



<https://doi.org/10.15202/1981996x.2017v11n3p55>

## **ARROZ PRETO (*Oryza sativa* L.) UMA EXCELENTE FONTE DE ANOTOCIANINAS**

### **BLACK RICE (*Oryza sativa* L.) AN EXCELLENT SOURCE OF FLAVONOIDES**

**ANA CRISTINA MIRANDA SENNA GOUVÊA**

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil  
[acristinagouvea@hotmail.com](mailto:acristinagouvea@hotmail.com)

**MANUELA CRISTINA PESSANHA DE ARAUJO SANTIAGO**

Doutor, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
[manuela.santiago@embrapa.br](mailto:manuela.santiago@embrapa.br)

**MONALISA SANTANA COELHO DE JESUS**

Mestre, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil  
[monalisa.coelho@embrapa.br](mailto:monalisa.coelho@embrapa.br)

**SIDNEY PACHECO**

Doutor, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
[sidney.pacheco@embrapa.br](mailto:sidney.pacheco@embrapa.br)

**LUZIMAR DA SILVA DE MATTOS DO NASCIMENTO**

Mestre, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
[luzimar.mattos@embrapa.br](mailto:luzimar.mattos@embrapa.br)

**RENATA GALHARDO BORGUINI**

Doutora, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
[renata.borguini@embrapa.br](mailto:renata.borguini@embrapa.br)

**RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY**

Doutor, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
[ronoel.godoy@embrapa.br](mailto:ronoel.godoy@embrapa.br)

### **RESUMO**

O arroz preto, nutricionalmente superior ao arroz branco por possuir teores mais elevados de proteínas e fibras tem sido alvo do interesse gastronômico nacional e internacional devido à presença de pigmentos, sabor e aroma diferenciados. O pigmento presente no pericarpo do arroz preto pertence à classe das antocianinas, substâncias que têm sido pesquisadas devido as suas contribuições na redução do risco de doenças crônicas. Neste trabalho tais substâncias foram investigadas no pericarpo da cultivar de arroz preto IAC 600, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e adaptada às condições climáticas do Brasil. Para isso, foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Ultra eficiência (CLUE) acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (ESI-Q-TOF-EM). Foram identificadas cinco antocianinas: cianidina-3,5-O-di-

glicosídeo, cianidina-3-O-diglicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo (majoritária), cianidina-3-O-rutenosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo.

**Palavras-chave:** Perfil. Identificação. Caracterização. Cianidina. Peonidina. Espectrometria de massas.

### **ABSTRACT**

Black rice, which is nutritionally superior to white rice because it has higher protein and fiber contents, has been the target of national and international gastronomic interest due to the presence of different pigments, flavor and aroma. The pigment present in the pericarp of black rice belongs to the class of anthocyanins, substances that have been researched due to their contributions in reducing the risk of chronic diseases. In the present work, these

substances were investigated in the pericarp of the black rice cultivar IAC 600, developed by Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) and adapted to the climatic conditions of Brazil. For this purpose, Ultra High Performance Liquid Chromatograph (UPLC) coupled to High Resolution Mass Spectrometer (ESI-Q-TOF-MS) was used. The five anthocyanins were identified: cyanidin-3,5-O-diglucoside, cyanidin-3-O-diglucoside, cyanidin-3-O-glucoside (majority), cyanidin-3-O-rutenoside and peonidin-3-O-glucoside.

**Keywords:** Profile. Characterization. Identification. Cyanidin. Peonidin. Mass spectrometry.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz está entre os cereais mais consumidos pela população, principalmente em países em desenvolvimento, pois é uma importante fonte de nutriente. Por muitas décadas o arroz branco destacou-se como o preferido do consumidor, mas a procura por alimentos que apresentem sabor diferenciado por chefes Gourmet despertou o interesse em outros cultivares especiais de arroz, principalmente os que apresentam pigmentos, tais como aqueles vermelhos e pretos.

