UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

EFEITO DA GERMINAÇÃO E ALTA PRESSÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FUNCIONAIS E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE ARROZ NEGRO.

JOÃO PAULO DE MENEZES

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EFEITO DA GERMINAÇÃO E ALTA PRESSÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FUNCIONAIS E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE ARROZ NEGRO.

JOÃO PAULO DE MENEZES

Sob orientação da professora

Profa. Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa

e co-orientação do professoror

Dr. Amauri Rosenthal

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências,** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Outubro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M541e Menezes, João Paulo de, 1989-
EFEITO DA GERMINAÇÃO E ALTA PRESSÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FUNCIONAIS E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE ARROZ NEGRO. / João Paulo de Menezes. - Rio de Janeiro, 2019.
74 f.: il.

Orientadora: Maria Ivone Jacintho Barbosa.
Coorientador: Amauri Rosenthal.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2019.

1. Germinação. 2. Amido. 3. Antocianinas. 4. Lipase. I. Jacintho Barbosa, Maria Ivone , 1977-, orient. II. Rosenthal, Amauri, 1960-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. IV. Título.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

UFRRJ

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ATA Nº 464

Aos 30 dias do mês de outubro do ano de dois mil dezenove, às 9:00 h, na Embrapa Agroindústria de Alimentos, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado do(a) aluno(a) João Paulo de Menezes sob a orientação do(s) professor(es) Profa Dra Maria Ivone M J Barbosa (orientadora) e Dr. Amauri Rosenthal (co-orientador). A banca examinadora foi composta pelos professores/pesquisadores: Profa Dra Maria Ivone M J Barbosa, Dr. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho e Dra. Leda Maria Fortes Gottschalk. A dissertação intitulada: Alterações nas propriedades químicas, funcionais e na atividade da α-amilase em sementes de arroz negro germinadas e germinadas submetidas a tratamento de alta pressão e teve a duração de 34 minutos de apresentação. O (a) Candidato (a), após avaliado pela banca examinadora obteve o resultado:

( ) APROVADO (a), devendo o (a) Candidato (a) entregar a versão final em até 60 dias à sua coordenação de curso (de acordo com a Deliberação Nº 84 de 22 de agosto de 2017).

(X) APROVADO (a) COM RESSALVA, devendo o (a) Candidato (a) satisfazer, no prazo estipulado pela banca, as exigências constantes da Folha de Modificações de Dissertação de Mestrado anexa à presente ata. Após, entregar a versão final em até 60 dias à sua coordenação de curso (de acordo com a Deliberação Nº 84 de 22 de agosto de 2017).

( ) REPROVADO (a).

Seropédica 30 de outubro de 2019.

Leda Maria Fortes Gottschalk

Dr. LEDA MARIA FORTES GOTTSCHALK, UFRJ

Examinador Externo à Instituição

CARLOS WANDERLEI PILER DE CARVALHO, EMBRAPA

Examinador Interno

Dr. MARIA IVONE MARTINS JACINTHO BARBOSA, UFRRJ

Presidente

João Paulo de Menezes

JOÃO PAULO DE MENEZES

Mestrando

OBSERVAÇÃO: Esta ata é documento administrativo de uso exclusivo da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e NÃO pode ser utilizada a título de comprovação de Grau pelo candidato, que deve seguir o trâmite institucional para emissão de Diploma, Histórico Escolar e demais declarações.

Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.

(Autor desconhecido.)

RESUMO

MENEZES, João Paulo de. **Efeito da germinação e alta pressão nas propriedades físico-químicas, funcionais e na atividade enzimática em sementes de arroz negro.** 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal básico consumido por mais de 90% da população mundial e é isento de substâncias alergênicas, se tornando um ingrediente ideal para a formulação de diversos produtos alimentícios. Variedades pigmentadas, em especial o arroz negro tem se mostrado eficientes na prevenção de doenças coronárias não transmissíveis devido a sua composição em compostos funcionais em especial, compostos fenólicos. Nos últimos anos, tem se observado o uso de diferentes estratégias como a germinação associada ou não a alta pressão visando desenvolver novos ingredientes com elevado potencial de contribuição para a melhoria da qualidade da nutricional e da promoção da saúde, tornando-se popular entre os consumidores, em especial como diabéticos e hipertensos, por causa de seus compostos bioativos. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as alterações nas propriedades químicas, funcionais e atividade enzimática do arroz negro submetido a diferentes tempos de germinação e tratamento de alta pressão variando a intensidade da pressão e os tempos de pressurização aplicados. No primeiro capítulo foi verificado o efeito do tempo de germinação (0, 24 e 48 h) no teor de amido total, amido resistente, de amilose e amilopectina, de açúcares redutores das amostras germinadas. Além disso, também foi estudada a capacidade antihiperglicêmiante; o conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais; e a cor de todas as amostras de arroz germinadas nos diferentes tempos. Observou-se que a germinação entre os períodos de 0 h (amostra controle) e 48 h se mostrou uma técnica eficiente na ativação de α-amilase com atividades entre 272,53 U/mL para a amostra controle e atividade máxima de 366,89 no período de 24 h. A atividade de lipase variou entre 10,0 até 11,9 mg/g de 0 até 48 h, mudando o conteúdo de amido total de 66,6 para 60,7 % ao final das 48 h e açúcares redutores nas amostra controle, germinada por 24 e 48 h, 37,1, 34,4 e 56,4mg/ g respectivamente . Com relação aos compostos fenólicos totais houve redução com o aumento do tempo de germinação de 0,98 para 0,89 mg/g ao final das 48 h, as antocianinas monoméricas também diminuíram de 405 até 56 mg/100 g. Para a análise instrumental de cor houve aumento dos parâmetros L aproximando do branco, a* e b* e a percepção de cor (ΔE) foi perceptível de 2,29 para a amostra germinada por 24 h e 2,08 para 48h.

Na segunda parte do trabalho, foi estudado o efeito da germinação (0, 24 e 48 h) combinada ao tratamento de alta pressão (0.1, 300, 400 e 500 MPa) na atividade da lipase , no teor de amido total e de açúcares redutores , o conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e na cor de arroz negro integral. Observou-se que a germinação juntamente com a de alta pressão se mostrou eficiente na inativação de lipases chegando ao valor mínimo de 6,85 mg/ g para a amostra germinada por 24 h e pressurizada por 5 min a 500 MPa. Houve mudança no conteúdo de amido total havendo redução em relação a amostra controle com o percentual mínimo de 57,49 na amostra germinada por 48 h pressurizada por 5 min a 500 MPa. A germinação seguida de tratamento de alta pressão o maior conteúdo de compostos fenólicos totais, foi de 0,253 mg/ g para as amostras germinadas por 48 h por 3 min a 300 e 500 MPa, com relação aos teores de antocianinas monoméricas houve aumento significativo, onde a amostra que apresentou maior

concentração foi a germinada por 24 h por 5 min a 300 MPa de 919 mg/ 100 g. Conclui que de forma geral houve efeito do tempo de germinação na atividade enzimática, nas características químicas e na cor das amostras estudadas. Já para germinação combinada ao tratamento de alta pressão, verificou-se que as condições aplicadas não inativaram de forma eficaz a lípase, porém foram suficientes para modificar o conteúdo de amido total e açúcares redutores, de teores de compostos fenólicos, de antocianinas monomérica, e consequente, mudança nos parâmetros colorimétricos.

Palavra-chave: Germinação, Antocianinas, Amido.

ABSTRACT

MENEZES, João Paulo de. **Effect of germination and high pressure on physicochemical, functional and enzymatic activity in black rice seeds.** 2019 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

Rice (Oryza sativa L.) is a staple cereal consumed by more than 90% of the world population and it is free from allergenic substances, being an ideal ingredient for the formulation of various food products. Pigmented varieties, especially black rice, have been shown as an effective in preventing non-transmissible coronary diseases due to their composition in functional compounds, especially phenolic compounds. In recent years, the use of different strategies such as germination associated or not with high pressure has been observed in order to develop new ingredients with a high potential for contributing to the improvement of nutritional quality and health promotion, becoming popular with consumers, especially as diabetics and hypertensive patients, because of their bioactive compounds. The general objective of this work was to evaluate changes in the chemical, functional and enzymatic activity in black rice submitted to different germination times and high pressure treatment, varying the pressure intensity and the applied pressurization times. In the first chapter, the effect of germination time (0, 24 and 48 h) on the content of total starch, resistant starch, amylose and amylopectin, reducing sugars in the germinated samples was verified. In addition, antihyperglycemic capacity has also been studied; the content of total phenolic compounds, total monomeric anthocyanins; and the color of all rice samples germinated. It was observed that germination between the periods of 0 h (control sample) and 48 h proved to be an efficient technique in the activation of α-amylase with activities between 272.53 U / mL for the control sample and maximum activity of 366.89 within 24 h. Lipase activity ranged from 10.0 to 11.9 mg / g from 0 to 48 h, changing the total starch content from 66.6 to 60.7% at the end of 48 h and reducing sugars in the control samples, germinated by 24 and 48 h, 37.1, 34.4 and 56.4 mg / g respectively. Regarding total phenolic compounds, there was a reduction with the increase in germination time from 0.98 to 0.89 mg / g at the end of 48 h, monomeric anthocyanins also decreased from 405 to 56 mg / 100 g. For instrumental color analysis there was an increase in L parameters approaching white, a * and b* and the color perception (ΔE) was noticeable from 2.29 for the germinated sample for 24 h and 2.08 to 48 h.

In the second part of the work, the effect of germination (0, 24 and 48 h) combined with high pressure treatment (0.1, 300, 400 and 500 MPa) on lipase activity, total starch and reducing sugar content was studied, the content of total phenolic compounds, total monomeric anthocyanins and in the color of hole gran black rice. It was observed that the germination together with the high pressure was efficient in the inactivation of lipases reaching the minimum value of 6.85 mg / g for the sample germinated for 24 h and pressurized for 5 min at 500 MPa. There was a change in the total starch content with a reduction in relation to the control sample with the minimum percentage of 57.49 in the sample germinated for 48 h pressurized for 5 min at 500 MPa. The germination followed by high pressure treatment, the highest content of total phenolic compounds, was 0.253 mg / g for samples germinated for 48 h for 3 min at 300 and 500 MPa, with respect to the levels of monomeric anthocyanins there was a significant increase, where the sample with the highest concentration was germinated for 24 h for 5 min at 300 MPa of 919 mg / 100 g. It concludes that in general there was an

effect of germination time on enzyme activity, chemical characteristics and color of the studied samples. As for germination combined with high pressure treatment, it was found that the conditions applied did not effectively inactivate the lipase, but were sufficient to modify the content of total starch and reducing sugars, contents of phenolic compounds, monomeric anthocyanins, and consequent change in colorimetric parameters.

Keyword: Germination, Anthocyanins, Starch.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições e alterações observadas após a germinação de diferentes sementes (Adaptado GAN et al., 2016).

Tabela 2. Conteúdo de amido total, açúcares redutores, amilose, amilopectina e amido resistente em amostras de arroz negro.

Tabela 3. Conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em amostras de arroz negro germinado.

Tabela 4. Análise instrumental de cor em sementes de arroz negro germinado.

Tabela 5. Faixas de valores de ΔE e percepções humanas (Fonte: NDANGUI et al., 2014).

Tabela 6. Atividade da lipase em amostras de arroz negro submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo.

Tabela 7. Teor de amido total e açúcares redutores em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo.

Tabela 8. Conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo.

Tabela 09: Parâmetros colorimétricos L, a* e b* em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo.

Tabela 10: Parâmetros C* (saturação de cor) e ΔE (percepção da mudança de cor) em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Representação do corte longitudinal de um grão de arroz *in natura* (MASSARETO, 2013).

Figura 02. Arroz selvagem (Zizania sp.) geralmente confundido com o AN (B) (*Oryza sativa L.)* (*Fonte*: Autor.).

Figura 03. Esquema dos principais tipos de compostos fenólicos com ênfase nos flavanóis (Fonte: MASSARETTO 2013).

Figura 04. Estrutura básica das principais antocianinas não glicosiladas encontradas em alimentos (Fonte: MASSARETTO, 2013).

Figura 05. Variedades pigmentadas de arroz sem casca em diferentes tempos de germinação: (A) Arroz vermelho; (B) Arroz negro. (JOM, 2016)

Figura 06. Sementes de arroz negro sanitizadas prontas para germinação; (B) Sementes de arroz negro alocadas em bandejas de germinação entre camadas de algodão e *germiteste* embebidas na BOD.

Figura 07. Esquema das análises realizadas nas sementes de arroz negro controle e germinado (24 e 48 h).

Figura 08. Esquema das análises realizadas nas sementes de arroz negro germinado e pressurizado.

Figura 09. Curva de calibração elaborada com soluções padrão de glicose para a determinação de açúcares redutores.

Figura 10. Curva de calibração elaborada com soluções padrão ácido gálico para a determinação de compostos fenólicos totais.

Figura 11. Arroz negro com casca sob diferentes tempos de germinação: (B) Semente de arroz sem casaca e com o endosperma injuriado germinada por um período de 48 h (Fonte: Autor).

Figura 12. Atividade de lipase em sementes de arroz negro germinadas por 24 e 48 h e amostra controle.

Figura 13: Atividade de α-amilase em sementes de arroz negro germinadas por 24 e 48 h e amostra controle.

Figura 14: Diferentes tentativas de se pressurizar o arroz negro germinado com o rompimento da embalagem.(A) Arroz negro germinado com casca, (B) arroz negro germinado descascado (Fonte: Autor).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA 1
2. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo geral 3
2.2. Objetivos específicos 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
3.1. Arroz: Produção, consumo e composição: 3
3.2. Arroz negro 6
3.3. Propriedades funcionais do arroz negro 7
3.4. Germinação 9
3.5. Principais amilases com atuação durante o processo de germinação 13
3.6. Tratamento de alta pressão em cereais 14
4. MATERIAL E MÉTODOS 16
4.1. Processo de germinação 16
4.2. Tratamento de alta pressão 17
4.3. Atividade da lipase 18
4.4. Atividade Antihiperglicemiante 19
4.5. Determinação da atividade da α-amilase 19
4.6. Determinação de amido total 20
4.7. Determinação de açúcares redutores 20
4.8. Determinação de amilose e amilopectina 21
4.9. Determinação de amido resistente 21
4.10. Determinação de compostos fenólicos 22
4.10.1. Preparo dos extratos 22
4.10.2. Determinação de compostos fenólicos totais 22
4.10.3. Determinação de antocianinas monoméricas 23
4.11. Análises instrumental de cor 23
4.12. Análise Estatística 24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
5.1. Arroz negro germinado 24
5.1.1. Processo de germinação 24
5.1.2. Atividade da lipase em amostras 25
5.1.3. Atividade Antihiperglicemiante 26
5.1.4. Determinação da atividade da α-amilase 26
5.1.5. Determinação de amido total 27
5.1.6. Determinação de açúcares redutores 28
5.1.7. Determinação de amilose e amilopectina 29
5.1.8. Determinação de amido resistente nas amostras 29
5.1.9. Determinação de compostos fenólicos 30
5.1.10. Análises instrumental de cor 31
5.2. Arroz negro germinado e pressurizado 32
5.2.1. Tratamento de alta pressão 32
5.2.2. Atividade da lipase 33
5.2.3. Determinação de amido total 34
5.2.4. Determinação de açúcares redutores 35

5.2.5. Determinação de compostos fenólicos 35
5.2.6. Análises instrumental de cor 37
6. CONCLUSÃO GERAL 40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41
ANEXO A: Manual do kit megazyme de determinação do conteúdo de amilose e amilopectina 50
ANEXO B: Fluxograma da metodologia do processo de germinação utilizado no presente trabalho 60

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

O arroz (*Oryza sativa* L.), por ser uma cultura que se adapta às diferentes condições de solo e clima, é um cereal cultivado e consumido no mundo inteiro. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo desse cereal (FAO, 2015). O Brasil se destaca como o nono maior produtor mundial de arroz, e o maior produtor de fora do continente asiático. O Estado brasileiro do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil e na safra de 2014/15 concentrou 72% da produção nacional (IRGA, 2015).

O arroz é um alimento básico para três bilhões de pessoas, sendo responsável por fornecer cerca de 20% do suprimento calórico diário necessário. O consumo médio mundial de arroz é de 60 kg/pessoa/ano. Nos países em desenvolvimento, ele adquire importância ainda maior na alimentação da população. Na Ásia, onde cerca de 640 milhões de pessoas vivem em condições de pobreza, o consumo de arroz *per capita* costuma exceder 100 kg por ano, sendo que a metade das necessidades calóricas diárias é suprida por esse grão (IRRI, 2011).

Observa-se uma tendência no aumento do consumo de grãos integrais, impulsionada pela contínua divulgação de seus benefícios à saúde, associados principalmente, à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardíacas, câncer, diabetes e obesidade, visto que após suscetivas etapas de beneficiamento se perdem compostos com potencial funcionalidade que se encontram na casca do arroz (SLOAN, 2005). Além disso, os tipos pigmentados de arroz, embora sejam consumidos principalmente por nichos específicos de mercado, vêm ganhando espaço nas prateleiras dos mercados e na mesa do consumidor.

Algumas pesquisas colaboram para a divulgação de propriedades nutricionais diferenciadas dos tipos pigmentados de arroz em relação ao arroz integral branco, como o alto teor de proteínas e fibras. Além disso, a coloração do pericarpo dos grãos, uma das principais características que os diferencia visualmente, está vinculada ao acúmulo de compostos fenólicos, os quais têm sido relacionados a efeitos benéficos à saúde.

As propriedades mais conhecidas destes grãos pigmentados são o elevado teor de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante, capazes de fornecer proteção contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres (HU et al., 2003). O arroz negro é associado a uma notável atividade antioxidante *in vitro* em função da presença de compostos bioativos específicos, tais como antocianinas e proantocianidinas, ausentes nas variedades não pigmentadas (FINOCCHIARO et al., 2007; FINOCCHIARO; FERRARI; GIANINETTI, 2010). Além do maior esclarecimento dos consumidores acerca de produtos de qualidade e devido à necessidade de redução de aditivos na formulação dos alimentos, tem sido uma exigência por parte dos consumidores os quais buscam uma alimentação mais saudável, assim como atualmente há tendência crescente da indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos alimentícios com o rótulo mais limpo (*clean label*).

O arroz germinado tem ganhado atenção significativa durante a última década como uma ferramenta para melhorar a qualidade da alimentação e da promoção da saúde, tornando-se popular entre os consumidores preocupados com a saúde, como diabéticos e hipertensos, por causa de seus compostos bioativos. Além disso, a literatura relata que o arroz germinado possui potencial para ser usado como um ingrediente

nutritivo em muitos alimentos, incluindo biscoitos, massa fresca, pão, chá, leite e cereais matinais.

Os consumidores buscam cada vez mais alimentos que sejam seguros para o consumo, com uma vida útil longa, fácil preparo, sem aditivos, que sejam frescos, que possuam propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes a produtos frescos. No entanto, a produção deste tipo de alimentos requer mudanças nas formulações e processos, que podem aumentar os riscos associados ao seu consumo. Nesse cenário, processos físicos, em especial a aplicação de alta pressão vem ganhando destaque, uma vez que podem prolongar o prazo de validade do produto e promover a segurança sem alterações significativas nos atributos sensoriais e na qualidade nutricional.

Nesse sentido o arroz negro germinado se torna um ingrediente promissor para melhoria da qualidade nutricional, bem como, para a agregação de valor nas propriedades funcionais, sensoriais e tecnológicas aos produtos alimentícios possibilitando a aplicação deste em novas formulações como também na substituição de formulações já existentes no mercado, levando-se em consideração que no Brasil o arroz negro não possui aplicabilidade bem definida, apesar de todas as vantagens socioeconômicas e nutricionais que podem gerar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Nesse contexto, o objetivo geral do presente projeto avaliou as alterações nas propriedades químicas, funcionais e atividade enzimática do arroz negro submetido a diferentes tempos de germinação e tratamento de alta pressão variando a intensidade da pressão e os tempos de pressurização aplicados.

2.2. Objetivos específicos

-Avaliar a atividade da α-amilase e da lipase nos grãos de arroz negro submetidos a diferentes tempos de germinação (0, 24 e 48 h);
-Determinar o teor de amido total, amido resistente, de amilose e amilopectina e de açúcares redutores das amostras germinadas;
- Determinar a capacidade antihiperglicêmiante dos arrozes germinados;
-Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais; e a cor de todas as amostras de arroz germinadas;
-Avaliar o efeito do tempo de germinação (0, 24 e 48 h) e o tratamento de alta pressão (0.1, 300, 400 e 500 MPa);
-Avaliar a atividade da lipase em amostras germinadas e pressurizadas.
-Determinar o teor de amido total e de açúcares redutores das amostras germinadas e pressurizadas;
-Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais; e a cor de todas as amostras de arroz germinadas e pressurizadas;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Arroz: Produção, consumo e composição:

O arroz é o terceiro cereal mais consumido no mundo ficando atrás apenas do trigo e do milho, sendo cultivado em mais de cem países totalizando uma produção anual de cerca de 759,6 milhões de toneladas em 2017. O continente asiático é responsável por aproximadamente 90% desse total e a China é o maior produtor mundial contribuindo com 30% da produção mundial. Na América Latina, segundo maior continente produtor, 25 milhões de toneladas de arroz em casca são obtidas anualmente e o Brasil se destaca como o maior produtor fora do continente asiático, contando com uma área de plantio de aproximadamente 196 mil hectares e uma safra de 11,7 milhões de toneladas na safra de abril de 2018, o que o posiciona em 9° lugar no *ranking* mundial de produção (FAO, 2018; IBGE 2018).

