black pericarp colors and the effect of processing, *Food Research International*, *50*, 698–703.

Wong, C. W., Muhammad, S. K. S., Dzulkifly, M. H., Saari, N., & Ghazali, H. M., (2007). Enzymatic production of linear long-chain dextrin from sago (Metroxylon Sagu) starch. *Food Chemistry*, *100*, 774–780.

Zavareze, E. R., Pinto, V. Z., Klein, B., Halal, S. L. M., Elias, M. C., Prentice Hernández, C., Dias, A. R. G. (2012). Development of oxidised and heat moisture treated potato starch film. *Food Chemistry*, *132*, 344–350.

CAPÍTULO 7

DISCUSSÃO GERAL

O arroz representa uma das mais importantes culturas agrícolas do mundo e, a principal forma de comercialização desse grão é para o consumo como grão inteiro. Além disso, as variedades pigmentadas, como a preta e a vermelha, apesar de serem caracterizadas por sua riqueza nutricional, ainda são pouco difundidas, sendo consumidas em regiões restritas ou por nichos específicos do mercado. Para que esses grãos possam ser comercializados de forma polida, é necessário que os mesmos sejam submetidos a um processo denominado beneficiamento; o qual apresenta como inconveniente a geração de subprodutos, entre os quais grãos quebrados e farelo, que apresentam viabilidade de aplicação, conforme demonstrado ao longo deste trabalho, porém que atualmente são subutilizados. Em vista disso, o aproveitamento desses subprodutos, bem como a utilização desses grãos como matérias-primas para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, aumenta o espectro de aplicação desses alimentos, o que pode promover benefícios ao setor da rizicultura, decorrentes tanto da valorização comercial desses subprodutos, quanto do aumento da comercialização e, conseqüente, produção dos grãos.

Diversos fatores, entre os quais a localização, o tipo de solo, a época de colheita, as condições climáticas do plantio e as variedades genéticas de cultivares, podem ocasionar variação na composição centesimal, no tipo e no teor dos compostos bioativos. Com base nessas informações, avaliou-se como de suma importância, primeiramente, determinar a composição de compostos fenólicos em extratos de farelo de arroz vermelho e preto, bem como seu caráter antioxidante para, posteriormente viabilizar a aplicação desses grãos como matérias-primas para o desenvolvimento de um novo produto de grande interesse para a sociedade atual: a embalagem biodegradável.

A caracterização do perfil de compostos bioativos, bem como a avaliação do potencial antioxidante dos grãos de arroz vermelho e preto, evidenciou a presença de compostos fenólicos em ambas as amostras de farelo de arroz avaliadas, sendo os ácidos *p*-cumárico e ferúlico os compostos majoritários e, efeito antioxidante significativo de todas as amostras avaliadas. As diferenças encontradas para o efeito protetor em células SH-SY5Y insultadas com H₂O₂ (modelo utilizado para avaliar a atividade antioxidante das amostras) foram justificadas por algumas diferenças no perfil de identificação e quantificação de alguns compostos, entre os quais as antocianinas e o ácido protocatecuíco, encontrado apenas no

farelo de arroz preto e das proantocianidinas evidenciadas apenas no farelo de arroz vermelho. Outro fator positivo e muito importante apresentado foi que nenhum dos extratos apresentou citotoxicidade avaliada pelo ensaio SRB. Dessa forma, os resultados dessa investigação sugerem que os farelos de arroz vermelho e preto apresentam efeito neuroprotetor e não promovem alteração na morfologia e nem perda da viabilidade celular sendo, portanto, seguros para o consumo. Assim sugere-se sua potencialidade de utilização como fontes de compostos antioxidantes pela indústria alimentícia e farmacêutica.

Testes preliminares evidenciaram o arroz vermelho e seus subprodutos como materiais mais promissores para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis em comparação às amostras de arroz preto e seus subprodutos. Esses resultados foram justificados pela diferença evidenciada na composição centesimal desses grãos, uma vez que o arroz preto apresenta teores de proteínas, fibras e lipídeos muito superiores aos do arroz vermelho, o que resulta num teor inferior de carboidratos, conseqüentemente de amido.

O amido é considerado um excelente material formador de filmes biodegradáveis, por essa razão seu uso é amplamente difundido para esse fim, empregando-se amidos das mais diversas fontes alimentares. No entanto, a aplicação das farinhas para essa mesma finalidade tem despertado cada vez mais interesse devido ao fato de elas constituírem um material de baixo custo, de fácil obtenção e ainda apresentarem uma riqueza de compostos em sua composição, conforme foi demonstrado nas análises de determinação de compostos bioativos e da atividade antioxidante dos farelos de arroz vermelho e preto do presente estudo.

Dessa forma, atrelado ao fato do potencial apresentado pelo amido para formar filmes biodegradáveis, já descrito na literatura, e na completa definição dos compostos bioativos presentes no arroz vermelho e, sua conseqüente ação antioxidante, foram desenvolvidos filmes utilizando diferentes proporções de farinha e amido de arroz vermelho (10:0, 9:1, 7:3, 5:5 and 0:10, p/p).