O consumo de arroz preto vem crescendo ao longo dos anos no mundo, principalmente em muitos países asiáticos, tornando-se popular. O arroz preto pertence à espécie *Oryza sativa* L., a mesma do arroz branco, apresenta a casca cor de palha mas com pericarpo do grão preto, originário da China onde é plantado há mais de 4000 anos (BASTOS, AZZINI & MEYER, 2004).

No Brasil, os pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desenvolveram uma cultivar adaptada às condições de solo e clima do estado de São Paulo, o IAC 600, caracterizada por sua resistência às doenças, precocidade, excelente qualidade de grão e possível de ser cultivado em áreas alagadas e também de sequeiro (BASTOS; AZZINI; MEYER, 2004). A cultivar, IAC 600, tem origem da seleção massal realizada em 1994, em uma população da variedade chinesa Wang Xue Ren e foi lançada no Brasil para atender a demanda da cadeia produtiva de arroz.

O arroz preto além de ser muito apreciado pelos chefes da gastronomia nacional e internacional por seu sabor adocicado e aroma leve de castanha, apresenta valor nutricional diferenciado quando comparado ao arroz polido e integral, pois possui mais proteínas e fibras. A película que envolve o grão do arroz integral

preto também é rica em vitaminas, óleos e substâncias fenólicas. Dentre as substâncias fenólicas destacam-se as antocianinas, pigmento que pertence a classe dos flavonoides e são responsáveis pela cor do pericarpo dos grãos (MIN et al., 2012; SUN et al., 2015; SAMYOR; DAS ; DEKA, 2017). A essas substâncias têm sido atribuídas capacidades antioxidante e anti-inflamatória assim como estão relacionadas à redução do risco de doenças crônicas como câncer e doenças coronarianas (LING; WANG; MA, 2002; HU et al., 2003; CHEN et al., 2006; KONG; LEE, 2010; ABDEL-AAL; YOUNG; RABALSKI, 2010; SAMYOR; DAS ; DEKA, 2017; SILVA et al., 2017)

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as antocianinas do pericarp do arroz preto (IAC 600), através das análises realizadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado ao Espectrômetro de Massas de alta resolução (Q-TOF), utilizando como fonte Eletrobulização (ESI) em modo positivo.

## 2. METODOLOGIA

A matéria-prima utilizada, arroz (*Oryza sativa* L.) IAC 600 preto, marca Tio João®, foi adquirida em um mercado local do Rio de Janeiro, Brasil.

Para o procedimento experimental, foram empregados os solventes: ácido fórmico 98%, metanol e acetonitrila grau MS (Merck - Alemanha) e água ultrapura (Milli Q®-Gradient A10 Millipore e Elix®/RIOS™5- EUA).

Alguns grãos do arroz (0,5 g) foram submersos em 2 mL de água ultrapura por 2 horas, sendo posteriormente levados ao banho de ultrassom por 10 minutos. O sobrenadante (1mL) foi inserido em cartucho Sep-Pack C<sub>18</sub> Waters previamente condicionado com metanol acidificado com ácido fórmico (90:10-v/v) seguido de água acidificada (0,1% ácido fórmico em água ultrapura). A eluição das antocianinas retidas no cartucho foi realizada com solução metanol acidificada com ácido fórmico (90:10-v/v). O extrato obtido foi seco sob fluxo de ar comprimido e posteriormente ressuspenso em 1 mL de solução de ácido fórmico/metanol/ água ultrapura (10:10:80-v/v/v). Para a análise por cromatografia líquida, uma alíquota de 100 µL desse extrato foi diluída em 1,5 mL de solução de ácido fórmico/água ultrapura/metanol (0,6: 59,4: 40-v/v/v) e levado ao injetor.

A análise cromatográfica foi realizada em sistema Cromatográfico Líquido de Ultra Eficiência (CLUE- Waters) acoplado ao espectrômetro de massas

(Waters®-Synapt), fonte ESI+, equipado com analisadores de alta resolução, quadrupolo em série com o Time Of Flight (TOF) onde foram realizadas as análises EM e EM/EM, em modo V, para as identificações das massas.