A região brasileira que apresenta maior produção de arroz é a região sul tendo maior destaque os estados do Rio Grande do Sul totalizando uma produção de aproximadamente 8,2 milhões de toneladas e Santa Catarina com aproximadamente 1,1 milhões de toneladas (IBGE 2018).

Do ponto de vista da alimentação humana, duas espécies de arroz são consideradas importantes: *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* L., sendo que a primeira é cultivada em todo o mundo, enquanto que a última tem seu cultivo restrito a algumas regiões da África Ocidental; ambas pertencem ao gênero *Oryza* que inclui mais outras vinte espécies (IRRI, 2011).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil classifica-se como arroz integral ou esbramado o produto do qual somente a casca foi retirada já o arroz polido é o produto obtido pelo polimento do grão integral, em cujo processamento (descascamento e polimento) ocorre a retirada da casca, da película (aleurona) e do germe, tendo como resultado apenas o endosperma assim, a maior parte do óleo e das enzimas é retirada do grão, o que assim permite uma maior vida útil para o produto (BRASIL, 2009). Arrozes descascados, incluindo arroz branco integral, arroz vermelho, arroz roxo, e arroz negro são classificados como um grão integral (DING et al., 2018).

A Figura 01 representa o corte longitudinal de um grão de arroz *in natura*, conforme MASSARETO (2013).

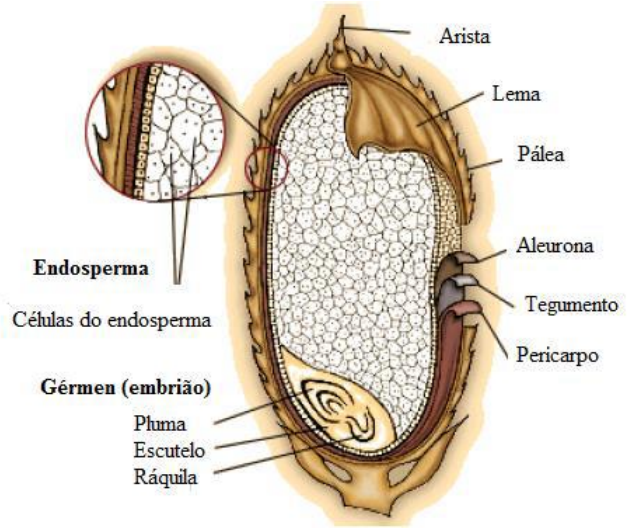


Figura 01: Representação do corte longitudinal de um grão de arroz *in natura* (MASSARETO, 2013).

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

A distribuição dos nutrientes no grão não ocorre de maneira uniforme, sendo que, no arroz integral, as camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídeos, fibras e vitaminas, enquanto o endosperma é fundamentalmente constituído de amido (WALTER; MARCHESAN; AVILA, 2008).

Recentemente, variedades pigmentadas de arroz negro, roxo e vermelho também vêm sendo estudadas como ingredientes na elaboração de alimentos processados tais como cereais infantis (HIRAWAN; DIEHL-JONES; BETA, 2011), macarrão (KONG et al., 2011) e iogurte (NONTASAN; MOONGNGARM; DEESEENTHUM, 2012) na busca pelo desenvolvimento de produtos com propriedades diferenciadas. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a estabilidade dos fitoquímicos e de suas propriedades antioxidantes frente ao processamento.

O arroz branco é composto majoritariamente de carboidratos sob a forma de amido, que corresponde a aproximadamente 84 g/ 100 g base seca, localizado majoritariamente no endosperma, podendo variar de acordo com o cultivar e variedade de arroz (USP, 2008). Além destes, existem pequenas quantidades de açúcares solúveis, localizados principalmente nas camadas externas do arroz integral (JULIANO, 2003). Embora possua uma produção e utilização comercial menor que de outros cereais, o amido de arroz tem algumas propriedades desejáveis como sabor suave, cor branca e de fácil digestibilidade. Além disso, seu pequeno tamanho de grânulo (aproximadamente 4 mm, dependendo da variedade do arroz) faz com que seja vantajosa sua utilização como um agente melhorador de textura em diversos de alimentos, como molhos por exemplo (CHAMPAGNE et al., 1997; JANG et al., 2016).

O teor protéico no arroz integral é de aproximadamente 8% em base seca, sendo que as variações acerca deste valor ocorrem principalmente em função do genótipo e de condições ambientais do cultivo, tais como a composição do solo e aplicação de fertilizantes, bem como fatores climáticos, especialmente a disponibilidade de radiação solar (ZHOU et al., 2002; JULIANO, 2003). Vale acrescentar que o arroz é isento de proteínas alergênicas, assim possibilitando a sua aplicação em alimentos destinados a pessoas com restrições alimentares.

O grão de arroz tem um conteúdo de lipídeos em base seca relativamente baixo, da ordem de 2,2 a 3,2% (TAIRA; ITANI, 1988). Os lipídeos estão distribuídos de forma heterogênea no grão e podem ser encontrados organizados em corpos lipídicos na camada de aleurona, no gérmen e no pericarpo ou associados a grânulos de amido (LUMEN; CHOW, 1995).

As vitaminas e os minerais estão presentes no arroz principalmente nas camadas externas do grão. Os minerais predominantes no arroz integral são o fósforo, o potássio e o magnésio e, em menor quantidade, são encontrados o ferro, o zinco, o cobre, o sódio, o cálcio e o manganês. O arroz contém principalmente vitaminas do complexo B e E presentes no farelo. As vitaminas A, D e C são encontradas em concentrações muito baixas (JULIANO, 2003).

As etapas de beneficiamento do arroz geram percentuais de subprodutos que variam de acordo com o tipo de beneficiamento o qual o arroz é submetido. Segundo VELASQUEZ e SANTOS (2012), no beneficiamento do arroz branco polido, gera-se cerca de 5 a 10% de farelo e em média 14% de grãos quebrados. Esses coprodutos apresentam baixo valor de mercado, além da pouca aceitação. Apenas uma pequena parcela deles e transformada em produtos de maior valor agregado, como farinha de arroz e seus derivados por exemplo (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006).

O arroz é o único cereal no qual seus grãos são avaliados antes do beneficiamento, depois do beneficiamento e também, após a cocção de acordo com seus atributos sensoriais de qualidade desejada. As características determinantes da qualidade do grão de arroz refletem-se diretamente no valor do produto no mercado e no grau de aceitação pelo consumidor. O termo “qualidade de grãos” depende da finalidade de consumo do produto, do grupo étnico envolvido, do tipo de processamento utilizado, entre outros fatores. Dessa forma, a definição de um arroz como sendo de boa ou má qualidade é grandemente influenciada pelas preferências e/ou necessidades do consumidor e, quando essas preferências diferem, o mesmo produto pode ser julgado como bom e adequado por um grupo e totalmente inadequado por outro (VIEIRA et al., 1999).

3.2. Arroz negro

Variedades de arroz pigmentadas são cultivados há muito tempo na Ásia. O arroz negro tem uma história excepcionalmente rica e uma de suas variedades é conhecida como "arroz imperial", que era restrita apenas ao consumo do imperador e outra como "arroz proibido" sendo consumida durante séculos reservadamente apenas pela realeza chinesa. As famílias reais e os reis costumavam comer esses tipos especiais de arroz para ter boa saúde e enfatizar sua riqueza (ITO; LACERDA, 2019).

A partir dos anos 80, a China intensificou o melhoramento do arroz negro e hoje existem mais de 50 variedades presentes na agricultura chinesa. Esta variedade de arroz se tornou um produto muito requisitado na alta gastronomia, devido à sua coloração lilás, que de tão forte possui tonalidade negra, leve aroma de castanha, pelo sabor e textura únicos. O arroz negro é geralmente confundido com o chamado arroz selvagem (Figura 02 A) que é outra gramínea (*Zizania* sp.) que embora possua coloração semelhante ao arroz negro, possui grãos mais alongados (BASSINELLO, 2008).

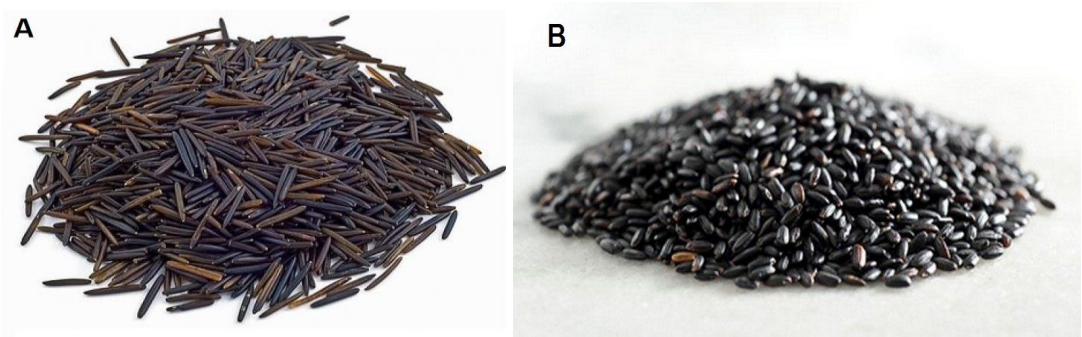


Figura 02: (A) Arroz selvagem (Zizania sp.) geralmente confundido com o AN (B) (*Oryza sativa L.)* (*Fonte*: Autor.)

No Brasil, a pesquisa a cerca do arroz negro iniciou-se em 1994, desenvolvida no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), órgão da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, para as características de solo e de clima paulistas, e batizado com o nome de IAC-600. Essa cultivar, IAC-600, é *Oryza sativa L.*(Figura 02 B) (BASSINELLO, 2008).

O arroz negro possui menor teor de lipídeos se comparado a outras variedades de arrozes integrais, por esta razão pode ser armazenado por um período maior visto que é menos susceptível a rancidez oxidativa. Em relação à absorção de água durante o cozimento, demanda uma maior quantidade de água. Acredita-se que devido à alta quantidade de fibras em sua composição, que acabam absorvendo mais água que os tipos tradicionais. Também foi relatado que o teor de proteínas é maior se comparado ao arroz branco (BASSINELLO, 2008).

O alto tempo de cozimento reduz a aceitação do arroz negro em relação a outras variedades as quais possuem menor tempo de cocção. Haja vista, que na sociedade moderna as pessoas não dispõe de tempo para preparação dos próprios alimentos (HOU et al., 2013).

Apesar de ainda ser pouco difundido no Brasil, o arroz negro possui grande o potencial de mercado além de vantagens nutricionais, funcionais e culinárias agregadas (PANG et al., 2018; ZIEGLER et al., 2018; SUMCZYNSKI et al., 2016).

3.3. Propriedades funcionais do arroz negro

O arroz integral é classificado como um alimento funcional particularmente potente, uma vez que contém grandes quantidades de compostos bioativos (ITO; LACERDA, 2019).

Vários estudos mostram que o alto consumo de arroz branco está associado a um risco significativamente maior de apresentar diabetes tipo 2 e também é relacionado ao aumento do risco de distúrbio da homeostase da glicose (SARTORELLI; CARDOSO, 2006) especialmente em populações de etnia asiática onde culturalmente o consumo de arroz branco é bem elevado.

Recentemente, os grãos integrais têm recebido atenção crescente especialmente devido à sua menor resposta em relação ao índice glicêmico em comparação com arroz polido. Isso poderia resultar em risco reduzido de diabetes tipo 2 e outras doenças metabólicas, incluindo dislipidemia, obesidade, hipertensão e hiperglicemia. (MENG et al., 2018).

Conforme mencionado anteriormente, além das variedades comuns de arroz branco, existem algumas especiais, como as pigmentadas (negro, vermelho e roxo). As cores nos arrozes pigmentados são devido à presença de pigmentos como os compostos fenólicos (PENGKUMSRI et al., 2015). Os compostos fenólicos fornecem inúmeros benefícios à saúde humana, incluindo propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, antialérgicas, anti-inflamatórias, hiperglicemiante e antihipertensiva (ZIEGLER et al. 2018).

O termo antioxidante refere-se a qualquer substância que quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato, impedindo ou diminuindo o excesso de radicais livres e o consequente dano celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários e constituem a maior classe de fitoquímicos do reino vegetal. Possuem funções essenciais na reprodução e no crescimento das plantas, agindo na defesa contra patógenos, parasitas e predadores, além de contribuir com a coloração das plantas. Em alimentos, alguns compostos fenólicos contribuem para coloração, acidez, adstringência, sabor, odor e estabilidade oxidativa atuando como agentes de proteção contra luz UV (MASSARETTO, 2013).

O teor total de compostos fenólicos é específico para cada cultivar de arroz pigmentado, em vez de uma propriedade geral de cada variedade. Estudos indicam que diferentes condições de cultivo, técnicas de cultivo, processo de maturação, armazenamento e processo de extração podem influenciar na composição de compostos fenólicos (PANG et al., 2018).

Os compostos fenólicos caracterizam-se por conter pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxila (-OH). São uma das principais substâncias com bioatividade presentes no arroz negro. Entre os compostos fenólicos, os flavonóides são uma grande subclasse, contendo dois ou mais anéis aromáticos, cada anel contendo pelo menos uma hidroxila e ligado a uma ponte de carbono. As antocianinas são os pigmentos predominantes no arroz negro (TANG; CAI; XU, 2016).

A Figura 03 apresenta um esquema com as classificações e subclassificações dos compostos fenólicos com ênfase nos flavonóis.

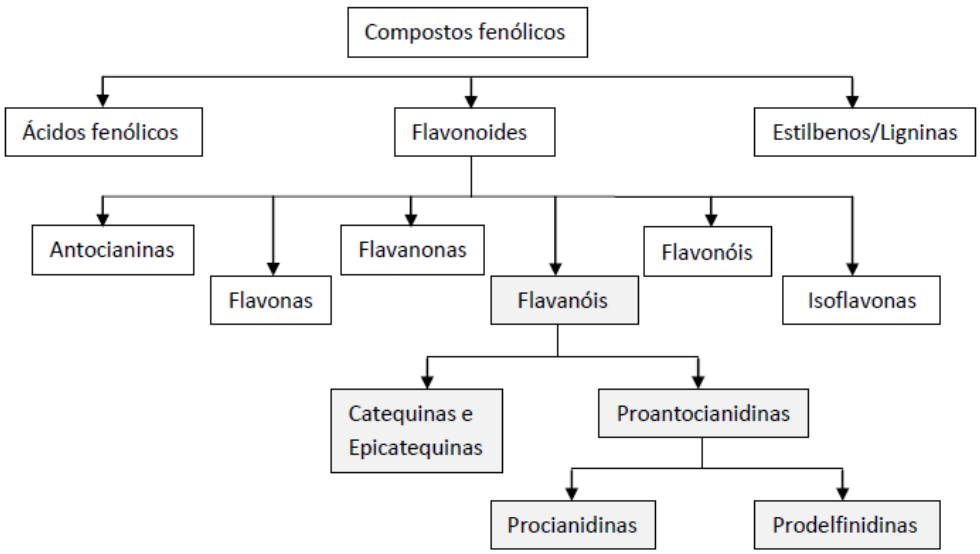


Figura 03: Esquema dos principais tipos de compostos fenólicos com ênfase nos flavanóis (Fonte: MASSARETTO 2013).

ESCRIBANO-BAILON, SANTOS-BUELGA e RIVAS-GONZALO, (2004); LEE, (2010); ABDBEL-AAL, YOUNG e RABALSKI (2006) verificaram que o arroz negro apresenta o maior teor de antocianinas totais (327,60 mg/100 g) entre todos os grãos coloridos até então estudados. Já SOMPONG et al., (2011) verificaram que o teor total de antocianinas no arroz negro variava em uma faixa de 109,50 a 256,60 mg/100 g.

A principal antocianina é a cianidina-3-glicosídeo, que representa aproximadamente 88% do conteúdo total de antocianinas presentes no arroz negro. Outras antocianinas como peonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e malvidina-3-glicosídeo foram identificadas em teores mais baixos (ITO; LACERDA, 2019).

A cianidina-3-glicosídeo demonstrou uma melhora da hipercolesterolemia e hiperlipidemia associada à redução das enzimas hepáticas lipogênicas em ratos hiperlipidêmicos. Estes pigmentos foram também associados com a redução dos níveis de colesterol no corpo humano, bem como efeitos inibitórios nas reações alérgicas (NORKAEW et al., 2019).

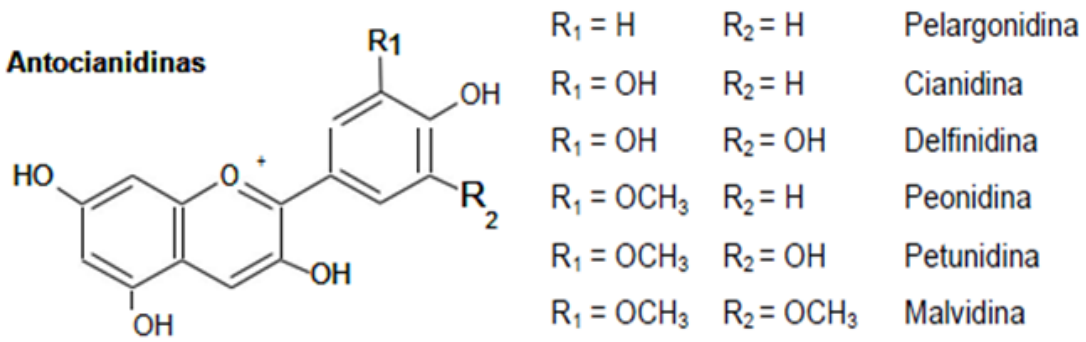


Figura 4: Estrutura básica das principais antocianinas não glicosiladas encontradas em alimentos (Fonte: MASSARETTO, 2013).

Há vários fatores que afetam a estabilidade das antocianinas como pH, luz, oxigênio, degradação enzimática, temperatura e interação com outros componentes dos

alimentos. Parâmetros os quais restringem a aplicação destas em alimentos, dificultando a garantia de sua integridade após o processamento (NONTASAN; MOONGNGARM; DEESEENTHUM, 2012).

HOU et al. (2013) estudaram a degradação de antocianinas isoladas de arroz negro sob diferentes temperaturas (80, 90 e 100 ºC) , faixas de pH (1,0 a 6,0) e concluíram que a reação de degradação das antocianinas segue cinética de primeira ordem de acordo com a temperatura e que, a estabilidade delas é maior em temperaturas menores, em pH mais baixo e com menor tempo de aquecimento.

A fraca estabilidade das antocianinas sob condições alcalinas moderadas, como as típicas do trato intestinal, também pode reduzir sua biodisponibilidade (NORKAEW et al., 2019). Vale também lembrar que compostos fenólicos são de alta polaridade e são de maneira geral solúveis em solventes de alta polaridade (TANG; CAI; XU, 2016)
Além dos compostos fenólicos, outros fitoquímicos estão presentes no arroz negro, como ɣ-orizanol e tocoferóis, também atuando contra danos oxidativos que ocorrem tanto nos alimentos que os contêm, como também no organismo humano, após a sua ingestão. É por esse motivo que, além de quantificar o teor dos fitoquímicos, é comum avaliar a capacidade e atividade antioxidante desses extratos pelos mais diversos métodos. Algumas dessas análises envolvem transferência de hidrogênio e outras, transferência de elétrons (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A vitamina E, também está presente na fração insaponificável dos lipídeos no arroz e os principais homólogos encontrados são α-, β-, γ- e δ-tocoferol e α-, β-, γ- e δ-tocotrienol. Os homólogos da vitamina E em cereais apresentam, além do efeito vitamínico, elevada atividade antioxidante podendo desempenhar papel importante na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, doenças cardiovasculares e aparecimento de tumores (TIWARI, 2009).

Há evidências de que a estabilidade de fitoquímicos bioativos no arroz pode ser afetada por alguns tratamentos pós-colheita, incluindo métodos de secagem e embalagem, temperatura de armazenamento e duração do armazenamento (NORKAEW et al., 2017). Logo, além do maior esclarecimento dos consumidores acerca de produtos de qualidade e devido à necessidade de redução de aditivos na formulação dos alimentos, tem sido uma exigência por parte dos consumidores os quais buscam uma alimentação mais saudável, assim como atualmente há a tendência crescente da indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos alimentícios com o rótulo mais limpo (*clean label*).

Neste sentido o arroz negro se torna um ingrediente promissor para melhoria da qualidade nutricional, bem como, para a agregação de valor nas propriedades funcionais, sensoriais e tecnológicas aos produtos alimentícios possibilitando a aplicação deste em novas formulações como também na substituição de formulações já existentes no mercado, levando-se em consideração que no Brasil o arroz negro não possui aplicabilidade alimentícia bem definida, apesar de todas as vantagens socioeconômicas e nutricionais que podem gerar.

3.4. Germinação

A germinação pode ser definida como um conjunto de etapas e processos associados à fase inicial do desenvolvimento de uma estrutura reprodutiva, seja uma semente, esporo ou gema. O desenvolvimento é o conjunto de modificações pelo qual a semente passa durante sua retenção na planta mãe. Nessa fase, o desenvolvimento da

semente é representado por variações quantitativas (mudanças na morfologia) e qualitativas (fisiológicas, metabólicas e bioquímicas). O desenvolvimento da semente é um evento bastante complexo, com múltiplos sistemas de regulação e controle (KERBAUY, 2008).

