

Estudo fitoquímico de *Hydrangea sp.* por meio de métodos clássicos de análise por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) e cromatografia em coluna e em papel

Phytochemical study of Hydrangea sp. using classic methods of analysis by visible ultraviolet spectroscopy (UV-Vis) and column and paper chromatography

Recebido em: 16/06/2016

Aceito em: 12/01/2017

Fabiele BERNARDI; Keller Paulo NICOLINI; Jaqueline NICOLINI
Instituto Federal do Paraná – IFPR. Av. Bento Munhoz da Rocha, s/n, PRT280 – Trevo da Codapar, CEP 85555-000, Palmas, PR, Brasil. E-mail: jaqueline.nicolini@ifpr.edu.br

ABSTRACT

The phytochemical research is an issue that can be approach by several areas of science. The *Hydrangea sp.*, also known in Brazil, as “hortênsia” is an ornamental plant widely known because the presence of flavonoids, a class of antioxidant compounds, which can interact with aluminum ions in the soil, changing the color of the sepals of the *Hydrangea* flowers. In this work, the objective was to extract chlorophyll from leaves of *Hydrangea sp.* using three different solvents (dichloromethane, acetone and aqueous solution of acetone, 80 %). The obtained results indicated that in addition to chlorophyll, there were strong spectroscopic evidence of the presence of the carotenoids β -carotene and/or lutein, and lycopene. The used method can be applied to explain that: i) the leaves are green by the presence of the pigment chlorophyll; however, ii) they not only contain chlorophyll in their constitution, also have yellow and reddish pigments and; iii) the aging leaves lose their green color, by the breakage of the resonance of the porphyrin ring from chlorophyll and hence the other colors in the plant predominates.

Keywords: carotenoids; chlorophyll; *Hydrangea*

RESUMO

A investigação fitoquímica é um tema que pode ser abordado por diversas áreas da ciência. A *Hydrangea sp.*, também conhecida com hortênsia, é um planta ornamental muito conhecida por possuir flavonoides, compostos antioxidantes, que interagem com íons alumínio no solo, alterando as cores das sépalas das flores. Este trabalho teve como objetivo extrair clorofila das folhas de *Hydrangea sp.* utilizando três solventes (diclorometano, acetona e solução aquosa de acetona, 80 %). Os dados indicaram que além de extrair clorofila, também há fortes evidências espectroscópicas da presença dos carotenoides β -caroteno e/ou luteína e licopeno. Assim, o método utilizado pode ser aplicado em aulas práticas para explicar que: i) As folhas são verdes pela presença do pigmento clorofila; ii) no entanto, elas não contém apenas clorofila em sua constituição; também possuem pigmentos amarelos e avermelhados; e iii) ao envelhecer, as folhas perdem a coloração verde, há pela quebra da ressonância do anel porfirínico da clorofila e, conseqüentemente, as outras cores presentes no vegetal tornam-se predominantes.

Palavras-chave: carotenoides; clorofila; *Hydrangea*.

INTRODUÇÃO

Preparar um protocolo experimental envolve a reflexão sobre o tema, a área, os materiais disponíveis bem como a contextualização do tema à área de interesse. Graulich (2015) descreveu, de forma bastante interessante, os diversos conceitos envolvidos em Química, comparando-a a um *iceberg* (1). É sabido que nem todo o gelo de um *iceberg* é visto no nível superior das águas, muito dele está no nível inferior. Assim também são os diversos conceitos que permeiam as diversas áreas de aplicação da Fitoquímica. Um exemplo disso são as porfirinas, que podem ser definidas como uma das mais importantes formas de interação entre os metais e os sistemas biológicos (2). Os dois complexos metaloporfíricos mais importantes são a clorofila e a heme, heterocíclicos com centros reativos, tendo como unidade base os anéis pirrol (3). Independente da área, a clorofila é um dos mais importantes pigmentos vegetais. É ela o catalisador do processo fotossintético que ocorre nas plantas verdes (4-6).