Conforme esperado, os resultados demonstraram que a incorporação de amido à matriz filmogênica promoveu melhoria significativa nas propriedades de resistência à tração e na alongação dos filmes. Esse resultado foi atribuído ao maior conteúdo de amilose presente no amido em relação à farinha, (17 % e 7 %, respectivamente) o qual auxilia na formação de uma matriz mais coesa, em função de promover maior proximidade das cadeias de amido durante a secagem do filme. Da mesma forma, a adição de amido aos filmes também promoveu melhoria da propriedade de permeabilidade ao vapor de água ao reduzir seu coeficiente de difusão. Uma vez que a matriz polimérica dos filmes de farinha de arroz vermelho é constituída por diferentes moléculas, a falta de uma coesão total entre esses componentes

pode ocasionar o aparecimento de irregularidades. As análises de microscopia eletrônica confirmaram esse resultado, pois evidenciaram a presença de poros e fissuras no filme de farinha.

Corroborando com as análises antioxidantes realizadas na matéria-prima (farelo de arroz), a análise de capacidade de desativação do radical DPPH dos filmes biodegradáveis demonstrou que a farinha foi a responsável pela atividade antioxidante evidenciada, uma vez que os filmes que continham farinha na sua composição promoveram inativação superior a 90 % do radical DPPH, enquanto para o filme formulado apenas com amido esse resultado foi inferior a 10 %.

Dessa forma, com base nos resultados obtidos, e na análise do custo da produção desses filmes, o filme composto por farinha e amido, na proporção 9:1 (p/p), foi escolhido para ser aplicado como embalagem de óleo de girassol armazenado sob condições de oxidação acelerada, expostos à luz e aquecimento. Ao final dos 21 dias de experimento, evidenciou-se que a aplicação de embalagens tipo sachê para o armazenamento de óleo de girassol foi efetiva na prevenção da oxidação desse óleo, enquanto o óleo armazenado nos dois controles utilizados (garrafa plástica fechada e placa de Petri aberta), sofreram severa degradação, apresentando níveis de peróxidos muito acima do limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para óleos refinados (10 mEq/kg).

Assim sendo, a caracterização do perfil de compostos bioativos, bem como a avaliação do potencial antioxidante dos grãos de arroz vermelho e preto, reitera a necessidade do emprego desses grãos e de seus subprodutos na mais ampla gama de produtos alimentícios e no desenvolvimento de novos produtos. Além disso, a aplicação dessas matérias-primas para o objetivo proposto no presente estudo, não apenas propõe uma oportunidade de valorização econômica ao proporcionar o aproveitamento desses subprodutos, como também contribui para os avanços no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados evidenciados no decorrer deste trabalho sugerem que os compostos fenólicos presentes nos grãos de arroz vermelho e preto, já amplamente estudados na literatura por seu poder antioxidante frente diversos radicais livres, apresentam ação neuroprotetora frente à geração de espécies reativas induzidas pelo H₂O₂ em células SH-SY5Y, e não promovem citotoxicidade (método SRB e morfologia qualitativa).

Dessa forma, em razão do expressivo teor de compostos antioxidantes e da composição química dos grãos de arroz vermelho e preto e de seus subprodutos, sua aplicação como matéria-prima para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis foi comprovada, evidenciando-se elevado potencial de uso para esse fim. A eficácia da aplicação de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de arroz vermelho e seus subprodutos, na forma de sachês, na prevenção da oxidação de óleo de girassol durante seu armazenamento sob condições aceleradas de oxidação, comprova esse potencial.

Com base nas propriedades encontradas e no sucesso obtido perante a aplicação dos filmes biodegradáveis em óleo de girassol, é possível concluir que o uso do grão de arroz vermelho, bem como dos seus subprodutos, no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis atrela três fatores de suma importância para a sociedade: primeiramente amplia o espectro de comercialização desse alimento, que atualmente apresenta seu consumo restrito, em segundo lugar, agrega valor a subprodutos que hoje ainda são subutilizados e, também contribui para a diminuição do impacto ambiental provocado pelo uso indiscriminado de embalagens plásticas, oriundas de origem fonte petroquímica, cuja decomposição leva centenas de anos e acarreta graves danos ambientais.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1 Como perspectivas futuras podemos considerar