A otimização das condições de germinação para o arroz é importante para uma boa taxa de crescimento das sementes. Os fatores que influenciam a germinação incluem parâmetros intrínsecos, como cultivar ou variedade do arroz, além de fatores extrínsecos, como temperatura, umidade, composição atmosférica, exposição à luz, pH e condições de armazenamento da semente (CHO; LIM, 2016).

A germinação pode ser utilizada como uma técnica a qual necessita de simples instrumentação, visando a melhoria da qualidade das sementes, que vem ganhando crescente interesse devido aos benefícios para a saúde humana e mudanças tecnológicas, nutricionais, funcionais e sensoriais.

Durante a germinação do arroz, enzimas hidrolíticas que estão aprisionadas na camada da aleurona são ativadas, resultando na quebra de macromoléculas em compostos de menor massa molecular, como por exemplo o amido que é composto de amilose (fração linear) e amilopectina (fração ramificada) em maltose, dextrina e glicose por amilases endógenas, juntamente com a degradação de proteínas em peptídeos e aminoácidos (DING et al, 2018), além de promover o acúmulo de metabólitos secundários como ácido ascórbico e compostos fenólicos em outras sementes comestíveis (GAN et al. 2016). A atuação dessas enzimas tem por função suprir as necessidades energéticas durante o processo germinativo (PINKAEW; WANG; NAIVIKUL, 2017).

As mudanças metabólicas, fisiológica e morfológicas das sementes (Figura 05) requerem energia suficiente, que é fornecida principalmente da degradação do amido, componente majoritário do endosperma do arroz.

Figura 5*:* Variedades pigmentadas de arroz sem casca em diferentes tempos de germinação: (A) Arroz vermelho; (B) Arroz negro. (JOM, 2016)

Outros componentes das sementes podem ser modificados ou regenerados durante a germinação frente a etapas de anabolismo e catabolismo, indicados por níveis mais altos de aminoácidos livres e ácido γ-aminobutírico (GABA), redução ácidos graxos insaturados e ácido fítico, mudança na disponibilidade de sais minerais (P, Ca, Zn, Cu etc.) e conteúdo vitamínico em relação a semente não germinada (SHARMA; SAXENA; RIAR, 2017).

No intuito de melhorar características inferiores do arroz integral, a germinação é utilizada como um recurso que aumenta a taxa de absorção de água durante a cocção

conferindo uma textura mais macia, consequentemente aumentando a sua aceitabilidade (CHO; LIM, 2016).

Para que a germinação ocorra de forma adequada algumas estratégias são adotadas. Para inibir o crescimento de microrganismos, a sanitização é realizada antes da imersão das sementes. De acordo com a literatura, soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) com diferentes concentrações é o sanitizante mais utilizado, especialmente em solução de concentração 0,07% (m/v). Ao usar soluções de NaClO, a sanitização é geralmente realizada à temperatura ambiente em uma faixa entre 5-30 min, com a relação massa das semente (g) / volume de solução (mL) 1: 5 ou 1: 6. O uso de soluções de etanol a 70% (v/v) também são relatadas, com o tempo de imersão não superior a 3 min (GAN et al., 2016).

Poucos estudos investigaram as influências da sanitização nos resultados da germinação. Por outro lado, alguns estudos não realizaram a etapa de sanitização antes da embebição das sementes, provavelmente considerando os potenciais efeitos perigosos das soluções sanitizantes nas sementes e os riscos de segurança alimentar para o consumo. Portanto, a sanitização não é obrigatória para a germinação de sementes, e se a sanitização é necessária deve ser dependente da condição das sementes, da freqüência da mudança de água durante o processo de brotamento e do propósito da germinação (GAN et al., 2016).

Antes do brotamento, as sementes devem ser imersas em água para que ocorra a embebição. A temperatura de imersão, o tempo e a razão do peso da semente (g) / volume de água (mL) deve ser considerado para a imersão. Geralmente, as sementes podem ser embebidas à temperatura ambiente (cerca de 20-30 ºC), com o tempo de imersão geralmente de 24 h a cada troca de água (quando necessário), a razão do peso da semente (g) / volume de água (mL) geralmente é de 1: 5 ou 1: 20. Diferenças na condição de embebição das sementes devem estar associadas às características intrínsecas das diferentes sementes, como a capacidade de absorção de água, a espessura e o tamanho das sementes (GAN et al., 2016).

Antes a imersão, as sementes devem ser alocadas em germinadores ou incubadoras especiais para o brotamento. Existem vários fatores que devem ser considerado durante o brotamento, como a luz, temperatura, umidade, água adicionada ao sistema e tempo. O brotamento é usualmente realizado no escuro e a temperatura, geralmente mantida a 20-30 ºC. Durante a germinação, as sementes devem ser regadas todos os dias para manter a umidade relativamente alta no intuito de aumentar o vigor. A água deve ser substituída em um intervalo aproximado de 24h, para remover os metabólitos de sementes germinadas e evitar o crescimento microbiano. O tempo de germinação depende do propósito da germinação (GAN et al., 2016).

Na Tabela 1 estão apresentadas algumas condições de temperatura e tempo de germinação de algumas sementes e as principais mudanças observadas.

Tabela 1: Condições e alterações observadas após a germinação de diferentes sementes (Adaptado GAN et al., 2016):

Referência	Material germinado	Temperatura (ºC)	Tempo (horas)	Resultados Observados
VELUPPILLA et al., 2009	Arroz branco integral	30	120	-Aumento dos açúcares redutores a partir de 24 h; -Aumento de aminoácidos livres e proteínas solúveis após 120 h de germinação.
BARANZELLI et al., 2018	Farinha integral de trigo	20 e 30ºC alternados a cada intervalo de 12 h.	24, 47 e 72	-Redução da capacidade de gelatinização do amido; -Aumento do teor de GABA; -Redução da força da rede de glúten
CHO; LIM 2018	Arroz branco integral	30	96	-Aumento da atividade da fenil amônia liase; -Aumento de ácidos fenólicos na parte aérea e redução no caroço.
CHEN et al., 2015	Alpiste	20	120	-Aumento do conteúdo de fenólicos totais com consequente aumento da capacidade antioxidante.
KIM et al., 2012	Arroz branco integral	15	72	-Redução de ácido fítico, oléico e palmitico; -Aumento do teor de vitamina E, GABA, γ-orizanol e ácido linoléico
HEFNI; WITTHÖFT, 2012	Trigo e centeio	25	48, 72 e 96	-Aumento dos Teores de ácido fólico.
LI et al., 2017	Arroz branco integral, sorgo e mileto	30	48	-Redução dos grânulos de amido com o decorrer do tempo de germinação; -Redução do teor de amilose -Redução da cristalinidade do amido.

3.5. Principais amilases com atuação durante o processo de germinação

A germinação é um processo chave que envolve a ação de enzimas hidrolíticas no endosperma. Durante esse processo em sementes de cereais, essas enzimas desempenham um papel importante na hidrólise do amido em dextrinas ramificadas e lineares pela α-amilase que posteriormente ou simultaneamente são hidrolisadas em maltose e glicose pela ação combinada da β-amilase, α-glucosidase e pululanases fornecendo energia para as plantas. Portanto a atividade da α-amilase é um fator importante no controle da germinação de sementes (LI et al., 2019; KONDHARE et al., 2015).

Conforme mencionado anteriormente o amido é o componente majoritário do arroz presente no endosperma e é composto de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero de glicose linear com ligações α-1,4, enquanto a amilopectina é uma estrutura ramificada na qual cadeias lineares de resíduos de glicose α-1,4 estão interligadas por ligações α-1,6. As amilases que atuam durante a germinação clivam especificamente essas ligações glosídicas no amido (KALITA et al., 2016). A literatura reporta tentativas de prolongar a vida útil e melhorar a qualidade do arroz modificando o amido com a utilização de enzimas amilolíticas (LI et al., 2014).

A hidrólise do amido durante a germinação foi substancialmente estudada. A enzima α-amilase, que quebra aleatoriamente as ligações α-1,4 no amido, é considerada a principal enzima para a degradação do amido em sementes. No entanto, a principal fonte de energia no estágio inicial da germinação, a glicose, é produzida a partir da sacarose e a maltose provenientes da degradação do amido pela β-amilase, pois a α-amilase se torna mais ativa após o período de 24h. Além das duas principais enzimas, uma enzima desramificadora que digere a ligação α-1,6 do amido também se torna ativa durante a germinação (CHO; LIM, 2016).

As α-amilases correspondem a endoamilases que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando preferencialmente as ligações α-1,4 e liberando maltooligossacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes (ZHANG; HAN; XIAO 2017).

As β-amilases são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da cadeia de amilose ou amilopectina liberando maltose e não sendo capazes de hidrolisar ligações α-1,6 os substratos ramificados (KONDHARE et al., 2015).

As α-glucosidadeses são extensamente distribuídas entre os microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias. Estas enzimas são exohidrolases que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α-1,4 e/ou α-1,6 de oligossacarídeos de cadeia curta formados pela ação de outras amilases (LIU et al., 2017).

As pululanases são enzimas conhecidas por sua ação desramificante em especial no amido. Hidrolisam as ligações as ligações α-1,6 em amilopectina, dextrina, outros oligossacarídeos e no pululano, que consiste em polissacarídeo linear composto de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α-1,6 (WANG; NIE; XU, 2019).

3.6. Tratamento de alta pressão em cereais

Tradicionalmente o aumento do tempo de vida útil e a segurança dos alimentos foram obtidos através do processamento térmico. Os tratamentos térmicos de tempo reduzido e de temperatura elevada são os mais empregados na indústria alimentícia, entretanto podem reduzir a qualidade nutricional, funcional e provocar alterações sensoriais (PATRIGNANI; LANCIOTTI, 2016). Além do tratamento térmico, a refrigeração e o congelamento são utilizados no intuito de estender o tempo de vida útil e segurança de alimentos, porém podem levar a mudanças indesejáveis no valor nutricional, como a oxidação do colesterol, implicando também em altos custos de energia no processamento e armazenamento (OLIVEIRA et al., 2017).

Os consumidores buscam cada vez mais alimentos que sejam seguros para o consumo, com uma vida útil longa, fácil preparo, sem aditivos, sejam frescos, que possuam propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes a produtos frescos. No entanto, a produção deste tipo de alimentos requer mudanças nas formulações e processos, que podem aumentar os riscos associados ao seu consumo. Nesse cenário, processos físicos, como dióxido de carbono de fase densa, campo elétrico pulsado, processamento de ozônio, processamento de ultra-som, aplicação de alta pressão hidrostática, radiação, descarga de arco de alta voltagem, luz visível pulsada e campos magnéticos ganharam destaque, uma vez que podem prolongar o prazo de validade do produto e promover a segurança sem alterações significativas nos atributos sensoriais e na qualidade nutricional (OLIVEIRA et al., 2017).

A alta pressão somente, ou em ciclos de pressurização (FERREIRA et al., 2009) ou em combinação com tratamento térmico moderado também tem sido estudada para obter produtos de alta qualidade e estabilidade microbiológica (DELIZA et al., 2005).

O tratamento de alta pressão é conhecido como uma técnica não convencional de conservação pelo fato de ser uma nova tecnologia que não usa calor para preservar o alimento. Esta técnica de conservação de alimentos não térmica pode provocar um grande impacto na indústria de alimentos devido aos benefícios que pode trazer para os produtos como por exemplo a manutenção de cor, aroma, propriedades sensoriais entre outros de acordo com a intensidade da pressão aplicada (DELIZA et al., 2005).

O sistema de alta pressão consiste em uma câmara de pressão e um fluido de compressão (geralmente água ou solução alcoólica). Durante operação, o fluido de compressão é responsável pelo aumento da pressão sendo forçado para dentro da câmara onde se localiza a amostra. O volume de equipamentos de escala industrial podem alcançar capacidade máxima de 500 L, capaz de operar a pressões máximas entre 900 e 1200 MPa. Embora o mais comum na utilização seja em torno de 400 e 600 MPa, geralmente, a maioria dos alimentos pressurizados já estão embalados em material plástico flexível antes da execução do tratamento de alta pressão (OLIVEIRA et al., 2017).

Os primeiros estudos reportados de alta pressão foram iniciados em 1899 para a conservação do leite e em 1990 ocorreu o processamento de geleias e molhos em escala industrial no Japão e mais tarde em guacamole nos EUA. Em 2010, havia cerca de 150 plantas de alta pressão em todo o mundo, processando 250.000 toneladas de alimentos dentre eles, legumes, carne, peixe, sucos e outras bebidas, compreendendo 71 indústrias na América, 26 na Europa, 22 na Ásia e 5 na Oceania, movimentando US $ 10 bilhões em 2015, com projeções de aumento para US $ 54,7 bilhões em 2025 (OLIVEIRA et al., 2017).

O efeito do tratamento de alta pressão varia com a matriz e estrutura dos alimentos, tipos de nutrientes e parâmetros dinâmicos dentro da técnica (XIA et al., 2016). Os principais parâmetros que afetam o tratamento de ultra pressão hidrostática são classificados como parâmetros de processo (tais como pressão, temperatura, tempo, etc.) ou fatores ambientais (teor de umidade, pH, condições de crescimento de microrganismos, e produção de enzimas, por exemplo). Dentre os parâmetros citados, a pressão aplicada é o mais importante para aumentar biodisponibilidade a partir de células vegetais (KOSEKI; YAMAMOTO, 2006). Outras potenciais aplicações do tratamento de alta pressão incluem a melhoria das propriedades tecnológicas tais como textura, capacidade de formar emulsão em massas, ingredientes e alimentos já preparados.

O tratamento de alta pressão oferece homogeneidade da pressão aplicada em todos os pontos do produto, visto que a pressão aplicada é instantânea e uniformemente distribuída dentro da câmara de pressurização. Portanto, o tempo de processamento não é uma função do tamanho da amostra. Além disso, há economia de energia significativa em comparação as técnicas de conservação que se baseiam no aquecimento ou resfriamento, porque uma vez atingida a pressão desejada, ela pode ser mantida sem a necessidade de consumo de mais energia (ESTRADA-GIRO'N; SWANSON; BARBOSA-CA'NVAS, 2005).

Nos grãos integrais de arroz a presença de antioxidantes, incluindo homólogos da vitamina E e fenólicos, são abundantes. No entanto, a maioria destes compostos está presente em formas insolúveis, ligadas à parede celular. Logo não são considerados, visto que estes não são absorvidos amplamente pelo intestino. Em estudo prévio, a aplicação do tratamento de alta pressão em combinação com a germinação foi sugerida como um método eficiente para o aumento da disponibilidade dos compostos funcionais (KIM et al., 2016).

A alta pressão também é capaz de promover mudanças nas propriedades reológicas de biopolímeros, atuando como assistente de descongelamento, possibilitando redução no teor de sal e potencial alergênico dos alimentos, e como pré-processo para a extração de compostos bioativos (OLIVEIRA et al., 2017). A gelatinização do amido por exemplo, induzida com a alta prassão se assemelha com a gelatinização induzida pelo calor, com algumas diferenças. A gelatinização provocada pela alta pressão garante uma maior integridade ao grânulo, além de diminuir a lixiviação da amilose proporcionalmente ao aumento da pressão aplicada, favorecendo a formação de complexos com lipídios ou a interação com cadeias externas de amilopectina, fato que reduz o inchaço dos grânulos durante a aplicação da alta pressão. O amido do tipo A tende a ser mais sensível que os amidos do tipo B e C (LI; ZHU, 2018). Isso ocorre porque as interações químicas que estabilizam esses compostos se comportam diferentemente quando submetidos a alta pressão e enquanto as ligações covalentes não são afetadas pelo processo, outras interações (interações iônicas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, ligações de dissulfeto) podem ser mais facilmente afetadas (OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar da potencialidade de utilização do arroz negro germinado, ainda poucos são os estudos que avaliam sua funcionalidade, especialmente quando o mesmo é submetido ao tratamento de alta pressão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de arroz negro foram obtidas no Instituto de Agronomia de Campinas (IAC) – SP com registro nacional de sementes nº SP 02670/70, cultivar IAC 600, lote IA 41/2016 com taxa de germinação mínima de 80%.

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de fermentações e análise instrumental do Departamento de Tecnologia de Alimentos do campus de Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro.

4.1. Processo de germinação

A germinação foi realizada como descrito em XIA et al., (2016) com adaptações, alterando a temperatura de germinação e a umidade relativa.

As sementes de arroz com casca foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 10 min com o intuito de promover a sanitização para reduzir o crescimento de microrganismos deteriorantes durante a germinação, então foi retirado o excesso de solução de hipoclorito de sódio com auxilio de uma peneira e em seguida lavadas duas vezes com água destilada. Posteriormente, as sementes sanitizadas foram colocadas em bandeja plástica entre duas camadas de algodão previamente esterilizado e papel *germiteste* sendo embebidas com água destilada na proporção 5:2 m/v e mantidas a umidade relativa de 100% e temperatura de 37ºC em BOD (Solab SL-200/370) nos intervalos 0 (controle), 24 e 48 h. A cada intervalo de 24h foi adicionado mais água destilada na mesma proporção.

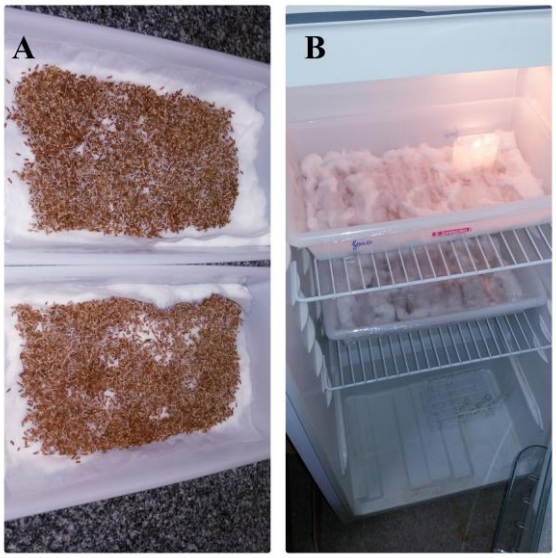


Figura 06: (A) Sementes de arroz negro sanitizadas prontas para germinação; (B) Sementes de arroz negro alocadas em bandejas de germinação entre camadas de algodão e *germiteste* embebidas na BOD.

Ao término de cada tempo de germinação, as sementes foram submetidas a secagem em secador com circulação de ar a 35 ºC por 72 h. Após a secagem, todas as amostras foram descascadas, obtendo-se as amostras controle, germinada por 24 h ($G_{24\ h}$) e 48 h (G_{48h}).

As amostras germinadas foram divididas em duas partes, a primeira foi analisada conforme Figura 07, enquanto a outra parte foi submetida ao tratamento de alta pressão conforme item 4.2.

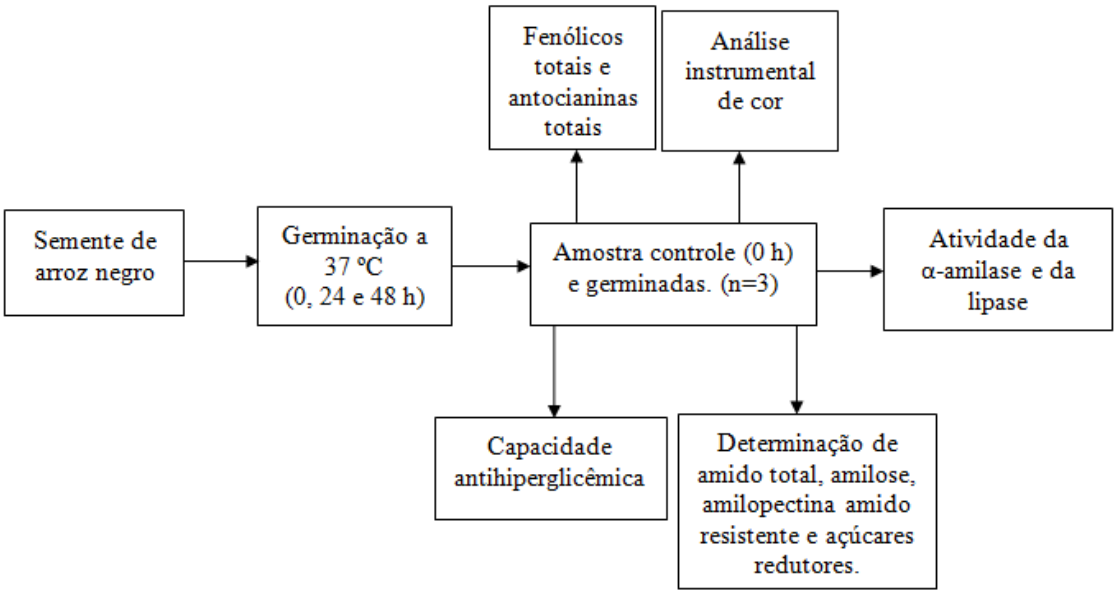


Figura 07: Esquema das análises realizadas nas sementes de arroz negro controle e germinado (24 e 48 h).