A fotossíntese ocorre na membrana dos tilacoides, localizados no interior dos cloroplastos, convertendo gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) em gás oxigênio (O_2) e carboidrato (CH_2O)_n na presença de luz solar ($h\nu$). Essa reação ocorre em diversas espécies de bactérias, organismos eucarióticos unicelulares (algas) e em plantas vasculares (Figura 1). Durante esse processo ocorre a fosforilação, isto é, síntese de ATP. De forma geral, o processo de fosforilação pode ser descrito por meio de duas reações (5) apresentadas na Figura 1: i) na reação fotoquímica, os elétrons provenientes da água são transferidos para a membrana dos tilacoides (que geralmente organizam-se em pequenas pilhas, denominadas *grana*), produzindo NADPH e ATP; e ii) a reação de combustão, que ocorre durante a fotossíntese, reduzindo o CO_2 a partir dos elétrons provenientes do NADPH e da energia liberada pelo ATP produzido. Essa reação ocorre no estroma, isto é, na fase aquosa encapsulada pela região interna da membrana que reveste os cloroplastos, que contém as enzimas responsáveis pelas reações de fixação de carbono pela combustão.

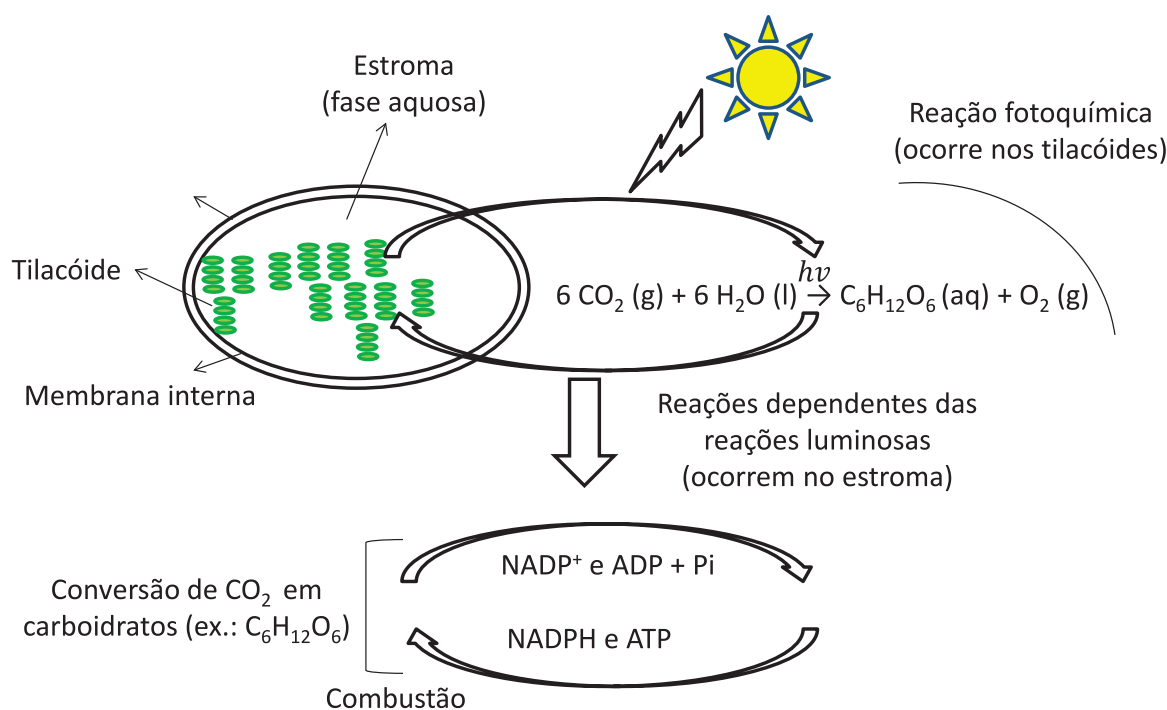


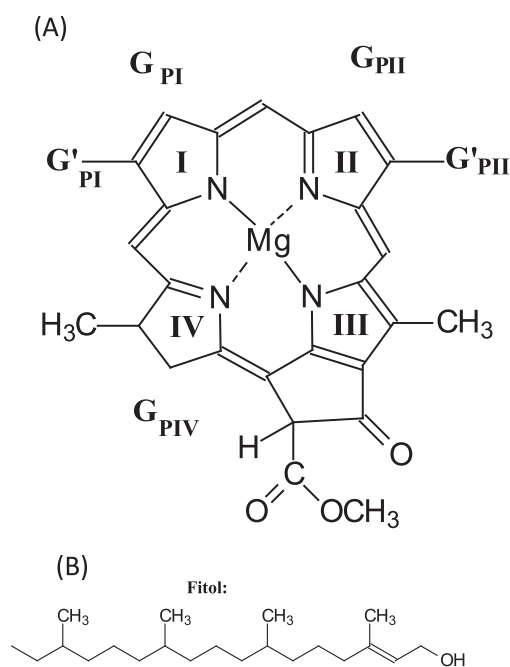
Figura 1: Representação esquemática da fotossíntese e do processo de fosforilação

Existe mais que um tipo de clorofila (7), sendo as mais comuns clorofilas *a* (8), *b* (9), *c* (10), *d* (11, 12) e *f* (13). Em sua maioria, os pesquisadores discutem sobre a presença e o comportamento da clorofila *a* e *b* (Figura 2) e dos seus pigmentos acessórios (carotenos e xantofilas)

(9, 14-27). A concentração de clorofila e de seus pigmentos acessórios pode variar dependendo das condições de cultivo da planta (28-31). A capacidade que a clorofila e seus pigmentos acessórios possuem de absorver luz na região do visível do espectro eletrônico, deve-se à resso-

nância das insaturações, que caracterizam os grupos cromóforos (5). A espectroscopia na região ultravioleta-visível (UV-Vis) está fundamentada na absorção molecular, principalmente pelas transições eletrônicas de sistemas conjugados, sendo importantes os grupos: i) cromóforos: grupos insaturados, responsáveis pela absorção eletrônica, por exemplo, C=C, C=O; e ii) auxocromos: grupos saturados que quando estão ligados a grupos cromóforos