Foram utilizados fluxo de 0,2 mL/min, coluna Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 1,7 mm Waters®) e temperatura de 35°C. As amostras foram injetadas em volume de 1µL seguindo condições descritas na Tabela 1 para o gradiente de eluição e no Quadro 1 os parâmetros utilizados para o detector de Massas.

Tabela 1: Gradiente utilizado para separação das antocianinas por UPLC

Tempo (min)	0,1% ácido fórmico (%)	Acetonitrila (%)
0,0	35,0	65,0
0,5	35,0	65,0
4,0	50,0	50,0
4,1	35,0	65,0
7,0	35,0	65,0

Quadro 1: Parâmetros operacionais do Espectrômetro de Massas

Polaridade (ESI)	Positiva
Capilar (Kv)	3,0
Cone (Kv)	25,0
Temperatura de dessolvatação (°C)	350,0
Temperatura da Fonte (°C)	80,0
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	350,0
Analisador	Modo V
Varredura do Massa	100,0-1000,0 Da

### 3. RESULTADOS

Os dados obtidos em CLUE-EM/EM, descritos na Tabela 2, revelaram a presença de cinco antocianinas distintas com perfil de fragmentação característico. Mostraram a presença do íon molecular,  $t_R = 1,45$  min,  $m/z$ : 611,1835 e seus fragmentos 449,1284 após a perda de uma hexose  $[M-162 \text{ Da}]^+$  e a perda da segunda hexose  $[M-162 \text{ Da}]^+$  liberando por fim a antocianindina 287,0636, caracterizando, portanto, a antocianina como cianidina-3,5- O-diglicosídeo (Figura 1). O  $t_R = 1,77$  min apresenta o íon de  $m/z$  com a massa molar igual a antocianina anterior 611,1653, mas apresenta apenas um fragmento caracterizando a

perda de duas hexoses de uma vez só  $[M-324 \text{ Da}]^+$  liberando o íon  $m/z$  287,0636. Esse procedimento revela ser a substância uma antocianina diglicosilada em apenas um carbono, caracterizando, portanto, a antocianina como cianidina-3-O-diglicosídeo (Figura 2). Para a substância com  $t_R = 2,15$  min os dados obtidos em EM/EM mostraram a presença do íon molecular a  $m/z$  449,1206 e fragmento  $m/z$  287,0574 após a perda de uma hexose  $[M-162 \text{ Da}]^+$ , caracterizando, portanto, a antocianina como cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 3). A substância com  $t_R = 2,41$  min apresentou no espectro EM/EM um íon molecular de  $m/z$  595,1742 e dois fragmentos de  $m/z$  449,1320 e 287,0569 (Figura 4). O primeiro fragmento a  $m/z$  449,106 corresponde a antocianidina ligada a uma molécula de hexose após a perda de uma desoxi-hexose (146 Da) e o fragmento a  $m/z$  287,0665 que corresponde à aglicona cianidina quando há perda total da rutinose (308 Da), caracterizando, portanto, a antocianina como cianidina-3-O-rutenosídeo (Figura 5). Para a substância com  $t_R = 2,63$  min os dados obtidos em EM/EM mostraram a presença do íon molecular a  $m/z$  463,1692 e fragmento 301,0985 após a perda de uma hexose  $[M-162 \text{ Da}]^+$ , caracterizando, portanto, a antocianina como peonidina-3-O-glicosídeo (Figura 6).