4.2. Tratamento de alta pressão

O tratamento de alta pressão foi realizado conforme descrito em BISCONSIN-JUNIOR et al., (2015). Todas as amostras germinadas foram submetidas ao tratamento de alta pressão. Para o processamento de alta pressão hidrostática, o arroz negro foi empacotado em embalagens de PET flexíveis e processados em um equipamento de alta pressão Stansted Food Lab 9000 (Stansted Fluid Power, S-FL-850-9-W, Reino Unido) em recipiente de pressão de 500 mL. O equipamento possui pressão máxima de operação de 900 MPa e uma temperatura estabilizando a temperatura a 45 ºC durante a compressão. A temperatura é controlada por circulação de líquido na parte exterior ligado a um sistema de aquecimento-resfriamento. O fluído de transferência de pressão utilizado foi o etanol 70% (v/v). A compressão foi de 7 $MPa.s^{-1}$ e o tempo de descompressão será menor que 10 s. Os tempos de compressão e descompressão não foram incluídos no delineamento experimental. Foram aplicadas as pressões de 0.1 (controle), 300; 400 e 500 MPa em cada amostra com dado tempo de germinação (24 e 48 h) foi pressurizada por 3 e 5 min.

Na Figura 08 estão apresentados os ensaios de germinação e de alta pressão e as análises físico-químicas, de atividade enzimática e instrumentais realizadas nas amostras de arroz negro germinado.

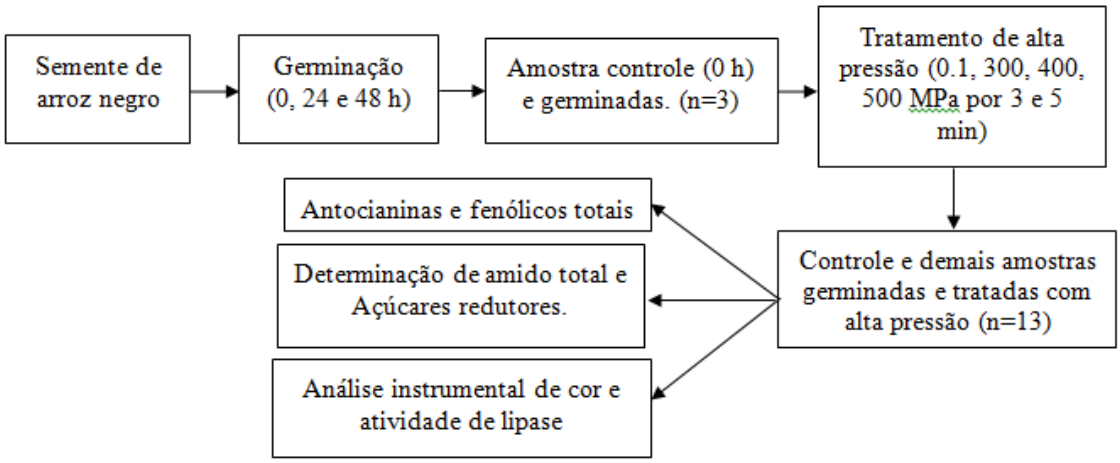


Figura 08: Esquema das análises realizadas nas sementes de arroz negro germinado e pressurizado.

Todas as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade e armazenadas em local isento de luz, umidade e temperatura ambiente até a realização das análises.

4.3. Atividade da lipase

A atividade lipase em amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado foi determinada segundo o método descrito por QIAN et al., (2014) com adaptações para o arroz negro, onde foram pesados 2,0 g de amostra em erlenmeyer e adicionados 1,0 mL de azeite de oliva extra virgem como substrato, 5,0 mL de água destilada, 5,0 mL de tampão fosfato pH 7,4, 3 gotas de tolueno. A mistura foi incubada a 30 °C durante 18 h. Após este período foram acrescentados 50,0 mL de solução etanol e éter de petróleo na proporção de 4:1, então o sistema permaneceu 5 min em repouso, logo foram extraídos 20,0 mL da fase líquida, em seguida foi realizada a titulação da amostra com NaOH 0,5M e seu resultado obtido através da equação 01 e expresso em mg/g. A porcentagem de estabilização da lipase foi calculada em relação à atividade da lipase na amostra controle e os resultados obtidos nos diferentes ensaios.

$$\textbf{Atividade da Lipase}\left({}^{mg}/_{g}\right) = \frac{(V1-V0)\,.c.40{,}01}{mx\,.\,(100-M)}\,.\left(\frac{60}{20}\right).\,100 \qquad \text{(Equação 01)}$$

Onde: **V1** = volume em mL de NaOH gasto na titulação da amostra, **V0** = volume em mL de NaOH gasto na prova em branco; **c** = concentração de NaOH em mol/L; **m** – massa da mostra de ANG em g; **M** = conteúdo de umidade da amostra em % (m/m); **40,01** = massa molecular do NaOH; **60** é o volume total em mL da reação enzimática e **20** é uma alíquota em mL retirada do volume total (60,0 ml) usado na titulação com a solução de NaOH.

4.4. Atividade Antihiperglicemiante

Avaliação da atividade inibidora de α-glucosidase em amostras de arroz negro germinado teve como base o método modificado (ADISAKWATTANA et al., 2012; LAVELLI et al., 2016). Sendo a atividade da α-glucosidase determinada espectrofotometricamente em tubo epperndorf contendo 4-nitrofenil- α-D-glucopiranosideo (pNPG) como substrato. α-glucosidase, amostras e pNPG foram preparados individualmente em tampão fosfato (pH 6,8). 100 µL de tampão fosfato (pH 6,8), foram misturados a cada tubo 100 µL de enzima solução (0,2 unidades/ mL) e 150 µL de cada amostra. A mistura foi incubada a 37 ° C por 20 min. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de substrato (2,5 mmol/ L). Após incubação a 37 °C por 20 min, 80 µL de solução de carbonato de sódio (0,2 mol/ L) foi adicionada a cada reação para extinguir a reação. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) foi quantificado usando expectrofotômetro em 405 nm. A percentagem de inibição foi calculada com a Equação 02.

$$\%\ \text{Inibição} = \left(1 - \frac{Abs\ amostra - Abs\ branco}{Abs\ controle}\right) \times 100$$

(Equação 02)

4.5. Determinação da atividade da α-amilase

Aproximadamente 1,0 g de amostra de arroz negro germinado foi misturada com 10 mL de gelo em solução de cloreto de cálcio 0,001 mol.L^{-1} e a mistura foi incubada a 4 °C durante um período de 18 h para extração enzimática. Esta mistura foi centrifugada a 300 rpm durante 20 min numa centrífuga e o sobrenadante obtido então utilizado como extrato enzimático para análise de α-amilase.

A atividade de α-amilase foi determinada medindo a quantidade de açúcares redutores produzido por hidrólise de amido utilizando o método Nelson-Somogyi (1951) anteriormente descrito e utilizando a mesma curva de calibração. O extrato de enzima foi incubado previamente a 70 ºC por 15 min com intuito de inativar a beta amilase, então 1,0 mL desse extrato, a solução padrão de amido a 1% (m/v) foram misturados em proporção 1:1 e incubadas a 27 °C durante 15 min e então aquecidos em água fervente por 5 min para cessar a hidrólise do amido.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de micromol de glicose liberado por minuto sob as condições de teste e calculado utilizando a Equação 03 dada por ASANTE et al. (2013). A atividade foi expressa em (U/ mL) e o tempo em minuto.

$$\boldsymbol{Atv}\left({}^{U}/_{mL}\right) = \frac{G\ .10^{3}}{(M\ .T).2}$$

(Equação 03)

Onde : **Atv** = Atividade da α-amilase
G = mg.mL^{-1} em termos de glicose
M = Massa molecular da glicose
T = Tempo (min.)

4.6. Determinação de amido total

O percentual de amido total nas amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado foi determinado por hidrólise ácida, seguida da quantificação proposta por LANE e ENYON adaptada (ASEAN, Manual of Food Analysis, 2011). Foram pesados 2,0 g de amostra previamente trituradas em um erlenmeyer de 500 mL, em seguida adicionado 200 mL de água destilada, 1,0 mL de NaOH a 10% m/v e submetidos à autoclave a 121 ºC por 1 h. Em seguida as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Ainda neste mesmo erlenmeyer foi adicionado 10,0 mL de HCl concentrado e aquecido novamente em autoclave (1atm) por mais 30 min. Quando resfriada as amostras foram neutralizadas com solução NaOH 40%. Deixada em repouso por 2 h para a sedimentação de colóides, filtradas e transferidas para um balão volumétrico de 500 mL e avolumadas com água destilada. O material avolumado foi utilizado como titulante. Em um erlenmeyer foi adicionado 10 mL da solução de Fehling sendo 5,0 mL da solução A (sulfato de cobre pentahidratado diluído em água destilada) e 5,0 da solução B (tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio dissolvido em água destilada), 40 mL de água destilada e pérolas de vidro, sendo aquecidos até a ebulição, então adicionou-se 3 gotas de azul de metileno a 1%. O material foi mantido em ebulição até a viragem da cor para "vermelho tijolo". O percentual de amido total foi calculado com a Equação 04.

$$\mathbf{A}(\%) = \frac{FC.500.100.0,9}{V.P}$$

(Equação 04)

Onde: **A(%)** = Amido total em %
FC = gramas de glicose gasta no padrão;
V = n° de ml da solução da amostra gasto na titulação;
P = peso da amostra em gramas;
0,9= Valor atribuído quando amostra apresenta em geral elevado teor de amido.

4.7. Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados nas amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado. Os açúcares redutores foram extraídos das sementes de arroz negro agitando 2,0 g de amostra em 100 mL de água destilada, posteriormente filtrado e então avolumado em balão volumétrico de 100 mL. A determinação desses açúcares foi realizada utilizando o método Nelson-Somogyi (SOMOGYI 1951).

Em um tubo Folin-Wu, foi colocado 0,5 mL da solução a ser analisada e 0,5 mL de uma mistura das soluções A (2 % m/v de bicarbonato de sódio, 1,5 % m/v de tartarato duplo de sódio e potássio, 3 % m/v de carbonato de sódio anidro e 14,25 % m/v de sulfato de sódio anidro) e B (2 % m/v de sulfato de cobre penta-hidratado e 10 % m/v de sulfato de sódio anidro) na proporção de 4:1. Esta mistura foi levada em banho-maria a 100 ºC e após 10 min de reação esfriada rapidamente em água corrente. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução C (5 % m/v de molibdato de amônio, 5 % v/v de ácido sulfúrico concentrado e 0,6 % m/v de arseniato de sódio hepta-hidratado, previamente preparada e mantida a 37 °C por 2 dias) e agitou até cessar o desprendimento de gás. Completou-se gradativamente sob agitação o tubo em vortex até o menisco de 12,5 mL do tubo. Por fim, procedeu-se leitura em espectrofotômetro a 540

nm, zerando o equipamento com o branco da reação. O branco da reação consistiu em todas as etapas acima descritas, porém no lugar da amostra a ser analisada, colocou-se 0,5 mL de água destilada. Uma curva de calibração (Figura 09) foi elaborada por meio de regressão linear utilizando-se solução padrão de glicose em diferentes concentrações.

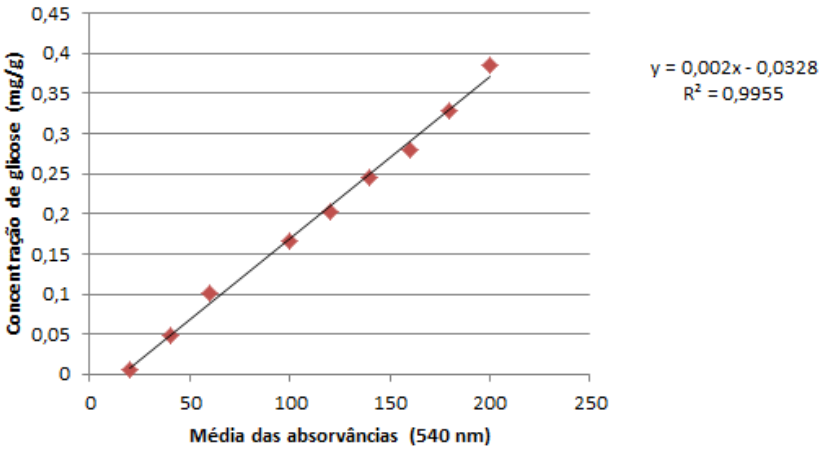


Figura 09: Curva de calibração elaborada com soluções padrão de glicose para a determinação de açúcares redutores.

4.8. Determinação de amilose e amilopectina

O teor de amilose e amilopectina do arroz negro germinado foi determinado pelo kit Megazyme Amilopectim Assay (Megazyme Intl. Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) de acordo com o método aprovado 79-13 (AACC, 2000). As determinações foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em %.

O manual do fabricante detalhando a metodologia se encontra na sessão de anexos.

4.9. Determinação de amido resistente

O amido resistente das amostras de arroz negro germinado foi determinado de acordo com KOAKUZU et al., (2015). O arroz negro germinado foi previamente moído e pesado 100 mg (±5,0) em tubo para centrífuga de 50,0 mL. Então foi adicionado 4,0 mL de solução de α-amilase pancreática (10,0 mg/mL) contendo amiloglicosidase (3 $U.mL^{-1}$), recém-preparada. Os tubos foram vedados com parafilme e incubados em banho-maria a 37 ºC e 100 rpm, por 16 h. Ao término deste tempo, adicionou-se 4,0 mL de álcool etílico e agitou-se vigorosamente por 15 seg em vórtex, seguido de centrifugação a 3.000 x *g* por 10 min, retirou-se o sobrenadante, resuspendeu-se o precipitado em 8,0 mL de etanol 50% sob agitação. Novamente os tubos foram centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante removido. A lavagem em etanol 50% e a centrifugação foi repetida e os tubos foram levados a capela de exaustão para evaporar o álcool remanescente. Após a evaporação do etanol cada tubo recebeu uma barra magnética e foram alocados em banho de gelo sobre um agitador magnético. Em seguida, foi acrescentado 2,0 mL de hidróxido de potássio 2,0 $mol.L^{-1}$ aos tubos e mantidos sob agitação em banho por 20 min. Nos tubos mantidos sob agitação, foi acrescentado 8,0 mL de tampão acetato de sódio 1,2 $mol.L^{-1}$ (pH=3,8), 100µL de amiloglucosidase concentrada (3.300 $U.mL^{-1}$) e incubado em banho-maria a 50 ºC por 30 min. O volume final de cada tubo foi medido com o auxílio de uma pipeta graduada de vidro de 20,0 mL, retornando ao tudo e centrifugado novamente a 3.000 x *g* por 10

min. Foi pipetado 100 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio, um branco foi preparado com tampão de acetato de sódio 0,1 mol.L^{-1} (pH= 4,5) e um tubo foi pipetado 100 µL de solução padrão de D-glicose. Adicionou-se 3,0 mL de reagente GOPOD (Glucose oxidase, peroxidase e 4-aminoantipyrine) em todos os tubos e agitou-se em vortex por 5 segundos. Ao término da agitação os tubos foram incubados em banho-maria a 50ºC por 20 minutos e posteriormente a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 510 nm.

O amido resistente foi calculado em (mg/100g) a partir da Equação a 05.

$$\mathbf{AR}\left({}^{mg}/_{100g}\right) = \text{Abs}\,.\,\text{F}\,.\left(\frac{V1}{Ps}\right).\,0{,}90$$

(Equação 05)

Onde:

AR: Amido resistente (mg/100g)

Abs: Absorvância da amostra;

V1: Volume final da amostra no tubo;

Ps: Peso seco;

F: Fator de conversão da absorvância do padrão da glicose (F= 100/(Média das absorvâncias da glicose).

4.10. Determinação de compostos fenólicos

4.10.1. Preparo dos extratos

O preparo dos extratos das amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado foi realizado conforme descrito na metodologia de PENGKUMSRI et al., (2015) com adaptações. Os extratos alcoólicos foram preparados pesando-se 2,0 g de arroz negro previamente macerado alocados em erlenmeyer de 250 mL embalado em papel laminado e adicionando-se 100 mL de etanol 80% permanecendo em mesa agitadora por 2 h a 350 rpm e posteriormente filtrados. Os extratos preparados foram usados na determinação de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas.

4.10.2. Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos das amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado foi obtido de acordo com SWAIN e HILLIS (1959), com modificações. Foram misturados em um tubo 1,0 mL de extrato, 4,0 mL de água destilada e 1,0 mL de reagente *Folin Ciocalteau* 0,25 N e homogeneizados em vórtex. A mistura reagiu por 3 minutos e 1,5 mL de Na_2CO_3 10% foram adicionados, sendo seguido de homogeneização. A mistura foi armazenada à temperatura ambiente, no escuro, durante 2 horas, e a leitura das amostras foi feita a 725 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg/ g) de amostra seca), utilizando uma curva de calibração cujo padrão foi o ácido gálico (Figura 10), nas concentrações de 0 a 5 mg/ mL.

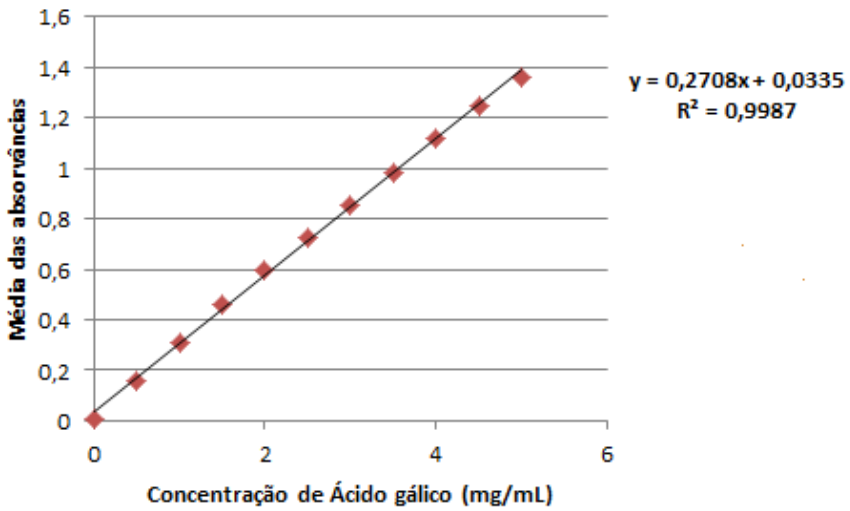


Figura 10: Curva de calibração elaborada com soluções padrão ácido gálico para a determinação de compostos fenólicos totais.

4.10.3. Determinação de antocianinas monoméricas

A metodologia utilizada na determinação de antocianinas totais dos extratos de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado estudados foi a diferença de pH, de acordo com LEE et al. (2005). Foram preparadas duas soluções tampão, uma de cloreto de potássio/ácido clorídrico de pH 1,0 (0,025 M), outra de acetato de sódio/ácido clorídrico de pH 4,5 (0,4 M). Foram feitas leituras a 520 nm e 700 nm, tanto no tampão de pH 1,0 quanto de pH 4,5. A leitura a 700 nm foi feita com intuito de descontar a turbidez da amostra. O valor da absorbância final foi determinado a partir da Equação 06.

$$\mathbf{A} = (A_{520nm}-A_{700nm})\ pH\ 1{,}0 - (A_{520nm}-A_{700nm})\ pH\ 4{,}5 \qquad \text{(Equação 06)}$$

A concentração total das antocianinas monoméricas foi expressa em cianidina-3-glucosídeo, segundo a Equação 07.

$$\boldsymbol{AM}\left({}^{mg}/_{100g}\right) = A\,.PM.FD.\left(\frac{100}{\varepsilon - 1}\right) \qquad \text{(Equação 07)}$$

Onde: **AM** = Antocianinas monoméricas;
A = Absorvância;
PM = Peso molecular da cianidina-3-glucosídeo;
FD = Fator de diluição
ε = Coeficiente de absortividade molar.

4.11. Análises instrumental de cor

Os parâmetros de cor instrumental das amostras de arroz negro germinado e arroz negro germinado e pressurizado foram determinados de acordo com a metodologia proposta por NDANGUI et al. (2014). A determinação da cor foi realizada com a utilização de um colorímetro (MiniScan EZ, HunterLab, Washington DC, USA)

de acordo com as coordenadas L*, a*, b*. Onde L* representa o parâmetro de luminosidade da amostra, variando do preto (0) ao branco (100). A coordenada a* representa a variação da cor verde (-a) ao vermelho (+a). A coordenada b* representa a variação da cor azul (-b) ao amarelo (+b).

O croma (C*), grau de saturação da cor, foi calculado a partir da Equação 08 e a variação total da cor (ΔE), conforme a Equação 09.

$$C* = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad \text{(Equação 08)}$$

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad \text{(Equação 09)}$$

4.12. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em valores médios ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de 5% de significância, para comparação das médias. Para a avaliação dos dados foi utilizado o software XLSTAT (versão Pro 7.5 by Addinsoft).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Arroz negro germinado

5.1.1. Processo de germinação

Na Figura 11 A, estão apresentadas as sementes no tempo 0 (controle), 24 e 48 h de germinação. Pode-se se verificar, que após 24 h de germinação que houve nítidas alterações na morfologia da semente de arroz, como a emissão da radícula e o aumento em volume da semente devido à embebição do endosperma.

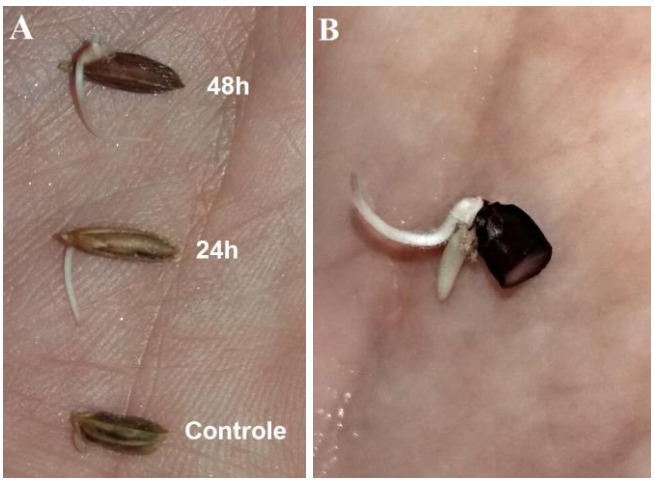


Figura 11: (A) Arroz negro com casca sob diferentes tempos de germinação: (B) Semente de arroz sem casaca e com o endosperma injuriado germinada por um período de 48 h (Fonte: Autor).