- Desenvolvimento de filmes a partir de arroz preto e seus subprodutos;
- Desenvolvimento de filmes de arroz vermelho e preto por métodos de passível aplicação em escala industrial, como extrusão ou termo compressão;
- Caracterização das propriedades dos amidos de quirera de arroz vermelho e preto obtidos por método alcalino;
- Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas produzidas a partir de amido de arroz vermelho e preto;
- Avaliação da estabilidade das microcápsulas obtidas a partir de amido de arroz vermelho e preto;
- Aplicação dos produtos em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AAL, E. S. M.; YOUNG, J. C.; RABALSKI, I. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 4696-4704, 2006.
- ADAMIEC, J. and MODRZEJEWSKA, Z. Some Structural Properties of Spray-Dried Chitosan Micro granules. **Drying Technology**, v. 23, p. 1601–1611, 2005.
- AHMAD, M., HANI, N. M., NIRMAL, N. P., FAZIAL, F. F., MOHTAR, N. F., ROMLI, S. R. Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. **Progress in Organic Coatings**, v. 84, p. 115–127, 2015.
- ALVES, G. H.; FERREIRA, C. D.; VIVIAN, P. G.; MONKS, J. L. F.; ELIAS, M. C.; VANIER, N. L.; DE OLIVEIRA, M. The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure. **Food Chemistry**, v. 208, p. 116–123, 2016.
- AMEH, M. O.; GERNAH, D. I. E. IGBABUL, B. D. Physico-Chemical and Sensory Evaluation of Wheat Bread Supplemented with Stabilized Undefined Rice Bran. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 43-48, 2013.
- ARAUJO-FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p. 839–848, 2010.
- ASHWAR, B. A.; SHAH, A.; GANI, A.; SHAH, U.; GANI, A.; WANI, I. A.; WANI, S. M.; MASOODI, F. A. Rice starch active packaging films loaded with antioxidants-development and characterization. **Starch/Stärke**, v. 67, p. 294–302, 2015.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC: Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, **2005**.
- ASTM. Designation D882-09: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual book of ASTM standards**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2009.
- AVÉROUS, L., FRINGANT, C., MORO, L. Plasticized starch–cellulose interactions in polysaccharides composites. **Polymer**, v. 42, p. 6565–6572, 2001.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BLÁCIDO, T.D.; SOBRAL, P. J. and MENEGALLI, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 215–223, 2005.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959, 37(8): 911-917.

- BOÊNO, Josianny A. **Caracterização da qualidade de grão de diferentes genótipos de arroz-vermelho (*Oryza sativa L.*)**. 2008. 121 p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola – Engenharia de Sistemas Agroindustriais, Anápolis, 2008.
- BOÊNO, J. A.; ASCHERI, D. P. R. E BASSINELLO, P. Z. Qualidade tecnológica de grãos de quatro genótipos de arroz-vermelho, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.7, p.718–723, 2011.
- BONIN, E. e SARTOR, S. **Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico e do farelo de arroz em linguça de frango**. 2011. 61 p. Trabalho de conclusão de curso. Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.
- BORDIGA, M.; ALONSO, S. G.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; GUTIERREZ, I. H.; ARLORIO, M. Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa L.* cultivars grown in Piedmont (Italy). **Food Research International**, v. 65, p. 282–290, 2014.
- BOURTOOM, T. e CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch/chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p. 1633-1641, 2008.
- BOURTOOM, T. e CHINNAN, M. S. Improvement of Water Barrier Property of Rice Starch_chitosan Composite Film Incorporated with Lipids. **Food Science and Technology International**, v.15, n. 2, p.149-158, 2008.
- BRÜCKNER, M., BADE, M. & KUNZ, B. Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 137–146, 2007.
- CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R de A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 34).
- CHEN, X.; LIU, J. H.; FENG, Z. C.; SHAO, Z. Z. Macroporous chitosan / carboxymethylcellulose blend membranes and their application for lysozyme adsorption. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 4, p. 1267-1274. 2005.
- CHEN,P. N.; KUO, W. H.; CHUI-LIANG CHIANG, C. L.; CHIOU, H. L.; HSIEH, Y. S.; CHUC, S. C. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. **Chemico-Biological Interactions**, v.163, p. 218–229, 2006.
- CHEN, X. Q.; NAGAO, N.; ITANI, T.; IRIFUNE, K. Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. **Food Chemistry**, v.135, p. 2783–2788, 2012.
- CHEN, A, M-H.; MCCLUNG, A. M; & BERGMAN, C. J. Concentrations of oligomers and polymers of proanthocyanidins in red and purple rice bran and their relationships to

total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity and whole grain color. **Food Chemistry**, v.208, p. 279–287, 2016.

CHINMA, C. E., ARIAHU, C. C., & ALAKALI, J. Moisture sorption and thermodynamic properties of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 2400–2407, 2013.

CHINPRAHAST, N.; TUNGSOMBOON, T.; & NAGAO. Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, 46–53, 2016.

CHOI, Y.; JEONG, H. S. and LEE, J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. **Food Chemistry**, v. 103, p.130–138, 2007.

CHUNG, H. S. & SHIN, J. C. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*). **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1670-1677, 2007.

COLÍN-CHÁVEZ, C.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; LIZARDI-MENDOZA, J.; BALANDRÁN-QUINTANA, R. R. Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylenebased Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. **Packaging Technology and Science**, v. 26, n. 5, p. 267-280, 2013.

COLLA, E., SOBRAL, P. J. A., MENEGALLI, F. C. *Amaranthus cruentus* flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6645-6653, 2006.

COLUSSI, R.; PINTO, V. Z.; HALAL, S. L. M. E.; VANIER, N. L.; VILLANOVA, F. A.; SILVA, R. M.; ZAVAREZE, E. R.; ALVARO DIAS, A. R. D. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 405 - 413, 2014.