alteram tanto a posição quanto a intensidade da banda de absorção, tais como OH, NH₂ (32). Quando há deslocamento de uma banda de absorção para comprimentos de onda maior, ocorre um deslocamento batocrômico, isto é, um deslocamento para o vermelho. Por outro lado, quando há deslocamento de uma banda de absorção para comprimentos de onda menores, ocorre um deslocamento hipsocrômico, isto é, para o azul.



<p>G_{PI} (Grupo ligado ao Pirrol I) G₁ = HC=CH₂ (Vinil) (clorofila a, b, c₁, c₂ e f) G₂ = CHO (clorofila d)</p>
<p>G'_{PI} (Grupo ligado ao Pirrol I) G₁ = CH₃ (clorofila a, b, c₁, c₂ e d) G₂ = CHO (clorofila f)</p>
<p>G_{PII} (Grupo ligado ao Pirrol II) G₁ = CH₃ (Clorofila a, c₁, c₂, d e f) G₂ = CHO (Clorofila b)</p>
<p>G'_{PII} (Grupo ligado ao Pirrol II) G₁ = CH₂CH₃ (Clorofila a, b, c₁, d e f) G₂ = HC=CH₂ (Clorofila c₁)</p>
<p>G_{PIV} (Grupo ligado ao Pirrol IV) G₁ = CH₂CH₂COO-Fitilo (Clorofila a, b, d e f) G₂ = CH=CHCOOH (Clorofila c₁ e c₂)</p>

Figura 2: (A) Tipos de clorofila (pigmento verde) em função dos grupos ligados aos anéis pirrólicos do centro porfirínico. (B) Grupo fitol (fitol + R-CH₂CH₂COOH → fitil + H₂O).

Com base nesse princípio, várias pesquisas foram e vêm sendo realizadas utilizando especialmente espectroscopia no UV-Vis (9, 14, 26, 27), com o objetivo de desenvolver tanto atividades de ensino quanto de pesquisa. Abordar de forma interdisciplinar o tema metaloporfirinas, em especial, a clorofila, através de atividades que contribuam para a construção de conceitos científicos por parte dos estudantes é tarefa que, conforme descrito por Bachelard (33): “[...] consiste no esforço de mudar de cultura experimental, de derrubar os obstáculos já amontoados pela vida cotidiana, de propiciar rupturas com o senso comum, com um saber que se institui da opinião e com a tradição empiricista das impressões primeiras” e que pode ser aplicada em atividades voltadas à investigação científica (6, 14, 34) bastando o pesquisador refletir sobre o grau de complexidade que se pretende abordar. A planta utilizada para o estudo fitoquímico deste trabalho foi a *Hydrangea* sp.,