Foi observado também que mesmo sem a casca e com o endosperma injuriado, ocorre a germinação da semente (Figura 11 B), porém não foi avaliado qual seria o efeito no crescimento da semente e o vigor após 48 h, visto que o endosperma é responsável pelo suprimento da demanda energética durante a germinação.

5.1.2. Atividade da lipase em amostras

As lipases são hidrolases que catalisam a hidrólise de mono, di e triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. Os triacilgliceróis são lipídeos predominantemente insolúveis em solventes polares. As lipases constituem o terceiro maior grupo de enzimas com valor agregado de mercado atrás apenas das proteases e carboidrases. As lipases possuem grandes aplicações na indústria farmacêutica, de couro, detergente, papel, alimentícias entre outras (NAVVABI et al., 2018). Todavia são responsáveis pela redução da vida útil de diversos produtos alimentícios *in natura* e industrializados, em especial cereais integrais.

O presente estudo avaliou a atividade da lipase (Figura 12) verificando um aumento de acordo com o decorrer do tempo de germinação, tendo em vista que, a amostra controle apresentou uma atividade de 10,0 mg/ g enquanto as amostras G_{24} e G_{48} apresentaram 11,72 e 11,90 mg/ g respectivamente, onde ambas as amostras não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) . Este aumento da atividade da lipase já era esperado visto que a germinação ativa enzimas aprisionadas na cariopse da semente durante a etapa de embebição no início da germinação.

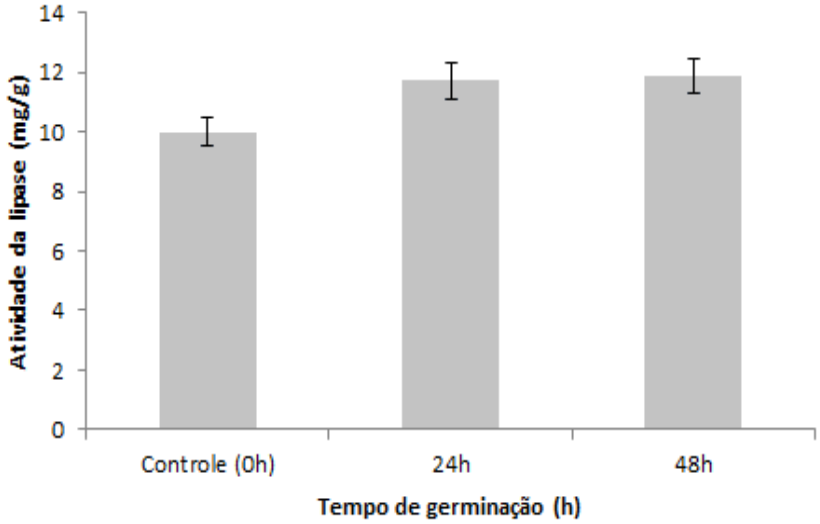


Figura 12: Atividade de lipase em sementes de arroz negro germinadas por 24 e 48 h e amostra controle.

O aumento da atividade de lipases durante a germinação é algo indesejável comercialmente visto que reduz a viabilidade da comercialização arroz negro germinado e do seu uso como matéria prima na formulação de produtos alimentícios já que uma alta atividade de lipases implica na acentuação de processos de rancidez, assim reduzindo o tempo de vida útil deste material.

VIJAYAKUMAR e GOWDA (2012) investigaram o efeito da germinação sobre diferentes tipos de lipase em diferentes partes da plántula. Foi verificado o aumento da atividade crescente de lipase ao longo do tempo de germinação no endosperma com atividade máxima após 96 h de germinação. Nas partes aéreas e

radícula, a atividade das lipases também foi proporcional ao aumento do tempo de germinação, onde a atividade máxima ocorreu ao final de 192 h.

5.1.3. Atividade Antihiperglicemiante

O elevado custo e efeito colaterais de diversos fármacos têm despertado a atenção de pesquisadores na busca de compostos naturais que têm por objetivo o controle dos níveis de glicose sanguínea, tendo em vista que muitas pessoas buscam por alternativas de menor custo e fazem suplementação dietética (DORNAS et al., 2008).

A inibição da α-glicosidase intestinal retarda a absorção de carboidrato da dieta pelo bloqueio da digestão do amido no intestino e reduz os picos glicêmicos. Nesse sentido os fármacos acarbose e miglitol, demonstram potente efeito inibidor de α-glicosidase proporcionando efeito antihiperglicemiante em seres humanos (ABENSUDARA et al., 2004).

Os flavonóides de forma geral auxiliam a translocação de GLUT-4, uma proteína transportadora de glicose regulada pela insulina, assim reduzindo de forma considerável a glicose sanguínea (LI et al., 2007) também evitando os picos glicêmicos

O arroz negro germinado apresentou um ótimo efeito inibidor da α-glicosidase *in vitro*, para $p<0,05$ as amostras controle e G_{24} não apresentaram diferença significativa. A amostra controle inibiu a atividade da enzima em 95,3%, já na amostra G_{24} a inibição foi de 92,1%. Esta redução pode estar associada a menor presença de açúcares em geral que são consumidos durante o crescimento da plântula durante o período de 24h.

A amostra G_{48} não diferiu estatisticamente da amostra controle e foi a que apresentou o maior percentual de inibição, este igual a 98,0%. Esta alta inibição pode ser justificada pela maior presença de açúcares redutores e outros sacarídeos. Após a atuação da α-amilase e enzimas desramificadoras a α-glicosidase terá uma maior atividade, visto que esta enzima ataca preferencialmente ligações glicolíticas α1-4 terminais, assim favorecendo a inibição por parte das antocianinas que possuem propriedades antihiperglicemiante.

5.1.4. Determinação da atividade da α-amilase

Os hormônios vegetais são substâncias químicas que atuam de forma integrada na regulação de muitos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, além de participarem dos processos de manutenção da homeostase vegetal. Em tratando de cereais muitos hormônios e enzimas já estão presentes antes do inicio da germinação (OSBORNE e McMANUS 2005), imobilizados na cariopse da semente (VIJAYAKUMAR; GOWDA, 2012).

Ao avaliar a atividade da α-amilase no arroz negro (Figura 13) foi verificado que houve diferença significativa para todas as amostras ($p<0,05$). O período de maior atividade da enzima foi após o tempo de 24h de germinação com atividade de 366,9 U/ mL estando esse período de acordo com a literatura (CHO e LIM., 2016), enquanto a amostra controle apresentou valor de 272,5 U/ mL e a amostra germinada por 48h 304,4 U/ mL. Embora a água não tenha alcançado completamente todo o endosperma durante a embebição no período de 24h carreando a α-amilase até o centro da semente, este é o período o qual a disposição do substrato é maior assim maximizando a atividade enzimática. Já no período de 48 h mesmo com a semente completamente embebida a

disposição de substrato já é inferior, ocasionando assim uma menor atividade da enzima.

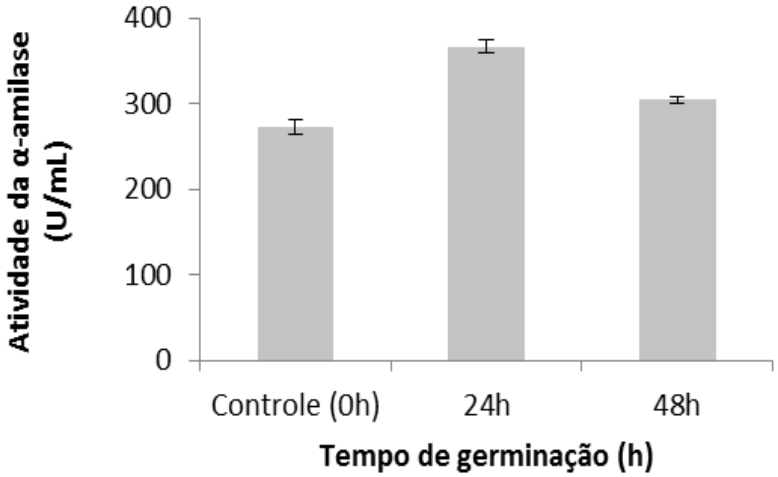


Figura 13: Atividade de α-amilase em sementes de arroz negro germinadas por 24 e 48 h e amostra controle.

ODO et al. (2016) encontraram valores de atividade de α-amilase na faixa de 25 a 30 U/ mL nas primeiras 72 h de germinação de arrozes de variedades locais e avaliaram um decréscimo significativo da atividade ao longo do tempo chegando a valores de 15 U/ mL após 192 h.

Essas discrepâncias entre os valores de atividade entre a literatura e o presente estudo podem ser justificadas devido as diferentes condições de germinação e diferença entre os cultivares. Outra possível justificativa seria a adaptação da metodologia, uma vez que ODO et al. (2016) quantificou os açúcares redutores por meio do método DNS e o presente estudo por meio do método Nelson-Somogyi o qual é mais sensível para glicose, assim aumentando os valores de atividade de α-amilase.

A atividade da α-amilase está diretamente ligada o conteúdo de amido total, açúcares redutores, de amilose e amilopectina.

5.1.5. Determinação de amido total

O conteúdo de amido total (Tabela 02) do arroz negro foi observado um decréscimo ao com o aumento do tempo de germinação, onde a amostra controle difere estatisticamente da amostra G_{48} enquanto a amostra G_{24} não apresentou diferença significativa entre o controle e a G_{48} (Teste de Tukey a 95% de significância). O conteúdo de amido total na amostra controle foi de 66,6%, 63,3% na G_{24} e 60,7% na G_{48}.

Tabela 02: Conteúdo de amido total, açúcares redutores, amilose, amilopectina e amido resistente em amostras de arroz negro:

Análises	Controle (0h)	Tempo de germinação	
		24 h	48 h
Amido total (%)	66,6±1,2[a]	63,3±2,4[ab]	60,7±0,0[b]
Açúcares redutores (mg/g)	37,1 ±0,3[b]	34,4±1,0[c]	56,4±0,9[a]
Amilose (%)	4,5±2,1[b]	16,3±2,1[a]	10,4±2,1[ab]
Amilopectina (%)	95,5±2,1[a]	83,7±2,1[b]	89,6±2,1[ab]
Amido Resistente (mg/100g)	110,8±0,5[a]	96,6±0,9[a]	97,0±0,1[a]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão (±). Médias na mesma linha com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

De acordo com a degradação do amido pode ser atribuída à ação de várias enzimas hidrolíticas, como amilases (em especial a α-amilase) e enzimas desramificantes sintetizadas durante a germinação, assim convertendo o amido em compostos mais simples.

KALITA et. al (2016), reportam que ocorre o decréscimo do conteúdo de amido total e que as condições de germinação afetam significativamente o teor de amido ao longo do tempo. Neste mesmo estudo foi observado um teor de 80% de amido total na amostra controle de arroz branco, já no período de 24 h houve a redução totalizando 70% do conteúdo total de amido e após 48 h o conteúdo total foi de 52%.

5.1.6. Determinação de açúcares redutores

Açúcares contendo um grupo hemiacetal ou hemicetal livre são chamados açúcares redutores. A quantificação de açúcares redutores é uma prática comum na pesquisa de carboidratos, como por exemplo na análise de hidrolisados de polissacarídeos e o estudo da atividade e cinética de enzimas que degradam carboidratos (SHAO; LIN, 2017).

Com a embebição da semente de arroz negro conduzindo as carbohidrases para o centro do endoesperma, já era esperado o aumento dos teores de açúcares redutores (Tabela 02) com o aumento do tempo de germinação. Para $p<0,05$ houve diferenças significativas nos teores de açúcares redutores entre as amostras.

Inicialmente a amostra controle apresentou valor médio de 37,1 mg/ g de açúcares redutores, a amostra G_{24} 34,4 mg/ g. Até o período de 24 h conforme mencionado anteriormente a carbohidrase que apresenta maior atividade é a β-amilase, a demanda energética da semente é alta e a taxa consumo de consumo de energia é superior à velocidade de hidrólise do amido em açúcares redutores causando essa queda de teor em relação a amostra controle. A amostra G_{48} apresentou valor médio de 56,4 mg/ g, embora a demanda energética ainda seja alta, espera-se um aumento da atividade enzimática por parte da α-amilase entre outras hidrolases e enzimas desramificadoras. Assim fazendo com que a taxa de consumo seja inferior velocidade da síntese de açúcares redutores, justificando o seu aumento após o período de 48h.

SAMAN, VÁSQUEZ e PANDIELLA (2008) avaliaram a influência da germinação controlada de duas variedades de arroz tailandês no conteúdo de açúcares redutores por um período de 168 h. O conteúdo máximo de açúcares redutores alcançado em ambas as amostras foi no tempo 72 h (70 mg/ g e 45 mg/ g), logo após houve decréscimo gradativo no conteúdo de açúcares redutores até o fim das 168 h.

5.1.7. Determinação de amilose e amilopectina

A localização exata das moléculas de amilose ainda é desconhecida, mas acredita-se que estejam dispersas entre as moléculas de amilopectina, presentes em maior quantidade na região amorfa, mantidas juntas por ligações de dipolo permanente (JULIANO, 2003) o que confere maior rigidez ao grânulo de amido de acordo com a proporção amilose/amilopectina.

O presente estudo determinou um teor de amilose (Tabela 02) de 4,5% e 95,55% de amilopectina na amostra controle. MENG et al. (2018), avaliou o conteúdo de amilose em amostras de arroz negro e encontrou um percentual de 24% e por diferença pode-se determinar o conteúdo de amilopectina de 76%. Este teor determinado no presente estudo se encontra em desacordo com a literatura, entretanto por se tratar de um cultivar diferente é possível que as condições de cultivo e manejo da semente tenham influenciado nos resultados. As amostras G_{24} e G_{48} apresentaram respectivamente 16,3% e 10,4% e por diferença obteve-se 83,7% e 89,6% de amilopectina respectivamente. Para $p<0,05$ as amostras G_{24} e G_{48} não diferiram estatisticamente.

O aumento do conteúdo percentual de amilose pode ser justificado pela atividade inicial das enzimas desramificadoras que atacam as ligações α-1,6 preferencialmente que correspondem a fração de amilopectina, embora α-amilase esteja em seu período de maior atividade, ela não será tão eficaz no ataque as ligações α-1,4 da amilose visto que esta estará estericamente protegida no interior do grânulo do amido. Posteriormente esse impedimento diminui gradativamente a medida que as enzimas desramificadoras atacam as ligações α-1,6 e assim maximizando a atividade da α-amilase diminuindo então o percentual de amilose ao término das 48 h de germinação.

5.1.8. Determinação de amido resistente nas amostras

O amido resistente refere-se à porção de amido que resiste a digestão, a medida que passa pelo tratogastrointestinal (NUGENT, 2005).

O amido resistente é a fração de amido que não é hidrolisada para D-glicose no intestino delgado dentro de 120 min após ser consumido, mas que é sim fermentado no cólon sendo convertido em ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato (ITO; LACERDA, 2019). O amido resistente chama a atenção por promover beneficios à saúde e por ter propriedades funcionais (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). O consumo de amido resistente na dieta pode obter efeito preventivo de diabetes (controlando a resposta glicêmica) e câncer de colo. Além de melhorar o funcionamento do intestino, reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (controla o colesterol e triglicerídeos), da obesidade (aumenta a saciedade) e osteoporose (aumento na aborção de micronutrientes como o cálcio) (GRABITSKE; SLAVIN, 2009).

Em conjunto com uma boa dieta as amostras de arroz negro germinado analisadas possuem teores satisfatórios de amido resistente considerando-se o consumo médio de amido resistente, na América Latina e Europa que é de 3-6 g/dia e comparar com de outra região como a Ásia que o consumo de amido resistente é de 8-19 g por dia (BEZERRA et al., 2013).

A amostra controle (Tabela 02) apresentou uma concentração de amido resistente de 110,80 mg/100 g e as amostras germinadas apresentaram redução do teor de amido resistente com o aumento do tempo de germinação, a amostra G_{24} apresentou 96,6 mg/100 g e G_{48} com 97,0 mg/100 g. Embora tenha havido redução dos teores de amido resistente, não houve diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$).

5.1.9. Determinação de compostos fenólicos

O interesse por antioxidantes naturais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos devido aos seus efeitos benéficos da prevenção e redução do risco de várias doenças (SIGER et al., 2012) conforme mencionado anteriormente.

O presente estudo observou redução no conteúdo dos compostos fenólicos totais (Tabela 03) ao longo do período de germinação estudado para valores de $p<0,05$ a amostra controle não apresentou diferença estatística com a amostra G_{24} apresentando 0,980 e 0,971 mg/g respectivamente enquanto a amostra G_{48} diferiu estatisticamente apresentando um valor de 0,890 mg/g. Este mesmo padrão foi observado em relação as antocianinas monoméricas (Tabela 03) a amostra controle apresentou 405 mg/ 100 g, já a amostra G_{24} 66 mg/ 100 g e a G_{48} 56 mg/ 100 g não diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 03: Conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em amostras de arroz negro germinado:

Análises	Controle (0 h)	Tempo de germinação	
		24 h	48 h
Fenólicos totais (mg/g)	0,980 ±0,010[a]	0,971±0,005[a]	0,890±0,019[b]
Antocianinas monoméricas totais (mg/100g)	405±2[a]	66±3[b]	56±2[b]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão (±). Médias na mesma linha com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

Antes dos ensaios as sementes tiveram as suas radículas e cascas removidas fator que pode ter influenciado diretamente nos resultados. Outra hipótese que justificaria a redução dos compostos fenólicos totais seria a utilização dos mesmos para a estabilização de espécies radicalares formadas durante o processo de germinação.

CHINMA et al. (2015), ao estudar o efeito da germinação no conteúdo de compostos fenólicos verificou que um aumento considerável em três variedades de arroz local e uma variedade melhorada geneticamente por um período de 48 h. A variedade Jeep foi a que apresentou maior aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais passando de 1,05 mg/ g para 1,76 mg/ g ($p<0,05$). Porém o estudo não faz menção ao tratamento dado as sementes antes de se proceder ao ensaio, não considerando se foram mantidas as radículas e cauloides, que podem influenciar positivamente nos

resultados, pois possuem em sua composição compostos fenólicos como, por exemplo, ligninas responsáveis pela resistência mecânica em vegetais, taninos que oferecem adstringência e toxidez para algumas espécies animais.

5.1.10. Análises instrumental de cor

Cor é um parâmetro importante em alimentos *in natura* e processados, porque pode se obter pela cor informações referentes a nutrientes, frescor do alimento, tipo e intensidade do processamento. A cor também é muito importante na percepção sensorial dos consumidores em relação aos alimentos (COULTATE, 2009). Os compostos fenólicos incluindo as antocianinas, possuem anéis aromáticos ligados a grupamentos hidroxílicos que ativam o anel junto com as ligações duplas conjugadas sendo responsáveis pela emissão de luz em comprimento de onda na faixa do visível.

Com a redução dos compostos fenólicos e antocianinas monoméricas totais era esperado a mudança de alguns parâmetros colorimétricos (Tabela 04). Foi observado o aumento do parâmetro L conforme o aumento do tempo de germinação aproximando a coloração do arroz negro germinado do branco.

Tabela 04: Análise instrumental de cor em sementes de arroz negro germinado:

Parâmetros	Controle (0 h)	Tempo de germinação	
		24 h	48 h
L	49,12±0,04[c]	51,95±0,06[a]	54,12±0,02[b]
a*	1,79±0,05[b]	1,80±0,03[b]	2,10±0,00[a]
b*	4,48±0,14[b]	4,14±0,02[a]	4,21±0,13[b]
ΔE	-	2,29±0,13[a]	2,08±0,07[b]
C*	4,517±0,041[b]	4,828±0,113[a]	4,711±0,105[a]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão (±). Médias na mesma linha com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância). Onde; L, a* e b*: Coordenadas colorimétricas; C*: Saturação de cor; ΔE: Parâmetro que indica a percepção de mudança cor pelo olho humano.

Ao longo do tempo de germinação no presente estudo houve aumento significativo do a* ($p<0,05$) que varia de –a* (verde) a +a* (vermelho). A justificativa para esse aumento seria o aumento da presença de carotenoides que se encontram associados a clorofila nos cloroplastos durante o desenvolvimento da plântula.

Carotenoides são isoprenóides, comumente composto por oito unidades de isoprenos, formando uma extensa cadeia de polieno que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite muitas configurações *cis* e *trans*. São vastamente distribuídos na natureza, sintetizados unicamente em plantas e responsáveis pela coloração de frutas e hortaliças (CONN et al., 1991). Um sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo responsável pelo poder corante dos carotenoides que vai do amarelo ao vermelho (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Além do seu poder como corante, uma característica muito importante dos carotenoides é sua habilidade como antioxidante, protegendo as células e tecidos de efeitos danosos de radicais livres e oxigênio *singlet* (SOWMYA; SACHINDRA, 2012), estabilizando

espécies radicalares durante o processo de fotossíntese. Em relação ao parâmetro b* que varia –b* (azul) a +b* (amarelo) não foi observada mudança significativa.