CONSTANT, P. B. L. e STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Boletim SBCTA**, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2002.

COSTA, S. B.; DUARTE, C.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; SERRA, A. T.; MARTINS, M. M.; JANUÁRIO, M. I.N.; VICENTE, A. A.; DELGADILLO, I.; DUARTE, C.; COSTA, M. L. B. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 190–199, 2012.

COULTATE, T. P. Alimentos - A Química de seus Componentes. Porto alegre: Artmed. 2004.

DAS, D., DUTTA, H., MAHANTA, C.L., Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. **LWT - Food Science and Technology**, 2012.

DENG, G. F.; XU, X. R.; GUO, Y. J.; XIA, E. Q.; LI, S.; WU, S.; CHEN, F.; LING, W. H.; LI, H. B. Determination of antioxidant property and their lipophilic and hydrophilic phenolic contents in cereal grains. **Journal of functional foods**, v. 4, p. 906–914, 2012.

DESAI, K. G. H. and PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DIAS, A. B.; MULLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 213–219, 2010.

DIAS, A. B.; MULLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Mechanical and barrier properties of composite films based on rice flour and cellulose fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 535-542, 2011.

DORS, G. C.; CASTIGLIONE, G. L.; AUGUSTO-RUIZ, W. Utilização da farinha de arroz na elaboração de sobremesa. **Revista de Ciências Exatas e Engenharia**. Rio Grande, v. 16, n. 1, p. 63-67, 2006.

DOLE, P.; JOLY, C.; ESPUCHE, E.; ALRIC, I.; GONTARD, N. Gas transport properties of starch based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 335-343, 2004.

DRAGONE, S. M. **Aproveitamento integral de subprodutos da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007. 175p. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena 2007.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. El arroz y La nutrición humana. Año internacional Del arroz 2004 el arroz es vida. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2014.

FERNÁNDEZ-MORIANO, C. et al. Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 81, n. 2, p. 164-178, 2015.

FERREIRA, C. M.; PINHEIRO, B. S.; SOUSA, I. S. F.; MORAIS, O. P. Qualidade do arroz no Brasil: Evolução e Padronização. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 62 p.

FINOCCHIARO, F., FERRARI, B., & GIANINETTI, A. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. **Journal of Cereal Science**, 51, 28–34, 2010.

- FRANK, T.; REICHARDT, B.; SHU, Q.; ENGEL, K. H. Metabolite profiling of colored rice (*Oryza sativa* L.) grains. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 112-119, 2012.
- FREI, M., SIDDHURAJU & BECKER. Studies in vitro starch digestibility and glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402, 2003.
- FROES, Luciana O. Emprego da farinha de bandinha de feijão carioca extrusada na formulação de misturas para bolo sem glúten contendo farinha de quirera de arroz. 2012. 122 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012.
- FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of food Engineering**, v. 75, n. 1, p. 27 – 35, 2006.
- GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipidic hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 37-46, 2000.
- GARCIA-TEJEDA, V. Y.; SALINAS-MORENO, Y.; HERNANDEZ-MARTINEZ, A. R. Encapsulation of Purple Maize Anthocyanins in Phosphorylated Starch by Spray Drying. **Cereal Chemistry**, v. 93, p. 130-137, 2016.
- GIBBS, B. F., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.
- GOFFMAN, F. D.; BERGMAN, C. J. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.84, n.10, p.1235-1240, 2004.
- GOMES, A. S.; MAGALHÃES, A. M. **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2004. Disponível em:<
http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00073850.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- GOUIN, S., Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.
- GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y.; JARAMILLO-FLORES, E.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, J. F.; PÉREZ-ALONSO, C.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; ALAMILLA-BELTRÁN, L. Effects of Storage Temperature and Water Activity on the Degradation of Carotenoids Contained in Microencapsulated Chili Extract. **Drying Technology**, 32: 1435–1447, 2014
- GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 741-751, 1997.

- GÜLÇİN, I.; BERASHVILI, D.; GEPIREMEN, A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 287–293, 2005.
- GUNARATNE, A.; WU, K. LI, D.; BENTOTA, A.; CORKE, H.; CAI, Y. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1153–1161, 2013.
- GUTIÉRREZ, T. J.; TAPIA, M. S.; PÉREZ, E.; FAMÁ, L. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 211-217, 2015.
- GUTIÉRREZ, T. J.; Suniaga, J.; Monsalve, A.; García, N. L. Influence of beet flour on the relationship surface-properties of edible and intelligent films made from native and modified plantain flour. **Food Hydrocolloids**, v. 54, 234-244, 2016.
- GUZMÁN, I. V.; ORTIZ, L. M. and BUSTOS, F. M. Characterization of new sources of derivative starches as wall materials of essential oil by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 757-764, 2013.
- HEISLER, G. E. R.; ANTÔNIO, G. de A.; MOURA, R. S.; MENDONÇA, C. R. B.; GRANADA, G. G. Viabilidade da substituição da farinha de trigo pela farinha de arroz na merenda escolar. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 299-306, Araraquara, 2008.
- HOU, Z.; QIN, P.; ZHANG, Y.; CUI, S.; REN, G. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa L.*) and their degradation kinetics. **Food Research International**, v.50, p. 691–697, 2013.
- 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 18, p. 5271-5277, 2003.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- HUDSON, E. A.; DINH, P. A.; KOKUBUN, T.; SIMMONDS, M. S.; GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the grow of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention**, Philadelphia, v. 9, n. 11, p. 1163-1170. Nov, 2000.
- HYUN, J. W. E CHUNG, H. S. Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo Mediate Cytotoxicity against Human Monocytic Leukemia Cells by Arrest of G2/M Phase and Induction of Apoptosis . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 2213-2217, 2004.