a qual é conhecida por ser uma planta indicadora do pH do solo (35). Esse fenômeno é explicado porque um dos fatores que provoca a acidez nos solos é a presença de íons alumínio (Al³⁺) resultado do intemperismo natural dos solos, ricos em aluminossilicatos. Sendo o íon Al³⁺ solúvel ele pode ser absorvido e transportado para as sépalas da *Hydrangea*, e formar complexos de Al³⁺ com as antocianinas, resultando em uma cor azul nas pétalas em solos ácidos, com altas concentrações do íon Al³⁺ e rósea em solos básicos, com baixas concentrações do íon Al³⁺ (35-39).

Neste artigo foi investigado o comportamento fotoquímico dos constituintes químicos de *Hydrangea* sp. (HY), dos extratos brutos (EB) (diclorometanólico e acetonólico) e suas respectivas frações (FE), que foram obtidas a partir do fracionamento em coluna cromatográfica (CC). Tal análise foi possível por meio do fator de retenção (R_f), calculado a partir de Cromatografia em Papel

(CP). Também foi avaliado o comportamento espectroscópico pós-obtenção dos espectros por meio de espectroscopia de UV-Vis, desses extratos e frações. A partir de três amostras dos Extratos Brutos EB-DCM, EB-ACE e EB-ACE80 e 11 frações, sendo 6 frações provenientes de EB-DCM e 5 frações provenientes de EB-ACE, foram obtidos dados para a construção de duas tabelas com informações acerca de: i) polaridade relativa; ii) gradiente de polaridade dos solventes utilizados na corrida cromatográfica; e iii) dados sobre os fatores de retenção (Rf) dos extratos brutos e das frações purificadas. Ao todo foram testados 63 gradientes de polaridade, sendo que, deste número, foram selecionados como eluentes os 10 gradientes de polaridade que apresentaram as melhores separações de cores e o maior número de cores observadas. Dentre os 10 gradientes de polaridade selecionados, estão incluídos o menor e o maior gradiente de polaridade testados (2,71 e 4,88, respectivamente) e 8 gradientes de polaridade intermediários (3,01; 3,12; 3,31; 3,42; 4,20; 4,23; 4,25 e 4,26). Este trabalho teve como objetivo propor e discutir uma atividade que utilize a espectroscopia de UV-Vis e as cromatografias em coluna e em papel, que são técnicas clássicas de análise e de fácil execução, envolvendo o tema clorofila, podendo ser aplicada em estudos fitoquímicos e em aulas experimentais.

MATERIAL E MÉTODO

Descrição experimental. Os solventes foram utilizados sem purificação prévia (99,8 %, Vetec). Sendo que: i) Para as extrações foi utilizado diclorometano P.A. (CH_2Cl_2 , DCM), acetona P.A. (H_3CCOCH_3 , ACE) e solução aquosa de acetona 80 % (ACE80). Cada solvente extrator gerou 1 EB, totalizando 3 EB (EB-DCM; EB-ACE e EB-ACE80). ii) Para a purificação em cromatografia em coluna (CC), foi utilizado DCM e tolueno (TOL) (99,8 % Vetec), sendo a coluna empacotada com TOL. Foram fracionados os EB-DCM (gerando 6 FE) e EB-ACE (gerando 5 FE). iii) Para o acompanhamento por cromatografia em papel (CP) foram mantidos os mesmos eluentes: DCM, ACE e TOL, utilizando papel filtro comum, com porosidade de 14 μm . iv) Para as análises por CC, foi utilizada sílica gel (200-400 mesh), empacotada com TOL em coluna de 15 cm de altura x 2 cm diâmetro, em capela de exaustão, sem luz interna e protegida da luz externa para minimizar os efeitos de fotodegradação da clorofila. Tempo de eluição: entre 4 e 6 h. e v) Para as análises por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis), as análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-BASIC, entre 300 e 700 nm. As etapas experimentais estão resumidas na Figura 3.