Os resultados de saturação de cor (C*), apresentaram diferença significativa entre o controle e as amostras germinadas (G_{24} e G_{48}), mostrando que o aumento do tempo de germinação, aumenta consideravelmente a saturação da cor (C*).

O ΔE é uma medida que ajuda a entender como o olho humano percebe a diferença de cor. O termo delta vem da matemática, significando a diferença entre uma variável ou função. O sufixo E faz referência a palavra alemã *empfindung*, que significa sensação (NDANGUI et al.,2014). Em uma escala típica, o ΔE varia de 0 a 100 conforme a Tabela 05

Tabela 05: Faixas de valores de ΔE e percepções humanas (Fonte: NDANGUI et al., 2014).

ΔE	Percepção
≤1,0	-A mudança de cor não é perceptível aos olhos humanos.
1-2	-Mudança perceptível a partir de observação atenta.
2-10	-Mudança perceptível
10-49	-Cores similares as cores opostas
≤100	-Observa-se cores opostas ao padrão

O cálculo do ΔE foi feito para as amostras G_{24} e G_{48} utilizando as médias das coordenadas L, a* e b* da amostra controle como padrão. Os valores de ΔE para ambas as amostras apresentaram diferença significativa entre si (p<0,05) e estão na faixa entre 2-10, indicando uma mudança perceptível de cor.

O cálculo do ΔE foi feito para as amostras G_{24} e G_{48} utilizando as médias das coordenadas L, a* e b* da amostra controle como padrão. Os valores de ΔE para ambas as amostras apresentaram diferença significativa entre si (p<0,05) e estão na faixa entre 2-10, indicando uma mudança perceptível de cor.

5.2. Arroz negro germinado e pressurizado

5.2.1. Tratamento de alta pressão

Diversas foram às tentativas de pressurização das amostras de arroz negro germinado. Inicialmente foi feita a tentativa de pressurização das amostras com casca (Figura 14 A) visando manter uma maior integridade dos compostos fenólicos, porém o cisalhamento proveniente da pressão aplicada nas extremidades agudas das sementes perfuraram as embalagens as quais foram utilizadas durante o processo de pressurização, contaminando as amostras com o etanol, material utilizado como fluído de compressão. Então houve tentativas de se pressurizar as sementes de arroz negro descascadas (Figura 14 B), mas mesmo com extremidades menos agudas ainda assim houve perfuração das embalagens, chegando-se a conclusão de que devido à inexistência no mercado de embalagens resistentes, sendo assim a melhor maneira de se promover a pressurização era a realização de moagem das mesmas. Foi utilizado então

um blender para moer as amostras de arroz negro germinado sem determinação da distribuição granulométrica.

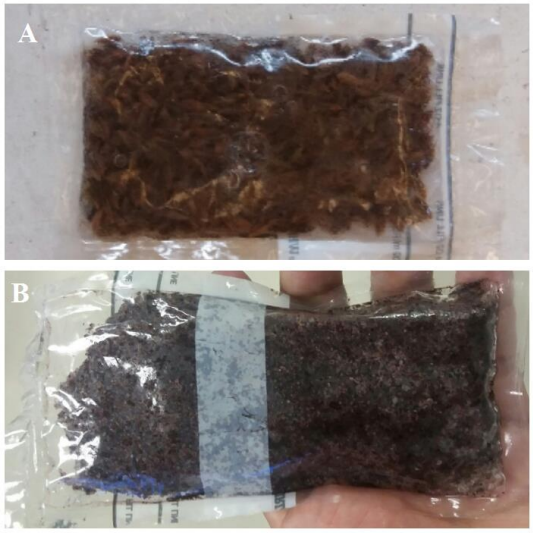


Figura 14: Diferentes tentativas de se pressurizar o arroz negro germinado com o rompimento da embalagem. (A) Arroz negro germinado com casca, (B) arroz negro germinado descascado. (Fonte: Autor)

5.2.2. Atividade da lipase

O tratamento de alta pressão se mostrou uma ferramenta eficaz na inativação da lipase (Tabela 06). Para $p<0,05$ observou-se uma tendência maior na inativação frente a maior tempo de exposição, quanto maior foi a pressão aplicada. A amostra que apresentou a maior taxa de inibição em relação à amostra controle foi a G_{48} pressurizada por 5 min a 500 MPa reduzindo em 29,5% a atividade da lipase comparada a atividade da amostra controle.

Tabela 06: Atividade da lipase em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo:

Tempo de Germinação (h)	Pressão aplicada (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Atividade da Lipase (mg/g)
0	0,1	0	$10,00±0,48^{a}$
24	300	3	$9,68±0,26^{a}$
		5	$8,69±0,19^{abc}$
	400	3	$8,14±0,21^{bcd}$
		5	$7,88±0,19^{cd}$
	500	3	$7,97±0^{bcd}$
		5	$6,85±0,16^{d}$
48	300	3	$9,82±0,63^{a}$
		5	$8,69±0,58^{abc}$

	400	3	9,37±0,38[ab]
		5	9,31±0,35[abc]
	500	3	7,10±0,53[d]
		5	7,05±0,16[d]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

A proposta é de que o aumento gradativo da pressão embora não atue sobre ligações covalentes (OLIVEIRA et. al, 2017) seja suficiente para alterar a conformação das lipases presentes no arroz negro germinado fazendo que estas percam a sua atividade segundo o modelo chave-fechadura. O aumento da temperatura é um fator que interfere na atividade de enzimática, segundo o estudo realizado por JAEGER e REETZ (1998), a termoestabilidade de lipase de *A. niger* perde até 97% de sua atividade frente a um tratamento térmico de 60 ºC por 2 h. Já no presente estudo o aumento da temperatura durante a compressão das amostras estava abaixo de 60 ºC e não houve tempo de contato suficiente para que houvesse inativação das lipases por meio da transferência de calor, demonstrando a eficácia do tratamento de alta pressão na inativação das lipases presentes no arroz negro germinado.

QIAN et. al, (2014) promoveram o estudo de inativação de lipase por meio de aplicação de campo elétrico pulsado em arroz branco integral, o primeiro estudo relatado na literatura de aplicação desta técnica com o intuito de conservação em um material sólido. A maior inibição foi de 2,79 mg/ g, muito mais eficaz se comparado ao tratamento de alta pressão nas condições de pressão e tempo de exposição do presente estudo.

WANG et. al (2018) avaliaram o processo de rancidez durante o armazenamento em amostras de arroz branco integral tratados com alta pressão em um intervalo de 0.1 MPa (Controle) e 400 MPa por 0 min. (amostra exposta a alta pressão até o período em que se alcançou a pressão desejada) e 10 min. Ao término dos três meses de armazenamento, a amostra que mostrou maior estabilidade baseada no conteúdo de ácidos graxos livres (indicando menor atividade de lipases) e Ácido tiobarbitúrico foi a amostra tratada a 200 MPa por 10 min.

5.2.3. Determinação de amido total

Uma vez que o tratamento de alta pressão não atua de forma efetiva sobre ligações covalentes foi verificado que este não apresentou efeitos significativos frente a composição de amido total ($p<0,05$) do arroz negro germinado. Entretanto durante a compressão ocorreu aumento da temperatura chegando a 45 ºC, logo o estado de agitação térmica molecular foi suficientemente para romper algumas ligações amilolíticas.

Observou-se uma tendência na redução dos teores de amido frente uma maior exposição de tempo e pressão. Os teores de amido total estão dispostos na Tabela 07.

Tabela 07: Teor de amido total e açúcares redutores em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo:

Tempo de Germinação (h)	Pressão aplicada (Mpa)	Tempo de pressurização (min)	Amido total (%)	Açúcares redutores (mg/g)
0	0,1	0	66,6±1,2[a]	37,1 ±0,3[c]
24	300	3	64,9±0,2[ab]	34,5±0,3[f]
		5	63,7±0,2[c]	35,9±0,4[d]
	400	3	64,3±0,3[b]	34,8±0,2[ef]
		5	60,7±0,2[cd]	35,5±0,5[de]
	500	3	63,7±0,4[b]	34,8±0,1[ef]
		5	60,4±0,2[edc]	35,5±0,2[de]
48	300	3	59,1±0,3[def]	57,9±0,2[b]
		5	58,8±0,2[ef]	58,2±0,6[b]
	400	3	58,6±0,4[f]	58,4±0,1[b]
		5	58,0±0,1[f]	59,4±0,2[a]
	500	3	57,8±0,4[f]	58,8±0,2[ab]
		5	57,5±0,1[f]	59,6±0,3[a]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

5.2.4. Determinação de açúcares redutores

Com a redução do conteúdo de amido total, a partir da clivagem de ligações α-1,4 e α-1,6 era esperado que com o aumento da temperatura a uma dada pressão aplicada houvesse de forma significativa os teores de açúcares redutores após a degradação de parte do amido. Os teores de açúcares redutores estão dispostos na Tabela 08.

5.2.5. Determinação de compostos fenólicos

No presente estudo foi feita a retirada da casca e de radículas do arroz negro germinado por meio de secagem seguida de fricção manual para a retirada das radículas e descascamento para a remoção da casca. Foi observada a redução do conteúdo de compostos fenólicos totais (Tabela 08) a medida em que a pressão aplicada aumentou, sendo proporcional ao tempo aplicado.

Tabela 08: Conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo:

Tempo de rminação (h)	Pressão aplicada (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Fenólicos totais (mg/g)	Antocianinas monoméricas totais (mg/100g)
0	0,1	0	0,980 ±0,009[a]	405±20[c]
24	300	3	0,338±0,032[bcd]	810±60[ab]
		5	0,393±0,033[bc]	919±15[a]
	400	3	0,370±0,046[bcd]	651±20[bc]
		5	0,332±0,124[bcd]	478±35[c]
	500	3	0,343±0,005[bcd]	866±19[ab]
		5	0,339±0,017[bcd]	885±0[ab]
48	300	3	0,328±0,013[bcd]	804±30[ab]
		5	0,253±0,010[d]	749±10[b]
	400	3	0,330±0,019[bcd]	0,863±0[ab]
		5	0,443±0,014[b]	874±0[ab]
	500	3	0,253±0,035[d]	849±39[ab]
		5	0,271±0,022[cd]	749±30[b]

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

Houve redução dos compostos fenólicos totais em até 27,6% comparado a amostra controle. Outro ponto crítico que pode justificar a redução dos compostos fenólicos totais foi o aumento da temperatura durante a pressurização, visto que estes compostos são termolábeis. O conteúdo de compostos fenólicos totais do presente estudo das amostras de arroz negro germinado analisadas se encontram na Tabela 08.

O conteúdo de compostos fenólicos varia de acordo com as variedades de arroz, cultivares e condições de cultivo fato que também pode justificar a discrepância entre os resultados do presente estudo com os demais abordados na literatura.

Com relação aos compostos fenólicos totais era esperado que o tratamento de alta pressão fosse responsável pelo aumento dos seus teores, visto que a literatura relata aumento do conteúdo de compostos fenólicos e com isso o consequente aumento da capacidade aintioxidante. XIA et. al, (2016) encontraram um aumento na capacidade antioxidante por diferentes métodos proveniente do acúmulo de compostos fenólicos em arroz branco integral germinado por 36 h, variando a pressão entre 0,1 e 500 MPa por 10 min. Já KIM et. al, 2016 reportaram o aumento significativo de ácidos fenólicos em arroz germinado por 48h de 8,5 mg/ g na amostra não pressurizada para 18,4 mg/ g na amostra pressurizada a 100 MPa por 24 h, entretanto ambos os estudos não mencionaram se mantiveram ou removeram a casca, a radícula ou possíveis partes aéreas para a realização dos ensaios, fato que influencia diretamente nos resultados.

Para as antocianinas monoméricas (Tabela 09) foi observado um aumento significativo em relação à amostra controle, onde de forma geral as amostras submetidas a um período de germinação por 48 h apresentaram os maiores resultados seguidos com o aumento da pressão aplicada por 3 min. As partes da semente de arroz negro que possuem a maior fração de antocianinas são o pericarpo, o tegumento e a aleurona que não foram removidas durante o descascamento e que mesmo havendo uma redução do conteúdo de compostos fenólicos totais ao longo do período de germinação avaliado no presente estudo. O tratamento de alta pressão se mostrou eficiente na descomplexação das antocianinas ligadas a parede celular vegetal, desta maneira aumentando a sua disponibilidade. Embora as antocianinas sejam compostos termolábeis o tempo de exposição a temperatura de 45 ºC durante a compressão, não foi suficiente na deterioração nos 3 min.

5.2.6. Análises instrumental de cor

Conforme mencionado anteriormente, a cor é um parâmetro subjetivo que pode indicar o frescor, qualidade de um alimento inclusive características inerentes ao processamento e armazenamento. Com o aumento dos teores de antocianinas monoméricas totais, era esperado um aumento nos parâmetros de cor.

De forma geral, houve aumento gradativo a medida que se aumentou o tempo de germinação e a pressão aplicada em todos os parâmetros L, a* e b*. Entretanto quanto maior o tempo de aplicação da alta pressão, observou-se uma redução nesses parâmetros que pode ser justificada pela maior exposição à alta temperatura ocasionada durante a compressão das amostras, assim degradando parte dos componentes termolábeis como os carotenoides que estão associados aos cloroplastos, as antocianinas nos vacúolos e paredes celulares. Os valores dos parâmetros L, a* e b* para as amostras germinadas e pressurizadas estão dispostos na Tabela 09.

Tabela 09: Parâmetros colorimétricos L, a* e b* em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo:

Tempo de Germinação (h)	Pressão aplicada (MPa)	Tempo de pressurização (min)	L	a*	b*
0	0,1	0	54,512±0,019^{g}	1,806±0,265^{c}	4,141±0,038^{c}
24	300	3	54,138±0,058^{h}	1,871±0,055^{c}	4,685±0,246^{ab}
		5	53,292±0,057^{i}	1,835±0,332^{c}	4,595±0,163^{b}
	400	3	54,834±0,055^{g}	1,889±0,048^{c}	4,730±0,418^{ab}
		5	53,153±0,056^{i}	1,849±0,0545^{c}	4,632±0,145^{ab}
	500	3	54,492±0,439^{gh}	1,898±0,341^{c}	4,753±0,321^{ab}
		5	53,002±0,038^{i}	1,840±0,254^{c}	4,609±0,394^{b}
48	300	3	56,495±0,043^{c}	2,423±0,345^{ab}	4,846±0,382^{ab}
		5	55,021±0,042^{f}	2,360±0,354^{b}	4,720±0,143^{ab}
	400	3	58,460±0,060^{a}	2,507±0,075^{a}	5,015±0,139^{a}
		5	56,004±0,043^{d}	2,402±0,234^{ab}	4,804±0,287^{ab}
	500	3	57,478±0,044^{b}	2,465±0,315^{ab}	4,930±0,371^{ab}
		5	55,513±0,070^{e}	2,381±0,393^{b}	4,762±0,316^{ab}

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

A saturação de cor (C*) seguiu o mesmo padrão dos parâmetros L, a* e b* frente ao tratamento das amostras, já o ΔE que avalia a percepção de cor pelo olho humano seguiu um padrão inverso. De maneira geral a maioria das amostras apresentaram mudanças perceptíveis de cor após o tratamento de alta pressão, já que este possibilitou o rompimento de estruturas celulares, assim modificando o comprimento de onda de absorção de luz intensificando a cor escura ocasionada pela maior disponibilidade de antocianinas e outros compostos que possuem grupamentos cromóforos, como consequência houve aumento da diferença de cor em relação ao padrão estabelecido de comparação (amostra controle). Os valores de C* e ΔE para as amostras germinadas e pressurizadas estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros C* (saturação de cor) e ΔE (percepção da mudança de cor) em amostras de arroz negro germinado submetidas a diferentes intensidades de pressão e tempo:

Tempo de Germinação (h)	Pressão aplicada (MPa)	Tempo de pressurização (min)	C*	**ΔE**
0	0,1	0	4,52±0,04^{g}	-
24	300	3	4,69±0,34^{fg}	0,63±0,11^{hi}
		5	4,91±0,09^{efg}	0,88±0,10^{kl}
	400	3	5,08±0,10^{cdef}	1,01±0,07^{gh}
		5	4,99±0,12^{def}	0,59±0,13^{l}
	500	3	5,12±0,12^{bcde}	1,24±0,06^{fg}
		5	5,04±0,03^{cdef}	0,76±0,12^{jkl}
48	300	3	5,42±0,12^{abc}	2,67±0,07^{c}
		5	5,28±0,12^{abcde}	1,30±0,09^{f}
	400	3	5,61±0,12^{a}	4,60±0,06^{a}
		5	5,37±0,12^{abcd}	2,19±0,07^{d}
	500	3	5,51±0,12^{ab}	3,63±0,07^{b}
		5	5,32±0,12^{abcd}	1,74±0,08^{e}

Os valores se referem à médias seguidas de desvio-padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 95% de significância).

6. CONCLUSÃO GERAL

- ✓ A germinação se mostrou uma técnica eficaz a partir da ativação da lipase e da α-amilase na mudança do conteúdo de açúcares;
- ✓ O conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais foram reduzidos ao se considerar somente a semente e desprezar a radícula e partes aéreas das plântulas;
- ✓ Mesmo com a redução do conteúdo de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas o arroz negro germinado se mostrou eficiente na inibição da α-glucosidase;
- ✓ A eficiência do tratamento de alta pressão em comparação a diferentes técnicas relatadas na literatura tenha sido inferior nas condições aplicadas no presente estudo, pode-se considerar a alta pressão uma boa ferramenta na inativação de lipases devido a sua simplicidade instrumental, facilidade de controle dos parâmetros envolvidos no processo ou até mesmo pela possibilidade de melhores resultados sob condições diferentes do presente estudo;
- ✓ A germinação seguida do tratamento de alta pressão não foi eficaz no aumento dos teores de compostos fenólicos, todavia se mostrou uma técnica eficiente no aumento dos teores de antocianinas monoméricas sob as condições aplicadas no tempo de três minutos com o aumento da pressão;
- ✓ Ainda que de forma discreta tratamento de alta pressão, sob as condições aplicadas foi suficiente para modificar o conteúdo de amido total e açúcares redutores ;
- ✓ Sugestão de análises para futuros trabalhos com arroz negro germinado e pressurizado seria avaliar o efeito do beneficiamento frente as características, microbiológicas, físico-quimicas, enzimáticas e funcionais em cada compartimento da plântula.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E.-S., YOUNG, J. C., & RABALSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, p. 4696-4704, 2006

ABENSUDARA, K. J.M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K**.** α-Glucosidase Inhibitory Activity of Some Sri Lanka Plant Extracts, One of Which, *Cassia auriculata*, Exerts a Strong Antihyperglycemic Effect in Rats Comparable to the Therapeutic Drug Acarbose**. Joural and Agricicutural and Food Chemistry.** v. 52, p. 2541-2545, 2004

ADISAKWATTANA, S., RUENGSAMRAN, T., KAMPA, P., SOMPONG, W. In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal alpha-glucosidase and pancreatic alpha-amylase. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 110, 2012

ASANTE, E., ADJAOTTOR, A. A., & WOODE, M. Y. Malting characteristics of Wita 7 variety of rice. **Peak Journal of Food Science and Technology**. v.1, p. 61-67, 2013

ASEAN Manual of Food Analysis. **Determination of starch by acid hydrolysis**.*Compiled por ASEANFOOD members.* Bangkok, Thailand: Mohidol University. 2011

BARANZELLI, J.; KRINGEL, D. H.; COLUSSI, R.; PAIVA, F.F; ARANHA, B.C.; MIRANDA, M. Z.; ZAVAREZE, E. R. Changes in enzymatic activity, technological quality and gamma aminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination. **LWT - Food Science and Technology**. v. 90, p. 483-490, 2018

BASSINELLO, P. Z.; GARCIA, J. S.; SOARES, L. A.; KOAKUZU, S. N.; NETO, F. P. M.; FERREIRA, A. R.; MENDONÇA, J. A.; SANTIAGO, C. M.; RANGEL, P. H. N. **ARROZ PRETO: nova opção culinária para o Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008. 6 P. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 147).

BEZERRA, C.V.; AMANTE, E. R.; OLIVEIRA, D. C. et al. Green banana (Musa cavendishii) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physicochemical, functional and morphological characteristics of the starch. Industrial **Crops and Products**, v.41, p.241-249, 2013

BISCONSIN-JUNIOR, A.; ROSENTHAL, A.; MONTEIRO, M. Optimisation of High Hydrostatic Pressure Processing of Pêra Rio Orange Juice. **Food Bioprocess Technology**. v. 7, p. 1670-1677, 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa Nº 6, de 16 DE Fevereiro de 2009. Brasília. 2009

CHAMPAGNE, E.T. et al. Effects of drying conditions, final moisture content, and degree-of-milling on rice flavor. **Cereal Chemistry**, v.74, p.566-570, 1997

CHEN, Z.; YU, C.; WANG, X.; GU, Z.; BETA, T. Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed(*Phalaris canariensis L.*) during germination. **Food Chemistry**. v. 194, v. 608–618, 2016

CHINMA, C. E.; ANUONYE, J. C.; SIMON, O. C.; OHIARE, R. O.; DANBABA, N. E. Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. **Food Chemistry**. v.185, p.454-458, 2015

CHO, D.; LIM, S. Changes in phenolic acid composition and associated enzymeactivity inshoot and kernel fractions of brown rice during germination. **Food Chemistry.** v.256, p. 163-170, 2018

CONN, P. F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology,** v.11, n.1, p.41-47, 1991

COULTATE, T.P. **Food: The Chemistry of Its Components**. 5th Edition, Royal Society of Chemistry. 2009.

DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; ABADIO, F. B. D.; SILVA, C. H. O.; CASTILLO, C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 241–246, 2005

DING, J; HOU, G. G.; NEMZER, B. V.; XIONG, S.; DUBAT, A.; DUBAT, A; FENG, H. Effects of controlled germination on selected physicochemical andfunctional properties of whole-wheat flour and enhanced γ-aminobutyricacid accumulation by ultrasonication. **Food Chemistry**. v. 243, p. 214-221, 2018

DORNAS, W. C.; OLIVEITA, T. T.; DORES, R. G. R.; FABRES, M. H. A.; NAGEM, T. J. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognossy.** v. 19, p. 488-500, 2008

ESCRIBANO, B. M. T.; SANTOS, B. C.; RIVAS, G. C.. Anthocyanins in cereal. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 129-141, 2004

ESTRADA-GIRÓN, Y.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Advances in the use of high hydrostatic pressure for processing cereal grains and legumes. **Trends in Food Science & Technology**. v. 16, p. 194-203, 2005

FERREIRA, E. H. R; ROSENTHAL, A.; CALADO, V.; SARAIVA, J.; MENDO, S. Byssochlamys nivea inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. **Journal of Food Engineering**. v. 95, p. 664-669, 2009

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Rice Market Monitor**. Disponível em: http://www.fao.org/3/I9243EN/i9243en.pdf. Acesso em: 11 de Julho de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (2013). FAO rice market monitor. <http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>. Acessado: 31/05/2018

GAN, R.; LUI, W.; WU, K.; CHAN, C.; DAI, S.; SUI, Z.; CORKE, H. Bioactivecompounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 59, p. 1-14, 2016

GRABITSKE, H. A.; Slavin, J. L. Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.49, p. 327–360, 2009

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed., Oxford University Press**,** p.268-340, 2007

HEFNI, M.; WITTHÖFT, C. M. Effect of germination and subsequent oven-drying on folate content in different wheat and rye cultivars. **Journal of Cereal Science.** v. 56 p. 374-378, 2012

HIRAWAN, R.; DIEHL-JONES, W.; BETA, T. Comparative evaluation of the antioxidant potential of infant cereals produced from purple wheat and red rice grains and LC-MS analysis of their anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, p.12330–12341, 2011

HOU, Z.; QIN, P.; ZHANG, Y.; CUI, S.; REN, G. Identification of anthocyanin isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and 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 Agriculture and Food Chemistry**. v.51, p.5271-527, 2003

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R, L. The Chemistry Behind the Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. n. 53, p. 1841-1856, 2005

IBGE – Instituo Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. **Distribuição e previsão da produção de arroz nos estados brasileiros em 2018.** Disponível em: htt://www.ibge.gov.br/home/. Acesso em 14 mar 2018.

INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ. **Produtividades municipais Safra 2014/15**. Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Secretaria da Agricultura e Pecuária, 2015. Disponívelem:<http://www.irga.rs.gov.br/upload/20150710145210produtividade_municipio_safra_14_15.pdf>. Acesso em: 14 de novembro de 2016

IRRI – International Rice Research Institute. **Rice in Brazil**, 2011. Disponível em: http://www.irri.org/index.php. Acesso em 07 de Dezembro de 2016

ITO, V. C.; LACERDA, L. G. Black rice (*Oryza sativa* L.): a review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies. **Food Chemistry**, 2019

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 16, p. 396-403, 1998

JANG, E. H. et al. Correlation between physicochemical properties of japonica and indica rice starches. **Food Science and Technology**, v.66, p.530-537, 2016

JOM, K.N.; LORJAROENPHON, Y.; UDOMPIJITKUL, P. Differentiation of Four Varieties of Germinating Thai Colored Indica Rice (*Oryza sativa* L.) by Metabolite Profiling. **Food Science and Technology**, 2016

JULIANO, B.O. **Rice Chemistry and Quality**, Island Publishing House, Philippines, Cap. 2: Structure and Gross Composition of the Rice Grain, p.25-54, 2003

KALITA, D.; SARMA, B.; SRIVASTAVA, B. Influence of germination conditions on malting potential of low and normal amylose paddy and changes in enzymatic activity and physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 220, p.67-75, 2016

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Guanabara Koogan. 2ª Edição. Rio de Janeiro. 2008

KIM, D. J.; HWANG, I. G.; KIM, T. M.; WOO, K. S.; PARK, D. S.; KIM, J. H.; KIM. D. J.; LEE, J.; LEE, Y. R.; JEONG, H. S. Chemical and functional components in different parts of rough rice (Oryza sativa L.) before and after germination. **Food Chemistry**. v. 134, p. 288-293, 2012

KIM, M.Y.; LEE, S.H.; JANG, G.Y.; LI, M.; LEE, Y.R.; LEE, J.; JEONG H.S. Changes of phenolic-acids and vitamin E profiles on germinated rough rice (Oryza sativa L.) treated by high hydrostatic pressure. **Food Chemistry**. v. 217, p. 106-111, 2016

KOAKUZU, S.; ARAÚJO, E. J.; BASSINELLO, P. Z.; CARVALHO, R. N.; TEIXEIRA, M. C. **Procedimento para Determinação de Amido Resistente, Amido Não Resistente (Solúvel) e Total**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2015. 8 P. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 228).

KONDHARE, K. R.; FARRELL, A. D.; KETTLEWELL, P. S.; HEDDEN, P.; MONAGHAN, J. M. Pre-maturity α-amylase in wheat: The role of abscisic acid and gibberellins. **Journal of Cereal Science**, v. 63, p. 95-108, 2015

KONG, S.; KIM, D.; OH, S.; CHOI, I.; JEONG, H.; LEE, J. Black rice bran as an ingredient in noodles: chemical and functional evaluation. **Journal of Food Science**, v.77, p. 303-307, 2011

KOSEKI, S.; YAMAMOTO, K. pH and solute concentration of suspension media affect the outcome of hight hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes.* **Internetional Journal of food microbiology**. v. 11. p. 175-179, 2006

LAVELLI, V., SRI HARSHA, P., FERRANTI, P., SCARAFONI, A., IAMETTI, S. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian alpha-glucosidase and alpha-amylase–effect of food matrix and processing on efficacy. **Food & Function**, v. 7, p. 1655-1663, 2016

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. **Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study.** J. AOAC Int., v.88, n.5, p. 1269-1278, 2005

LEE, J. H. Identifications and quantification of anthocyanins from the grains of black rice (Oryza sativa L.) varieties. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, 391–397, 2010

LI, C.; OH, S.; LEE, D.; BAIK, K.; CHUNG, H. Effect of germination on the structures and physicochemicalproperties of starches from brown rice, oat, sorghum, and millet. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 105, p. 931–939, 2017

LI, G.; ZHU, F.; Effect of high pressure on rheological and thermal properties of quinoa and maize starches. **Food Chemistry**. v. 241, p. 380-386. 2018

LI, H.; LI, J.; XIAO, C.; CUI, B.; FANG, Y.; GUO, L. In vitro digestibility of rice starch granules modified by β-amylase,transglucosidase and pullulanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1220-1236, 2019

LI, W.; DAI, R.; YU, Y.; LI, L.; WU, C.; LUAN, W.; MENG, W; ZHANG, X.; DENG, Y. Antihyperglycemic Effect of *Cephalotaxus sinensis* Leaves and GLUT-4 Translocation Facilitating Activity of Its Flavonoid Constituents. **Biological and pharmaceutical bulletin**. v. 30, p. 1123-1129, 2007

LI, X.; LI, D.; TIAN, H.; PARK, K. Reducing retrogradation of gelatinized rice starch and rice meal under low temperature by addition of extremely thermostable maltogenic amylase during their cooking. **Food Research International** , v. 62, p. 1134-1140, 2014

LIU, M.; HU, B.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, LI; QIAN, H.; QI, X. Inhibition study of red rice polyphenols on pancreatic α-amylase activity by kinetic analysis and molecular docking. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 186-192, 2017

LUMEN, B.O.; CHOW, H. **Nutritional quality of rice endosperm**. In: Luh, B.S. (Ed.). Rice utilization, 2.ed., New York: Van Nostrand Reinhold, v.2, cap.15, p.363-395, 1995.

MASSARETTO, I. L.. **Características químicas e nutricionais de arroz-preto, vermelho e selvagem e comparação por análise estatística multivariada**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p. 102-105, 2003

MENG, L.; ZHANG, W.; WU, Z.; HUI, A.; GAO, H; CHEN, P.; HE, Y. Effect of pressure-soaking treatments on texture and retrogradation properties of black rice. **LWT- Food science and technology**, v. 93, p. 485-490, 2018

NAVVABI, A.; RAZZAGHI, M.; FERNANDES, P.; KARAMI, L.; HAMAEI, A. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 61-70, 2018

NDANGUI, CHANCELLE B. et al. Impact of thermal and chemical pretreatments on physicochemical, rheological, and functional properties of sweet potato (Ipomea batatas Lam) flour. **Food and bioprocess technology**. v.7, n.12, p.3618-3628, 2014

NONTASAN, S.; MOONGNGARM, A.; DEESEENTHUM, S. Application of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. **APCBEE Procedia**. v. 2, p. 62-67, 2012

NORKAEW, O.; BOONTAKHAM, P.; DUMRI, K.; NOENPLAB, A. N. L.; SOOKWONG, P.; MAHATHEERANONT, S. Effect of post-harvest treatment on bioactive phytochemicals of Thai black rice. **Food Chemistry**. v. 217, p. 98-105, 2017

NORKAEW, O.; THITISUT, P.; MAHATHEERANONT, S; PAWIN, B.; SOOKWONG, P.; YODPITAK, S.; LUNGKAPHIN, A. Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. **Food Chemistry**. v. 294, p. 493-502, 2019

NUGENT, A. P. Health properties of resistant starch. ***British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin*.** v. 30, p. 27–54, 2005

ODO, M. O.; OKORIE, P. A.; IKEGWU, O. J.; KALU, M. A. Malting potencial of hybrid and local varieties of rice. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences**. v. 4, p. 146-151, 2016

OLIVEIRA, F. A.; NETO, O. C.; SANTOS, L. M. R.; FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL, A. Effect of high pressure on fish meat quality - A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 66, p. 1-19, 2017

OSBORNE, D. J.; McMANUS, M. T. Hormones, signals and target cells in plant development. New York: Cambridge University Press. 2005

PANG, Y.; AHMED, S.; XU, Y; BETA, T.; ZHU, Z.; SHAO, Y; BAO, J. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. **Food Chemistry.** v, 240, p. 212-221. 2018

PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R. Applications of hight and ultra hight pressure homogenizatiom for food safety. **Frontiers in microbiology**. 2016

PENGKUMSRI, Noppawat et al. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 2, p. 331-338, 2015

PINKAEW, H.; WANG, Y.; NAIVIKUL, O. Impact of pre-germination on amylopectin molecular structures, crystallinity, and thermal properties of pre-germinated brown rice starches. **Journal of Cereal Science**. v.73 p. 151-157. 2017

QIAN, J. Y., GU, Y. P., JIANG, W., CHEN, W. Inactivating effect of pulsed electric field on lipase in brown rice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. *22*, p. 89-94, 2014

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; Kulkarni, P. R. Resistant starch – A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1-17, 2006

SAMAN, J.; VÁSQUEZ, J. A; PANDIELLA, S. S. Controlled germination to enhance the functional properties of rice. **Process Biochemistry.** v. 43, p. 1377-1382, 2008

SARTORELLI, D. S.; CARDOSO, M. A. Associação entre carboidratos da dieta habitual e diabetes mellitus tipo 2: evidências epidemiológicas. **Arq Bras Endocrinol Metab.** V. 50, p. 415-426, 2006

SCRIBANO-BAILON, M. T., SANTO-BUELGA, C., & RIVAS-GONZALO, J. Review – Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**. v. 1054, p. 129-141, 2004

SHAO, Y.; LIN, A. H. M. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. **Food Chemistry**, v. 240, p. 898-903. 2017

SHARMA, S.; SAXENA, D.; RIAR, C. Changes in the GABA and polyphenols contents of foxtail millet on germination and their relationship with in vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**. v. 245, p. 863-870, 2018

SIGER, A.; CZUBINSKI, J.; KACHLICKI, P. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.25, n.2, p.190-197, 2012

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran**. Journal of Food Engineering**, Pullman, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006

SLOAN, A.E. Wholly grain. **Food Technology**, n.59, p.16, 2005

SOMOGYI M. **N**ote on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 70, p. 599-612, 1951

SOMPONG, R.; SIEBENHANDL-EHN, S.; LINSBERGER-MARTIN, 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

SOWMYA, R.; SACHINDRA, N.M. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. **Food Chemistry**. v.134, p.308-314, 2012

Sumczynski, D.; Kotásková, E.; Druzˇbíková, H.; Mlcˇek, J. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (Oryza sativa L.) varieties. **Food Chemistry**. v. 211, p.339-346, 2016

SWAIN, T., HILLIS, W.E. The phenolics constituents of prunus domestica. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v.10, n.1, p.63-68, 1959

TAIRA, H.; ITANI, T. Lipid content and fatty acid composition of brown rice of cultivars of the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.460-462, 1988

TANG, Y.; CAI, W.; XU, B. From rice bag to table: Fate of phenolic chemical compositions and antioxidant activities in waxy and non-waxy black rice during home cooking. **Food Chemistry**. v. 191, p. 81–90. 2016

TIWARI, U.; CUMMINS, E. Nutritional importance and effect of processing on tocols in cereals. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.511-520, 2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP**, 2008. Versão 5.0. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/tabela. Acesso em: 12/12/ 2016

VELASQUEZ, M. D. P.; SANTOS, P. C. **Custo total do beneficiamento do arroz em uma cooperativa agrícola**. XIX Congresso Brasileiro de Custos - Bento Gonçalves, RS, Brasil, 12 a 14 de novembro de 2012

VELUPPILLAI, S.; NITHYANANTHARAJAH, K; VASANTHARUBA, S.; BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Biochemical changes associated with germinating rice grains and germination improvement. **Rice Science**, v. 16. p. 240-242. 2009

VIEIRA, N. R. de A.; SANTOS, A. B. dos; SANTANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 633 p, 1999

VIJAYAKUMAR; K. R.; GOWDA, L. R. Temporal expression profiling of lipase during germination and rice caryopsis development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 245-253, 2012

WALTER, M.; MARCHESAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, p.1148-1192, 2008

WANG, H.; ZHU, S.; RAMASWAMY, H.; HU, F.; YU, Y. Effect of high pressure processing on rancidity of brown rice during storage. **LWT - Food Science and Technology.** v. 93, p. 405-411, 2018

WANG, X.; NIE, Y.; XU, Y. Industrially produced pullulanases with thermostability: Discovery, engineering, and heterologous expression. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 360-371, 2019

XIA, Q.; WANG, L.; XU, C.; MEI, J.; LI, Y. Effects of germination and high hydrostatic pressure processing on mineral elements, amino acids and antioxidants in vitro bioaccessibility, as well as starch digestibility in brown rice (Oryza sativa L.). **Food Chemistry**. v. 214. p. 533-542. 2016

ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H. Microbial α-amylase: A biomolecular overview. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 88-101, 2017

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

ZIEGLER, U.; FERREIRA, C. D.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C; VANIER, N. L.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Cooking quality properties and free and bound phenolics content of brown, black, and red rice grains stored at different temperatures for six months. **Food Chemistry**. v. 242, p.427-434. 2018

ANEXO A: **MANUAL DO KIT MEGAZYME DE DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AMILOSE E AMILOPECTINA**

Megazyme

www.megazyme.com

AMYLOSE/
AMYLOPECTIN

ASSAY PROCEDURE

K-AMYL 06/18

FOR THE MEASUREMENT OF THE AMYLOSE AND AMYLOPECTIN CONTENTS OF STARCH

(100 Assays per Kit)

Megazyme

© Megazyme 2018

INTRODUCTION:

Many of the properties of cereal starches that determine their suitability for particular end-uses are dependent upon their amylose/ amylopectin ratios. These properties include gelatinisation and gelation characteristics, solubility, the formation of resistant starch, and, for rice, the cooking and textural characteristics of whole grains.[1-5] Thus, the measurement of the amylose content of starches is an important quality parameter for starch processing.

Amylose is most commonly determined in cereal starches by the potentiometric, amperometric or colourimetric measurement of the iodine binding capacity of the amylose with the resultant formation of amylose-iodine inclusion complexes.[6-10] However, these methods are subject to uncertainties. Amylopectin-iodine complexes also form, and these reduce the concentration of free iodine measured by the non-colourimetric methods and may absorb at similar wavelengths to amylose-iodine complexes in colourimetric methods. These complexes lead to an over-estimation of the amylose, requiring corrections to be applied. Many of the other problems experienced in the use of these methods are detailed by Gibson *et al.*[11]

The specific formation of amylopectin complexes with the lectin concanavalin A (Con A) offers an alternative approach to amylose measurement in starches that is not subject to these uncertainties.[12-13] Under defined conditions of pH, temperature and ionic strength, Con A specifically complexes branched polysaccharides based on α-D-glucopyranosyl or α-D-mannopyranosyl units at multiple non-reducing end-groups with the formation of a precipitate. Thus, Con A effectively complexes the amylopectin component of starch but not the primarily linear amylose component.

The procedure described in this booklet[13] is a modification of a Con A method developed by Yun and Matheson (1990).[13] It uses an ethanol pre-treatment step to remove lipids prior to analysis [modified from Morrison and Laignelet (1983)[7]].

PRINCIPLE:

Starch samples are completely dispersed by heating in dimethyl sulphoxide (DMSO). Lipids are removed by precipitating the starch in ethanol and recovering the precipitated starch. After dissolution of the precipitated sample in an acetate/salt solution, amylopectin is specifically precipitated by the addition of Con A and removed by centrifugation. The amylose, in an aliquot of the supernatant, is enzymically hydrolysed to D-glucose, which is analysed using glucose oxidase/peroxidase reagent. The total starch, in a separate aliquot of the acetate/salt solution, is similarly hydrolysed to D-glucose and measured colourimetrically by glucose oxidase/peroxidase. The concentration of amylose in the starch sample is estimated as the ratio of GOPOD absorbance at 510 nm of the supernatant of the Con A precipitated sample to that of the total starch sample.

This procedure is applicable to all pure starch samples and to cereal flours.

ACCURACY:

Repeated analyses of a set of samples yielded repeatability (within laboratory) with relative standard deviations of < 5% for pure starches and ~ 10% for cereal flours.

KITS:

Kits suitable for performing 100 assays are available from Megazyme. The kits contain the full assay method plus:

Bottle 1: Freeze dried Con A.

Stable for > 5 years below -10°C.

Bottle 2: Amyloglucosidase [200 U on *p*-nitrophenyl β-maltoside (i.e. 3,300 U on starch at pH 4.5 at 40°C)] plus fungal α-amylase (500 U on Ceralpha Reagent at pH 5.0 and 40°C), 2 mL.

Stable for > 5 years at 4°C.

Bottle 3: GOPOD Reagent Buffer. Buffer (50 mL, pH 7.4), *p*-hydroxybenzoic acid and sodium azide (0.095% w/v).

Stable for > 4 years at 4°C.

Bottle 4: GOPOD Reagent Enzymes. Glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine. Freeze- dried powder.

Stable for > 5 years below -10°C.

Bottle 5: D-Glucose standard solution (5 mL, 1.0 mg/mL) in 0.2% (w/v) benzoic acid.

Stable for > 5 years at room temperature.
Bottle 6: Starch reference sample (with specified content of amylose).
Stable for > 5 years at room temperature.

PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS:

1. Dissolve the contents of bottle 1 in 50 mL of Con A solvent (Buffer 3, page 4). Divide into aliquots of appropriate size and store in polypropylene tubes below -10°C between use and keep cool during use if possible.Stable for > 2 years below -10°C.

2. Dissolve the contents of bottle 2 in 20 mL of sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5). Divide into appropriately sized aliquots and store in polypropylene tubes below -10°C between use and keep cool during use if possible.Stable for > 2 years below -10°C.

3. Dilute the contents of bottle 3 (GOPOD Reagent Buffer) to 1 L with distilled water (this is solution 3). **USE** immediately.

NOTE:

1. On storage, salt crystals may form in the concentrated buffer. These must be completely dissolved when this buffer is diluted to 1 L with distilled water.
2. This buffer contains 0.095% (w/v) sodium azide. This is a poisonous chemical and should be treated accordingly.

4. Dissolve the contents of bottle 4 with 20 mL of solution 3 and quantitatively transfer this to the bottle containing the remainder of solution 3. Cover this bottle with aluminium foil to protect the enclosed reagent from light. This is Glucose Determination Reagent **(GOPOD Reagent)**. Stable for ~ 3 months when stored at 2-5°C or > 12 months below -10°C.

5 & 6. USE THE CONTENTS OF BOTTLES 5 AND 6 AS SUPPLIED.STABLE FOR > 5 YEARS AT ROOM TEMPERATURE.

SAFETY CONSIDERATIONS:

1. Dimethyl sulphoxide (DMSO) is listed in the Merck Index (No. 3255) as a skin irritant and thus it should be used with caution. It is absorbed through the skin and can cause irritation to both skin and eyes. Wear PPE and avoid splashing the solvent. Use in a fume cupboard where possible.
2. Concanavalin A is harmful by inhalation, skin contact and ingestion. Effects may be irreversible and may involve teratogenesis. Wear appropriate PPE when handling crystalline Con A and gloves when handling solutions containing Con A.
3. Sodium azide is a toxic chemical and should be treated accordingly. It is added to buffers solely as a preservative. It can be deleted from buffer recipes but buffers should then be stored at 4°C.