ITANI, T.; TATEMOTO, H.; OKAMOTO, M.; FUJII, K.; MUTO, N. A comparative study on antioxidative activity and polyphenol content of colored kernel rice. **Journal of the Japan Society for Food and Technology**, Tokyo, v. 49, n. 8, 540-543, 2002.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**; Paquot, C., Hautfenne, A. Blackwell Scientific Publications: London, U.K., 1987.

JUN, H. I.; SONG, G. S.; YANG, E. I.; YOUN, Y.; KIM, Y. S. Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Pigmented Rice Bran Extracts. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, 2012.

JÚNIOR, M. S. S.; BASSINELLO, P. Z.; LACERDA, D. B. C. L.; KOAKUZU, S. N.; GEBIN, P. F. C.; JUNQUEIRA, T. L.; GOMES, V. A. Características físicas e tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz torrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 815-828, 2008.

JÚNIOR, M. S. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M.; GEBIN, P. F. C.; JUNQUEIRA, T. L. de.; GOMES, V. A.; LACERDA, D. B. C. L. Qualidade de pães com farelo de arroz torrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 636-641, Campinas, 2009.

KANEDA, I.; KUBO, F. and SAKURAI, H. Antioxidative compounds in the extract of black rice brans. **Journal of Health Science**, v. 52, n. 5, p. 495-511, 2006.

KANG, M. Y.; RICO, C. W.; LEE, S. C. *Varietal Difference in Physicochemical properties of Pigmented Rice Varieties*, **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v.14, n. 2, p. 111-118, 2011.

KANG, M. Y.; KIM, J. H.; RICO, C. W.; NAM, S. H. A comparative study on the physicochemical characteristics of black rice varieties. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p.1241–1254, 2011.

KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; SANTOS, P.V.; TADINI, C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1088-1094, 2010.

KENNEDY, G. and BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, v.80, n.4, p. 589-596, 2003.

KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N., CHIA, T.; BROUILLARD, R., Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933, 2003.

KONG, S.; KIM, D. J.; OH, S. K.; CHOI, I. S.; JEONG, H. S.; LEE, J. Black Rice Bran as an Ingredient in Noodles: Chemical and Functional Evaluation. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, 2012.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. In: GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. 672p.

LACERDA, Diracy B. C. L. **Estabilidade e qualidade do farelo de arroz sob diferentes tratamentos e aplicação do produto extrusado em biscoito**. 2008. 100 p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2008.

LACERDA, D. B. C. L.; JÚNIOR, M. S. S.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L. de; SILVA-LOBO, V. L.; CAMPOS, M. R. H.; SIQUEIRA, B. dos S. Qualidade de Farelos de Arroz Cru, Extrusado e Parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 521-530, Goiânia, 2010.

LAOHAKUNJIT, N and NOOMHORM, A. Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 348–356, 2004.

LAROTONDA, F.D.S., MATSUI, K.N., SOBRAL, P.J.A., LAURINDO, J.B. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 394–402, 2005.

LEE, H. H., KIM, H. Y.; KOH, H. J.; RYU, S. N. Varietal difference of chemical composition in pigmented rice varieties. **Korean Journal of Crop. Science**, v. 51, p. 113-118, 2006.

LI, Y.; SHOEMAKER, C. F.; MA, J. SHEN, X.; ZHONG, F. Paste viscosity of rice starches of different amylose content and carboxymethylcellulose formed by dry heating and the physical properties of their films. **Food Chemistry**, v.109, p.616–623, 2008.

LI, M.; LIU, P.; ZOU, W.; YU, L.; XIE, F.; PU, H.; LIU, H.; CHEN, L. Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylase contents. **Journal of Food Engineering**, v. 106. p. 95 -101, 2011.

LIMBERGER, V. M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T.; COMARELA, C. G.; PATIAS, L. D. Modificação Química e Física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 84-88, 2008.

LING, W. H.; WANG, L. L. e MA, J. Supplementation of the Black Rice Outer Layer Fraction to Rabbits Decreases Atherosclerotic Plaque Formation and Increases Antioxidant Status. **The Journal of Nutrition**, v.132, n.1, p. 20-26, 2002.

LIU, Z. H.; CHENG, F. M.; CHENG, W. D.; ZHANG, G. P. Positional variations in phytic acid and protein content within a panicle of japonica rice. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 297-303, 2005.