Tabela 2: Massas obtidas no CLUE-QTOF e EM/EM

$t_R$ (min)	$[M]^+$ ( $m/z$ )	Fragmentos ( $m/z$ )
1.45	611.1835	449.1284/287.0636
1.77	611.1653	287.0636
2,15	449.1206	287.0574
2,41	595.1742	449.1320/287.0665
2,63	463.1692	301.0985

Figura 1: Espectro de massas, por EM/EM, da cianidina-3,5-O-diglicosídeo,  $t_R 1,45$  min

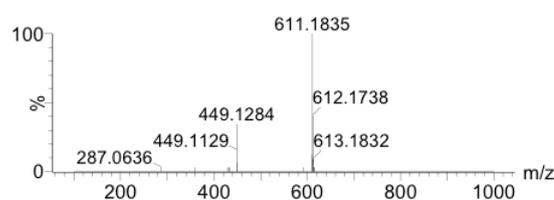


Figura 2: Espectro de massas, por EM/EM, da cianidina-3-O-diglicosídeo, tR1,77 min

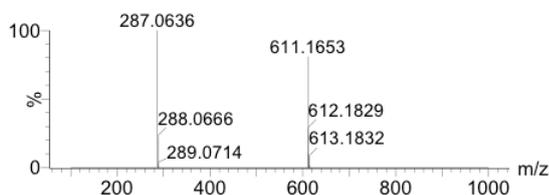


Figura 3: Espectro de massas, por EM/EM, da cianidina-3-O-glicosídeo, tR 2,15 min

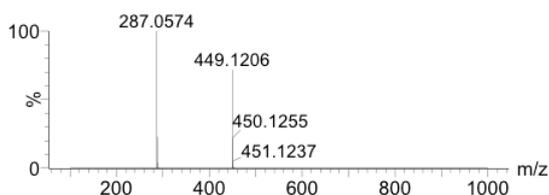


Figura 4: Espectro de massas, por EM/EM, da cianidina-3-O-rutenosídeo, tR 2,41 min

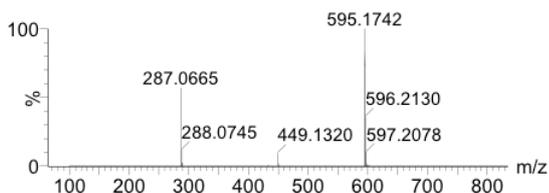
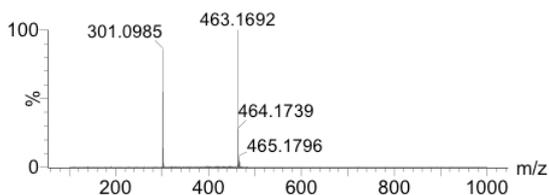


Figura 5: Espectro de massas, por EM/EM, da peonidina-3-O-glicosídeo, tR 2,63 min



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cinco antocianinas foram encontradas em arroz preto (IAC 600). A investigação por espectrometria de massa possibilitou revelar a presença de mais uma substância além das relatadas por Hou e colaboradores em 2013, realizada em arroz proveniente de uma província da China. Como o arroz desenvolvido pelo IAC e comercializado no Brasil (IAC 600) tem procedência chinesa, já era esperado a presença des-

tas quatro substâncias (cianidina-3,5-O-diglicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-rutenosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo), onde a majoritária é a cianidina-3-O-glicosídeo. A identificação da cianidina-3-O-diglicosídeo trouxe novidade para a análise em questão.

#### 5. REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, E.S.M.; 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.

BASTOS, R. C.; AZZINI, L. E. ; MCCLUNG, A.M. IAC 600: **cultivar tipo exótico preto**. Instituto Agrônomo de Campinas, 2004. Disponível em > <http://www.iac.br/areasdepesquisa/graos/arroz.php>> acessado em 22 de maio de 2012.

CHEN, P-N; KUO, W-H; CHIANG, C-L; CHIOU, H-L; HSIEH, Y-S; CHUC, S-C. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, p. 218–229, 2006.

HOU, Z., et al., Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. **Food Research International**, v.50, p. 691–697, 2013.

HU, C., et al. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5271–5277, 2003.

KONG, S.; LEE, J. Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. **Food Chemistry**. v. 120, p 278–281, 2010.

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

MIN, B., et al., Free and bound total phenolic concen-