BUFFERS AND SOLVENTS (NOT SUPPLIED):

1. Sodium Acetate Buffer (100 mM, pH 4.5)

Add 5.9 mL of glacial acetic acid (1.05 g/mL) to 900 mL of distilled water. Adjust the pH to pH 4.5 by the addition of 1 M (4 g/100 mL) sodium hydroxide solution (approx. 30 mL is required). Add 0.2 g of sodium azide and adjust the volume to 1 L.

Stable for > 2 years at room temperature.

2. Concentrated Con A Solvent (600 mM, pH 6.4 sodium acetate buffer)

Dissolve 49.2 g of anhydrous sodium acetate (Sigma cat. no. 71183), 175.5 g of sodium chloride (Sigma cat. no. S7653),

0.5 g of $CaCl_2.2H_2O$ (Sigma cat. no. C5080), 0.7 g of $MgCl_2.6H_2O$ (Sigma cat. no. M2670) and 0.7 g of $MnCl_2.4H_2O$ (Sigma cat. no. M3634) in 900 mL of distilled water. Adjust the pH to 6.4 by dropwise addition of glacial acetic acid and then adjust the volume to 1 L with distilled water.

Stable for 2 weeks at 4°C.

> **NOTE:** When preparing this buffer mixture, it is essential that the pH is adjusted very carefully. If the pH drops significantly below 6.4 a precipitate forms and this will not redissolve on pH adjustment. Consequently, this buffer must be discarded and a fresh batch prepared.

3. Con A Solvent (working concentration)

Dilute 30 mL of Concentrated Con A Solvent to 100 mL with distilled water. Use on the day of preparation.

4. Dimethyl sulphoxide (DMSO)

Analytical reagent grade (BDH Analar cat. no. 10323).

Stable for 5 years at room temperature.

EQUIPMENT (RECOMMENDED):

1. Glassware:
- volumetric flask (25 mL);
- glass test tubes (16 x 120 mm, 15 mL);
- screw capped sample tubes (Kimax®) (10 mL).
2. Micro-pipettors, to dispense 50-1000 µL (e.g. Gilson Pipetman).
3. Positive displacement pipettor, e.g. Eppendorf Multipette®.
4. Eppendorf® microfuge tubes (2.0 mL capacity).
5. Boiling water bath.
6. Bench centrifuge (capable of 2,000 *g*).
7. Vortex mixer (e.g. IKA® Yellowline Test Tube Shaker TTS2).
8. Spectrophotometer (set at 510 nm).
9. Stop clock.
10. Analytical balance.
11. Microfuge (capable of 14,000 *g).*
12. Thermostated water bath set at 40°C.

PRECAUTIONS:

Starch samples must be pre-treated with ethanol as described to remove lipids. If samples are not treated with ethanol, the amylose contents in some samples may be under-estimated by as much as 50%.

ASSAY PROCEDURE:

A. Starch Pre-treatment

1. Accurately weigh starch or flour sample (20-25 mg to the nearest 0.1 mg) into a 10 mL screw capped Kimax® sample tube. Record the sample weight to the nearest 0.1 mg.

> **NOTE:** Include a reference sample with each batch. Duplicate every fifth test sample.

2. Add 1 mL of DMSO to the tube while gently stirring it at low speed on a vortex mixer. Cap the tube and heat the tube contents in a boiling water bath until the sample is completely dispersed (approx. 1 min). Ensure that no gelatinous lumps of starch are remaining.

3. Vigorously mix the contents of the sealed tube at high speed on a vortex mixer, place the tube in a boiling water bath and heat it for 15 min, with intermittent high-speed stirring on a vortex mixer.

4. Store the tube at room temperature for approx. 5 min and add 2 mL of 95% (v/v) ethanol with continuous stirring on a vortex mixer. Add a further 4 mL of ethanol, cap the tube and invert to mix. A starch precipitate will form. Allow the tube to stand for 15 min (or overnight if desired).

5. Centrifuge the tubes at 2,000 *g* for 5 min, discard the supernatant and drain the tubes on tissue paper for 10 min. Ensure that all of the ethanol has drained. Use the pellet in the subsequent amylose and starch determinations.

6. Add 2 mL of DMSO (with gentle vortex mixing) to the starch pellet. Place the tube in a boiling water bath for 15 min and mix occasionally. **Ensure that there are no gelatinous lumps**.

7. On removing the tubes from the boiling water bath, immediately add 4 mL of Con A solvent (Buffer 3; page 4), mix thoroughly and then quantitatively transfer the tube contents (by repeated washing with Con A solvent) to a 25 mL volumetric flask. Dilute to volume with Con A solvent **(this is Solution A).** If necessary, filter this solution through Whatman® No. 1 filter paper (this step will be necessary for whole flour samples).

NOTE: This solution should be analysed within 2 h.

B. Con A Precipitation of Amylopectin and Determination of Amylose

1. Transfer 1.0 mL of **Solution A** to a 2.0 mL Eppendorf® microfuge tube. Add 0.50 mL of Con A solution (bottle 1), cap the tube and gently mix by repeated inversion. **Avoid frothing of the sample.**

2. Allow the tube to stand for 1 h at room temperature. Centrifuge at 14,000 *g* for 10 min in a microfuge at room temperature.3. Transfer 1 mL of the supernatant to a 15 mL centrifuge tube. Add 3 mL of 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. This reduces the pH to ~ 5. Mix the contents, lightly stopper (with a marble) and heat in a boiling water bath for 5 min to denature the Con A.

NOTE:

1. Samples in Con A Solvent (i.e. **Solution A** as described in Section A above) cannot be left for extended periods because the amylose will tend to retrograde and precipitate.
2. The time required for effective Con A precipitation of the amylopectin (Step **B1** above) is 1 h at room temperature. However, these solutions should not be left for longer than 2 h as the amylose will tend to retrograde.
3. In this procedure, pre-treatment of the samples with ethanol has the added advantage of removing any soluble sugars in the sample that would otherwise interfere with the assay.

3. Transfer 1 mL of the supernatant to a 15 mL centrifuge tube. Add 3 mL of 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. This reduces the pH to ~ 5. Mix the contents, lightly stopper (with a marble) and heat in a boiling water bath for 5 min to denature the Con A.

4. Place the tube in a water bath at 40°C and allow to equilibrate for 5 min. Add 0.1 mL of amyloglucosidase/α-amylase enzyme mixture (page 3; solution 2) and incubate at 40°C for 30 min. Centrifuge the tube at 2,000 *g* for 5 min.

5. To 1.0 mL aliquots of the supernatant add 4 mL of GOPOD Reagent (Reagent B). Incubate at 40°C for 20 min. Incubate the **Reagent Blank** and the **D-Glucose Controls** concurrently. 6. Read the absorbance of each sample and the D-glucose controls at 510 nm against the reagent blank.

NOTE:

The **Reagent Blank** is prepared by adding 1.0 mL of 100 mM sodium acetate buffer (Buffer 1; page 4) to 4.0 mL of GOPOD Reagent and incubating at 40°C for 20 min.

D-Glucose Controls (duplicate) comprise 0.1 mL of D-glucose standard solution (1 mg/mL), 0.9 mL of sodium acetate buffer and 4.0 mL of **GOPOD Reagent.** This value is not used in the calculation, however we suggest that it is performed to ensure that there are no problems with this part of the assay.

C. Determination of Total Starch

1. Mix 0.5 mL of **Solution A** with 4 mL of 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5.

2. Add 0.1 mL of amyloglucosidase/α-amylase solution and incubate the mixture at 40°C for 10 min.

3. Transfer 1.0 mL aliquots (in duplicate) of this solution to glass test tubes, add 4 mL of **GOPOD Reagent** (solution 4) and mix well. Incubate at 40°C for 20 min. This incubation should be performed concurrently with the samples and standards from Section B above.

CALCULATION OF AMYLOSE CONTENT (%):

AMYLOSE, % (W/W)

$$= \frac{\text{Absorbance (Con A Supernatant)}}{\text{Absorbance (Total Starch Aliquot)}} \times \frac{6.15}{9.2} \times \frac{100}{1}$$

$$= \frac{\text{Absorbance (Con A Supernatant)}}{\text{Absorbance (Total Starch Aliquot)}} \times 66.8$$

Where **6.15** and **9.2** are dilution factors for the Con A and Total Starch extracts respectively.

NOTE:

The **Reagent Blank** is prepared by adding 1.0 mL of 100 mM sodium acetate buffer (Buffer 1; page 4) to 4.0 mL of GOPOD Reagent and incubating at 40°C for 20 min.

D-Glucose Controls (duplicate) comprise 0.1 mL of D-glucose standard solution (1 mg/mL), 0.9 mL of sodium acetate buffer and 4.0 mL of **GOPOD Reagent.** This value is not used in the calculation, however we suggest that it is performed to ensure that there are no problems with this part of the assay.

REFERENCES:

1. Juliano, B. O. (1971). A simplified way for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today*, **16**, 334-338.

2. Berry, C. S., l'Anson, K., Miles, M. J., Morris, V. J. & Russell,
P. L. J. (1988). Physical chemical characterization of resistant starch from wheat. *J. Cereal Sci.*, **8**, 203-206.

3. Sievert, D. & Pomeranz, Y. (1989). Enzyme resistant starch I. Characterization by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chem.*, **66**, 342-347.

4. Tester, R. F. & Morrison, W. R. (1990). Swelling and Gelatinization of Cereal Starches. I. Effects of Amylopectin, Amylose, and Lipids. *Cereal Chem.*, **67**, 551-557.

5. Leloup, V. M., Colonna, P. & Buleon, A. (1991). Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *J. Cereal Sci*., **13**, 1-13.

6. Matheson, N. K. (1971). Amylose changes in the starch of developing wheat grains. *Phytochem.*, **10**, 3213-3219.

7. Morrison, W. R. & Laignet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.*, **1**, 9-20.

8. Knutson, C. A. (1986). A Simplified Colorimetric Procedure for Determination of Amylose in Maize Starches. *Cereal Chem.*, **63**, 89-92.

9. Chrastil, J. (1987). Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohydr. Res.*, **159**, 154-158.

10. International Organisation for Standardisation (1987).
ISO 6647:1987E. Rice: determination of amylose content.

11. Gibson, T. S., Solah, V. A. & McCleary, B. V. (1996). A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with Concanavalin A. *J. Cereal Science*, **25**, 111-119.

12. Matheson, N. K. & Welsh, L. A. (1988). Estimation and fractionation of the essentially unbranched (amylose) and branched (amylopectin) components of starches with Concanavalin A. *Carbohydr. Res.*, **180**, 301-313.

13. Yun, S. H. & Matheson, N. K. (1990). Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A. *Starch/Starke*, **42**, 302-305.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The procedure described in this booklet was developed in association with the Biological and Chemical Research Institute, NSW Agriculture, Rydalmere, NSW, Australia. We also acknowledge many valuable discussions with Professor N. K. Matheson during the development of this procedure.

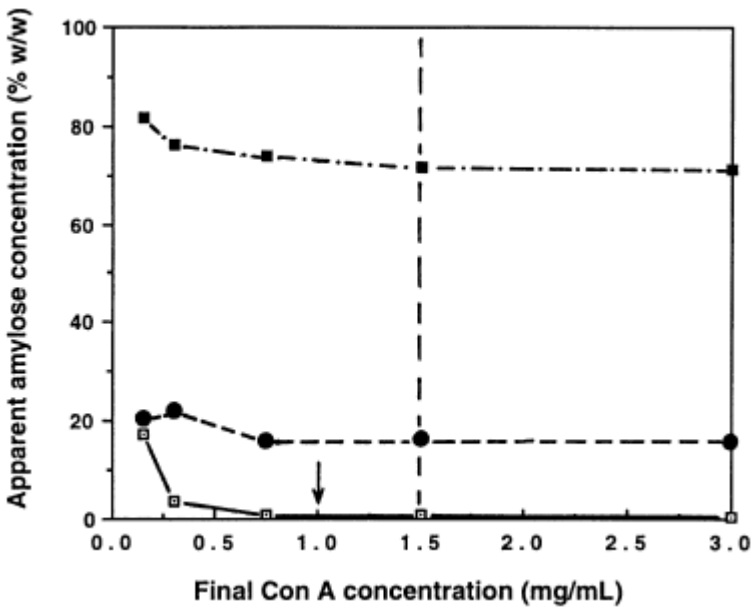


Figure 1: Effect of Con A concentration on the level of amylose determined in starch samples by the modified Con A procedure. ■ = high amylose maize starch (74.4% w/w amylose), ● = rice starch (16.9% w/w amylose), □ = maize starch (1.9% w/w amylose). The vertical dashed line represents the conditions used in the final assay format.

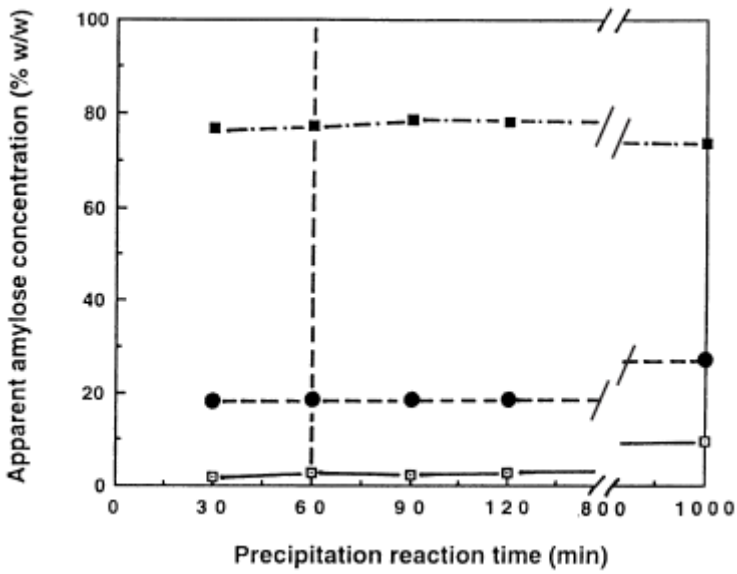


Figure 2: Effect of precipitation reaction time on the amylose determined in starch samples by the modified Con A procedure. ■ = high amylose maize starch (74.4% w/w amylose), ● = rice starch (16.9% w/w amylose), □ = maize starch (1.9% w/w amylose). The vertical dashed line represents the conditions used in the final assay format.

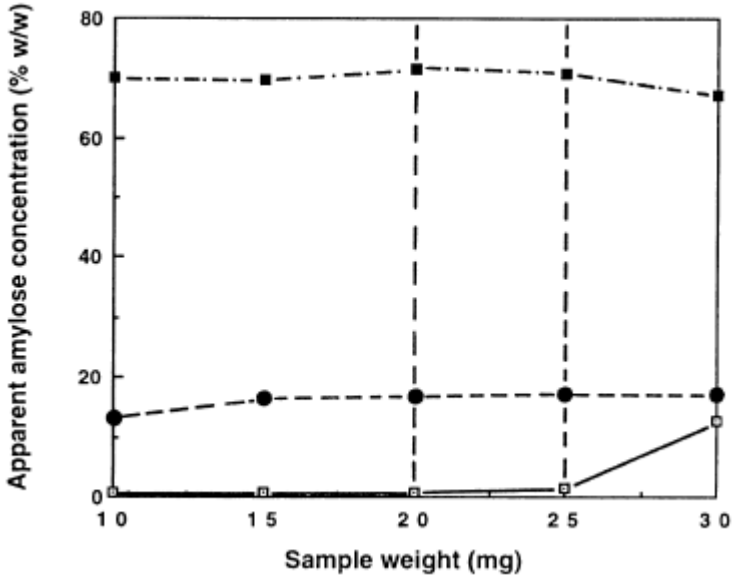


Figure 3: Effect of sample size on the amylose determined in starch samples by the modified Con A procedure. ■ = high amylose maize starch (74.4% w/w amylose), ● = rice starch (16.9% w/w amylose), □ = maize starch (1.9% w/w amylose). The vertical dashed lines represent the conditions used in the final assay format.

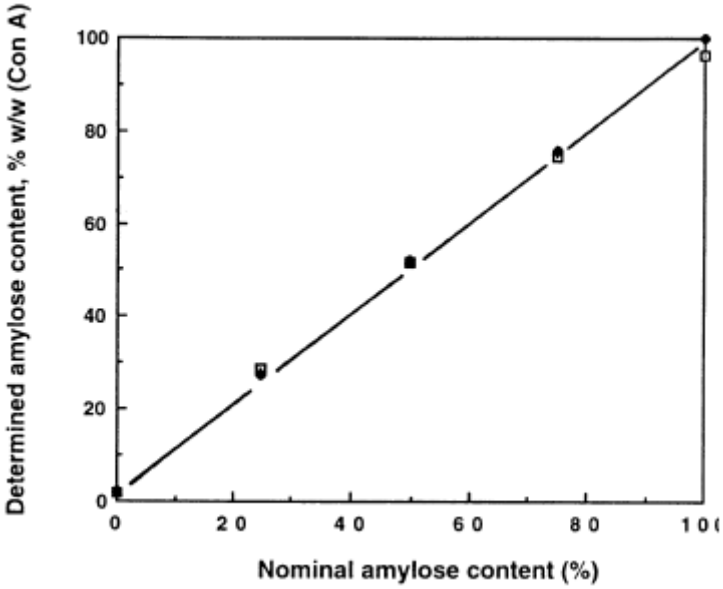


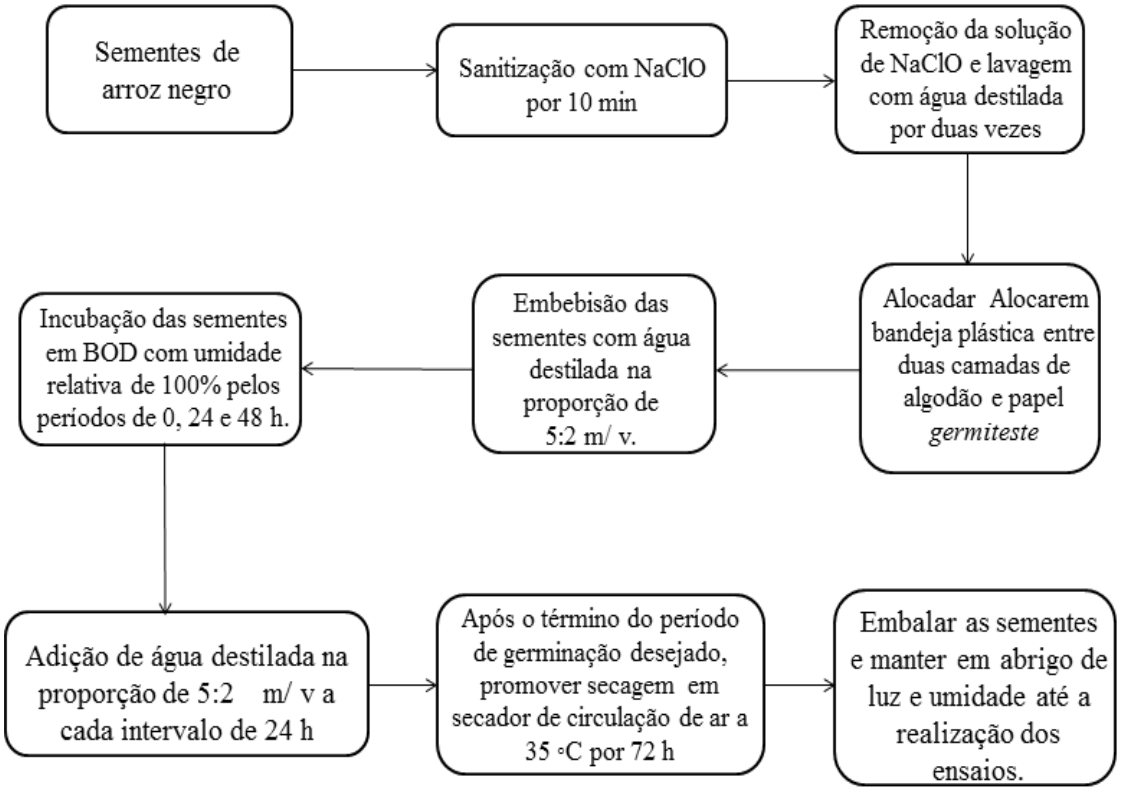
Figure 4: Mixed amylose/amylopectin standard curve for the modified Con A procedure. The regression equation is y = 0.956 x + 3.259 and the correlation coefficient 0.999. Nominal amylose contents are predicted values based on the proportion of ICN potato amylose (~ 100% w/w amylose) and waxy maize starch (~ 0% w/w amylose based on potentiometric iodine titration) in the mixed standard. Data points are means of duplicate determinations.

Megazyme

Bray Business Park, Bray,
Co. Wicklow,
A98 YV29,
IRELAND.

Telephone: (353.1) 286 1220
Facsimile: (353.1) 286 1264
Internet: www.megazyme.com
E-Mail: info@megazyme.com

WITHOUT GUARANTEE

The information contained in this booklet is, to the best of our knowledge, true and accurate, but since the conditions of use are beyond our control, no warranty is given or is implied in respect of any recommendation or suggestions which may be made or that any use will not infringe any patents.

ANEXO B: **FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO UTILIZADO NO PRESENTE TRABALHO**