MALACRIDA, C. R. e MOTTA, S., Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MALI, S., SAKANAKA, L.S., YAMASHITA, F., GROSSMANN, M.V.E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 283–289, 2005.

- MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; SRIDHAR, R.; IMMANUEL, V. P. Development of model for mechanical properties of tapioca starch based edible films. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 159 – 168, 2013.
- MARQUES, L. G.; SILVEIRA, A. M.; FREIRE, J. T. Freeze-drying characteristics of tropical fruits. **Drying Technology**, v. 24, p. 457-463, 2006.
- MARTINEZ, C. Y. & CUEVAS, F. **Evaluación de la calidad culinaria y molinera Del arroz**. Guia del estudio. Cali: CIAT. 1989. 75 p.
- MARTINS, B. T. Tecnologia de secagem preservam as características dos alimentos. **Revista Engenharia de Alimentos**, v. 6, n. 30, p. 40-42, 2000.
- MATSUO, T., et al **Science of the rice plant. Vol. II – Physiology**. Tokyo; Food and Agriculture Policy Research Center, 1995.
- MENG, F.; WEY, Y.; YANG, X. Iron content and bioavailability in rice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 333-338, 2005.
- MEHYAR, G. F. e HAN, J. H. **Physical and Mechanical Properties of Highamylose Rice and Pea Starch Films as Affected by Relative Humidity and Plasticizer**. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 9, 2004.
- MIN, B.; GU, L.; MCCLUNG, A. M.; BERGMAN, C. J.; CHEN, M. H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa L.*) of different bran colours. **Food Chemistry**, v. 133, p. 715–722, 2012.
- MIN, B.; M. C. CLUNG, A. e CHEN, M. H. Effects of hydrothermal processes on antioxidants in brown, purple and red bran whole grain rice (*Oryza sativa L.*) **Food Chemistry**, v.159, p. 106–115, 2014.
- 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**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.
- MIRA, N. V. M., DE MASSARETTO, I. L., PASCUAL, C. S. C. I., LANFER-MARQUEZ, U. M. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa L.*) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 405–409, 2009.
- MONKS, J.F., VANIER, N.L., CASARIL, J., BERTO, R.M., OLIVEIRA, M., DE GOMES, C.B., CARVALHO, M.P., DE DIAS, A.R.G., Elias, M.C. Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, p. 73–79, 2013.
- MORIMITSU, Y.; KUBOTA, K.; TASHIRO, T.;HASHIZUME, E.; KAMIYA, T.; OSAWA, T. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. **International Congress Series**, v. 1245, p. 503-508, 2002.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82-87, 2008.

NABESHIMA, E. H. & EL-DASH, A. A. Modificação química da farinha de arroz como alternativa para o aproveitamento dos subprodutos de beneficiamento do arroz. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 1, p.107-120, 2004.

NACZK, M., e SHAHIDI, F. The effect of methanol–ammonia–water treatment on the content of phenolic acids of canola. **Food Chemistry**, v. 31, p. 159–164, 1989.

NAVES, M. M. V. Características químicas e nutricionais do arroz. **Boletim do CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 51-60, 2007.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Versão 2, 2^a Ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2006, 113p.

NASCIMENTO, T. A.; CALADO, V.; CARVALHO, C.W.P. Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. **Food Research International**, v.49, p. 588–595, 2012.

OKI, T.; MASUDA, M.; KOBAYASHI, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; SUDA, I.; SATO, T. Polymeric Procyanidins as Radical-Scavenging Components in Red-Hulled Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7524-7529, 2002.

OLIVEIRA, Isadora R. N. **Antocianinas extraídas de capim-gordura (*Melinis minutiflora*): Atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. Viçosa, 2011. 154 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade federal de Viçosa, 2011.

ONWUKA, G. I. “Food Analysis and Instrumentation,” Nphatali Press, Lagos, pp. 178-179, 2005.

ORTEGA-TORO, R. ;COLLAZO-BIGLIARDI, S.,TALENS, P.; CHIRALT, A. Influence of citric acid on the properties and stability of starch-polycaprolactone based films. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 42220, 2016.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

PAIVA, F. F.; VANIER, N. L.; BERRIOS J de J.; PAN J.; VILLANOVA, F de A.; TAKEOKA, G.; ELIAS, M. C. Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, 10–17, 2014.