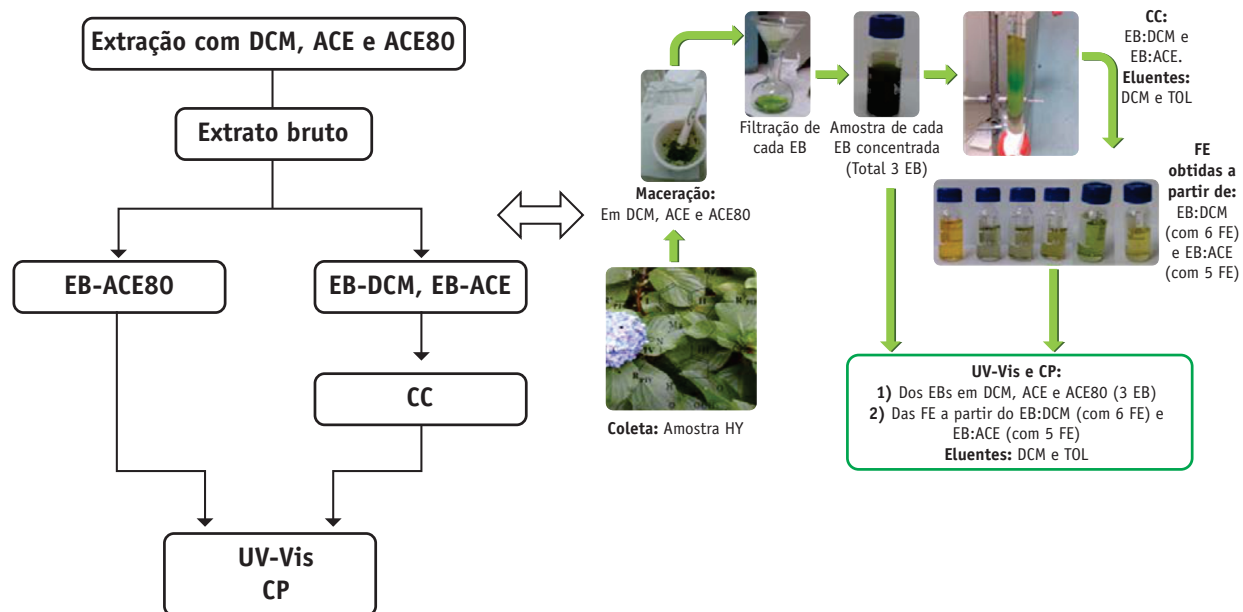


Figura 3: Representação esquemática da parte experimental

Extração dos pigmentos e análises por CC, por CP e por UV-Vis. A extração, realizada em triplicata, seguiu o método descrito por Maestrin e cols. (2009), o qual se baseia na utilização de 5,0 g de massa foliar

(HY) macerados em 50 mL DCM, e mantidos sob agitação, à temperatura ambiente, em frasco fechado, ao abrigo da luz, durante 20 min (14). O extrato foi filtrado e concentrado até o volume final de aproximadamente

2,0 mL. O mesmo procedimento foi realizado utilizando como solventes extratores ACE80 (27) e ACE (24, 27). Os extratos brutos obtidos foram discriminados como EB-DCM, EB-ACE e EB-ACE80. Considerando que as folhas de *Hydrangea* sp. contêm clorofila a e b, além de carotenos e xantofilas (os pigmentos acessórios) (36, 40) os quais podem ser extraídos com DCM, ACE e ACE80 (14, 27) foi executada cromatografia em coluna (CC) dos extratos obtidos em DCM e ACE para separar os constituintes químicos presentes em cada extrato. Posteriormente, foram determinados os fatores de retenção de cada EB e de cada uma das FE obtidos, por cromatografia em papel (CP). Foi traçado o perfil espectroscópico no UV-Vis destas amostras, comparando os espectros obtidos com os apresentados na literatura (41-45) e com os comprimentos de onda máximos λ_{max} calculados (32).