- PAIVA, F. F.; VANIER, N. L.; BERRIOS J de J.; PINTO, V. Z.; WOODS, D.; WILLIAMS T.; PAN J.; ;; ELIAS, M. C. Polishing and parboiling effect on the nutritional and technological properties of pigmented rice. **Food Chemistry**, v. 191 105–112, 2016.
- PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H. ; DE MENEZES, E. W. BENVENUTTI, E. V. ; HERTZ, P. F. ; MATTE, C. R. ; TOSATI, J. V.; MONTEIRO, A. R.; RIOS, A. O. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755-762, 2015.
- PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 244 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- PATINDOL, J.; FLOWERS, A.; KUO, M. I.; WANG Y. J.; , GEALY, D. Comparison of Physicochemical Properties and Starch Structure of Red Rice and Cultivated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2712-2718, 2006.
- PEDRO, A. C.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v. 191, p. 12–20, 2016.
- PELISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. D. A; MENEGALLI, F. C. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 681-690, 2013.
- PENKUMSRI, N.; CHAIYASUT, C.; SAENJUM, C.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S.; SUWANNALERT, P.; SIRISATTHA, S.; SIVAMARUTHI, B. S. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. **Food Science and Technology**, v.35, n. 2, p. 331-338, 2015.
- PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CUTRIM, V. A.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre características agrônômicas, culinárias e nutricionais em variedades de arroz branco e vermelho. **Revista Caatinga**, v.22, n.1, p.243-248, 2009.
- PEREIRA-CARO, G.; WATANABE, S.; CROZIER, A.; FUJIMURA, T.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H. Phytochemical profile of a Japanese black–purple rice. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2821–2827, 2013.
- PETERSSON, M. and STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 123-132, 2005.
- PITCHAON, M.; & LADDAWAN, C. Effect of extraction on phenolic antioxidant of different thai rice (*Oryza sativa* l.) Genotypes. **International Journal of Food Properties**, v.17, p. 855–865, 2014.

PHAN, T. D.; DEBEAUFORT, F.; LUU, D.; VOILLEY, A. Functional Properties of Edible Agar-Based and Starch-Based Films for Food Quality Preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 973-981, 2005.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para a decisão nutricional**. 2 ed. São Paulo: Coronário, 2002.

PÍSECKY, J. Spray drying in the cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 531–536, 2005.

QIU, Y.; LIU, Q. and BETA, T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 121, p. 140–147, 2010.

RABELO, T. K.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; VASQUES, L. M.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; PASQUALI, M. A. B.; RYBARCZYK-FILHO, J. L.; ARAÚJO, A. A. S; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 304-314, 2012.

RINDLAV-WESTLING, A.; STADING, M. and GATENHOLM, P. Crystallinity and morphology in films of starch, amylose and amylopectin blends. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 84-91, 2003.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: application to carotenoids and structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v. 135, 2103 –2111, 2012.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, p. 704–711, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.49, p. 38S-47S, 1999.

RODRIGUEZ, H. M. P.; ACEVEDO, E. A.; SOTO, R. A. G; CARTER, E. J. V.; RAMIREZ, J. A. PEREZ, L. A. B. Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. **Starch/Starke**, v.65, p. 584–592, 2013.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1288-1294, 1990.

ROTTA, J.; OZÓRIO, R. Á.; KEHRWALD, A. M.; BARRA, G. M. de O.; AMBONI, R. D. de M. C. & BARRETO, P. L. M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan / hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 619-623, 2009.

- RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBAZI, R. C.; DA ROSA, C. G.; DA SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333, 2016.
- SAIRAM, S.; KRISHNA, A. G. G. and UROOJ, A. Physico-chemical characteristics of defatted rice bran and its utilization in a bakery product. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p.478–483, 2011.
- SANTOS, A. B. dos S.; TRINDADE, C. S. F. e GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.
- SCHROOYEN, P. M. M., MEER, R. V. D., KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.
- SELIGRA, P. G.; JARAMILLO, C. M.; FAMÁ, L.; GOYANES, S. Data of thermal degradation and dynamic mechanical properties of starch–glycerol based films with citric acid as crosslinking agent. **Data in Brief** 7, p. 1331–1334, 2016.
- SHAO, Y.F., JIN, L., ZHANG, G., LU, Y., SHEN, Y., BAO, J.S. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 122, p. 1005-1016, 2011.
- SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J. Beta, T. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa L.*). **Journal of Cereal Science**, v. 59, p.211-218, 2014. a
- SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J. BETA, T. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa L.*) grains at four stages of development after flowering. **Food Chemistry**, v. 143, p. 90–96, 2014. b
- SHARIF, M K; BUTT, M S; ANJUM, F M; KHAN, S H. Rice bran: A novel functional ingredient. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n.6, 2014.
- SCUSSEL, V. M., et al. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II**. 1 ed., Florianópolis: Editora ABMAG, 2008, 586 p.
- SHAHIDI, F., HAN, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1995.
- SHEN, Y.; JIN, L.; XIAO, P.; LU, Y.; BAO, J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 106–111, 2009.
- SHENG, D. Y. Rice-based ingredients in cereal and snacks. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 40, n. 8, p. 538-40, 1995.

SILVA, R. F. & ASCHERI, J. L. R. Extrusão de quirera de arroz para uso como ingrediente alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 190-199, jul./set. 2009.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 1 – 9, 2003.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SOMPONG, R.; SIEBENHANDL-EHN, S.; LINSBERGER-MARTIN^A, G.; BERGHOFER, E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. **Food Chemistry**, v. 124, p. 132–140, 2011.

SOUSA, G. M.; SOARES JÚNIOR, M. S. AND YAMASHITA, F. Active biodegradable films produced with blends of rice flour and poly(butylene adipate co-terephthalate): Effect of potassium sorbate on film characteristics. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 3153–3159, 2013.