Os extratos brutos obtidos, EB-DCM e EB-ACE, foram purificados em coluna, utilizando TOL e DCM como eluentes, nesta ordem. O extrato bruto EB-ACE80 não foi purificado em CC por ser uma solução aquosa. As 3 amostras de EB e as 11 amostras de FE (sendo 6 de FE:EB-DCM e 5 de FE:EB-ACE) foram analisadas por CP utilizando 10 gradiente de polaridade (2,71; 3,01; 3,12; 3,31; 3,42; 4,20; 4,23; 4,25; 4,26 e 4,48, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2) e por espectroscopia no UV-Vis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e análise dos extratos. Após a obtenção dos 3 EB, foram obtidas as seguintes diluições: i) 2 gotas do extrato EB-DCM concentrado em 3 mL de diclorometano; ii) 2 gotas do extrato EB-ACE concentrado em 3 mL de acetona; e ii) 2 gotas do extrato EB-ACE80 concentrado em 3 mL de solução aquosa de acetona 80 %. Os espectros foram obtidos por espectroscopia UV-Vis entre 300 e 700 nm, conforme apresentado na Figura 4. Quando foram comparados os três espectros obtidos a partir dos EB (EB:DCM, EB:ACE e EB:ACE80) foram observados perfis espectroscópicos semelhantes entre EB-DCM e EB-ACE80 (Figura 4). No entanto, houve deslocamento das bandas máximas de absorção especialmente entre 300 e 550 nm (Figura 4).

Os carotenoides absorvem principalmente na região do espectro eletrônico entre 350 e 550 nm (46), sendo que foram observados, na Figura 4, alterações principalmente na região entre 400 e 550 nm. Todavia, o uso de acetona pura como solvente não evidenciou presença de banda de absorção característica nessa região,

conforme pode ser observado no espectro EB:ACE apresentado na Figura 4.

Os solventes DCM e ACE80 mostraram ser eficientes para a extração de carotenoides e de clorofila dos extratos brutos obtidos (EB:DCM e EB:ACE80, Figura 4), e são os que apresentaram as maiores e as menores polaridades, dentre os três solventes extratores testados, sendo a polaridade do DCM 3,30 e a polaridade relativa do solvente ACE80 6,12, enquanto que o solvente ACE tem polaridade 5,40 (47). Os carotenos (carotenoides hidrocarbonetos) geralmente são hidrofóbicos (48) e as xantofilas (carotenoides oxigenados) (49) tem baixa polaridade, enquanto que solventes com polaridade maior são os mais eficazes para a extração completa das clorofilas (14, 50, 51).

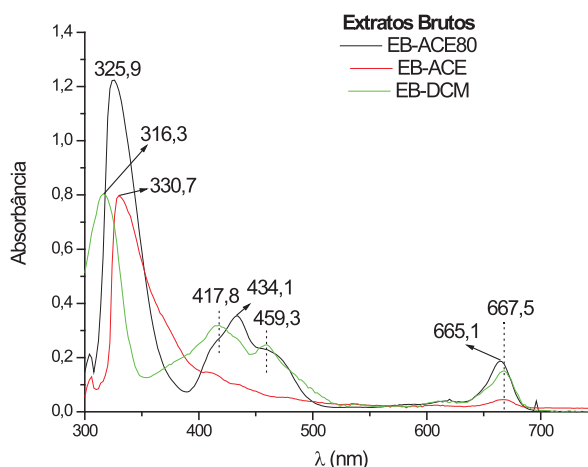


Figura 4: Espectros no ultravioleta-visível (UV-Vis) dos extratos brutos de HY em acetona, acetona 80 % e diclorometano.

Também foi evidente, nos espectros dos EB (Figura 4), a presença de banda de absorção entre 400 e 420 nm (região do azul) e entre 600 e 700 nm (região do vermelho), devido às transições eletrônicas de porfirinas (9, 14, 26, 27), pois suas fortes absorções nas regiões do espectro eletromagnético no azul (próximo a 400 nm) e no vermelho (próximo a 700 nm) fazem com que sejam observadas bandas de absorção na região do verde (14, 52).