SOUSA, G. M.; YAMASHITA, F. AND SOARES JÚNIOR, M. S. Application of biodegradable films made from rice flour, poly(butylene adipate-co-terephthalate), glycerol and potassium sorbate in the preservation of fresh food pastas. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, 39-45, 2016.

SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2/3, p. 102 – 108, 2007.

STORCK, C. R.; SILVA, L. P.; FAGUNDES, C. A. A. Categorizing Rice cultivars based on differences in chemical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 333-341, 2005.

STORCK, C. R.; SILVA, L. P.; COMARELLA, C. G. Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.16, n.3, p.259-264, 2005.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12 – 20, 2006.

TAPIA-BLÁCIDO, D.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 215–223, 2005.

TALJA, R. A., HELÉN, H., ROOS, Y. H., & JOUPPIA, K. (2008). Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 269-276.

TECHAWIPHARAT, J.; SUPHANTHARIKA, M.; BEMILLER, J. N. Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste and gel properties of rice starches. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 3, p. 417-426, 2008.

TEDRUS, G. A. S.; ORMENESE, R. C. S. C.; SPERANZA, S. M.; CHANG, Y. K.; BUSTOS, F. M. Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 20-25, 2001.

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

TRINDADE, M. A. and GROSSO, C. R. F. The stability of ascorbic acid microencapsulate d in granules of rice starch an d in gum Arabic. *Journal of microencapsulation*, v. 17, n. 2, p. 169 -176, 2000.

USP – Universidade de São Paulo. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. São Paulo, 2004, versão 4.1.

VENUPRASAD, M. P.; KUMAR, K. H.; KHANUM, F. Neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Ocimum sanctum* against H₂O₂ induced neuronal cell damage in SH-SY5Y cells via its antioxidative defence mechanism. *Neurochemistry Research*, v. 38, p. 2190-2200, 2013.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 198 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

VIEIRA, N.R.A. and RABELO, R.R. Qualidade tecnológica. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. (Ed). *A cultura do arroz no Brasil*. 2 ed. Ver. Ampl. Santo antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, cap. 23, p.869-900.

VIEIRA, C.R.; LOPES, C. O. Jr.; RAMOS, C. S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTR, M. P. C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 599-606, 2008.

VILLACREZ, J. L.; CARRIAZO, J. G.; & OSORIO, C. Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) Aqueous Extract by Spray Drying. *Food Bioprocess and Technology*, v. 7, p.1445–1456, 2014.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, v. 21, p. 185-195, 2005.

WALTER, Márcia. **Composição química e propriedades antioxidantes de grãos de arroz com pericarpo marrom-claro, vermelho e preto.** 2009. 121 p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Santa Maria, 2009.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p.1184-1192, 2008.

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

WANG, Q.; HAN, P.; ZHANG, M.; XIA, M.; ZHU, H.; MA, J.; HOU, M.; TANG, Z.; LING, W. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.16, p.:295-301, 2007.

WANG, L., DONG, Y., MEN, H., TONG, J., & ZHOU, J. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2013.

WOGGUM, T., SIRIVONGPAISAL, P., & WITTAYA, T. Characteristics and properties of hydroxypropylated rice starch based biodegradable films. **Foods Hydrocolloids**, v. 50, 54-64, 2015.

YANG, X.; YE, Z. Q.; SHI, H. CH.; ZHU, M. L.; GRAHAM, R. D. Genotypic differences in concentrations of iron, manganese, copper and zinc in polished Rice grains. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 7, p. 1453-1462, 1998.

YAWADIO, R.; TANIMORI, S.; MORITA, N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 161-1625, 2007.

ZAUPA, M.; CALANI, L.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F.; PELLEGRINI, N. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. **Food Chemistry**, v. 187, p 338–347, 2015.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L. E.; PEREIRA, J. M.; RADÜNZ, A. L.; ELIAS, M. C.; DIAS, A. R. G. Caracterização química e rendimento de extração de amido de arroz com diferentes teores de amilose. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, p. 24-30 jan., 2009.

ZHANG, M. W.; GUO, B. J.; PENG, Z. M. Genetic effects on Fe, Zn, Mn and P contents in *Indica* Black pericarp rice and their genetic correlations with grains characteristics. **Euphytica**, Amsterdam, v.135, n.3, p. 315-323, mar. 2004.

ZHANG, M., GUO, B.; ZHANG, R.; CHI, J.; WEI, Z.; XU, Z.; YAN, Z.; TANG, X. Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice. **Agricultural Science in China**, Amsterdam, v.5, n. 6, p. 431-440, jun. 2006.

ZHANG, M. W.; ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; LIU, R. H. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.58, p.7580–7587, 2010.

ZHANG, H.; SHAO, Y.; BAO, J.; BETA, T. Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. **Food Chemistry**, v. 172, p. 630–639, 2015.

ZHONG, F., LI, Y.; IBÁÑEZ, A. M.; OH, M. H.; MCKENZIE, K. S.; SHOEMAKER, C. The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.2, p.406-414, 2009.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**. Chester, v. 37, n. 8, p. 849-868, 2002.

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