De acordo com a Equação 1 (32) é possível calcular o comprimento de onda máximo (λ_{max}) teórico de cada carotenoide, por exemplo, 476,3 nm para o licopeno; 453,3 nm para o β -caroteno; 447,5 nm para a luteína; 453,3 nm para a zeaxantina; 453,3 nm para a anteraxantina; 458,3 nm para a violaxantina e de 438,3 nm para a neoxantina, sendo esses os carotenoides mais comuns (Figura 5). Os valores dos λ_{max} teóricos calculados são muito próximos, indicando que os carotenoides podem aparecer sobrepostos, tanto em uma mistura quando isolados.

$$\lambda_{max} = 114 + 5M + n(48,0 - 1,7n) - 16,5R_{endo} - 10R_{exo}$$

Equação 1

n: número de ligações duplas conjugadas

M= número de grupos alquila ou assemelhados ligados ao sistema conjugado

R_{endo} = número de anéis com ligações duplas endocíclicas no sistema conjugado

R_{exo} = número de anéis com ligações duplas exocíclicas.

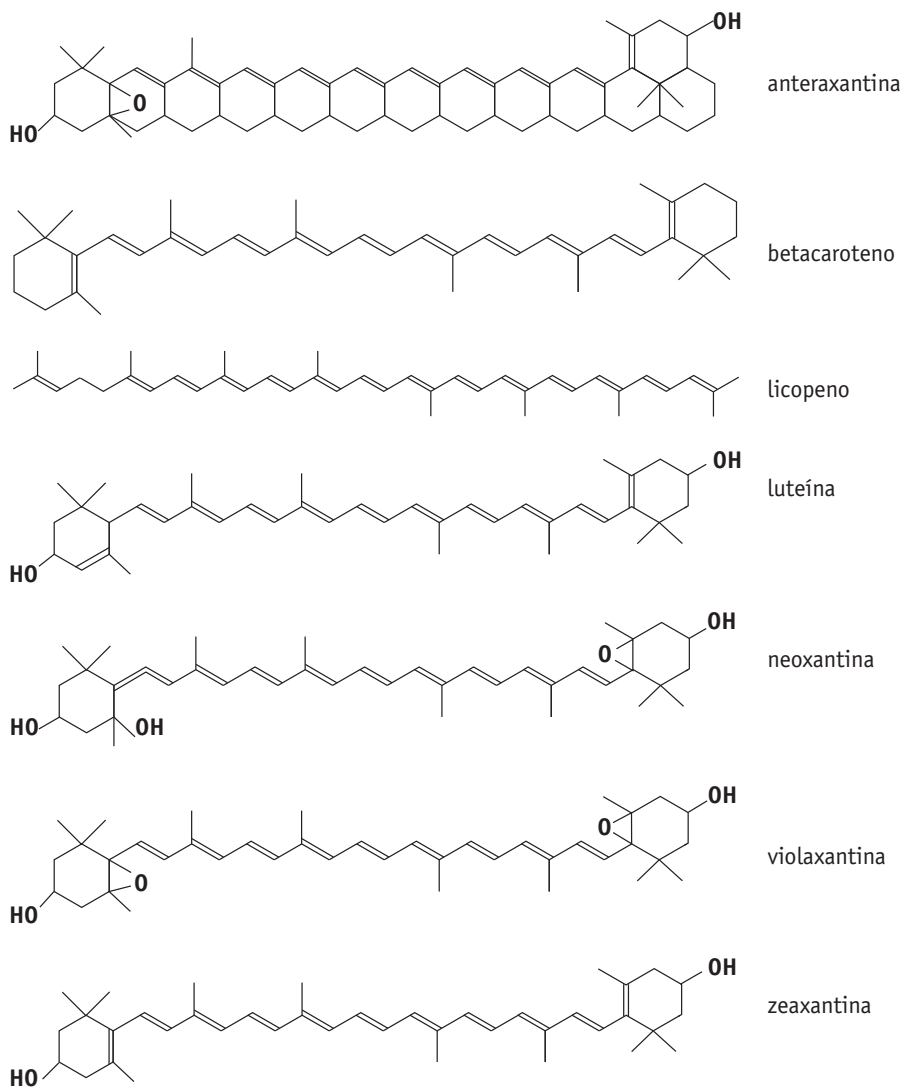


Figura 5: Representação dos carotenoides mais comuns.

Como no extrato bruto a absorção de um constituinte químico se sobrepõe a outro, para otimizar a interpretação espectroscópica dos extratos, as amostras foram purificadas utilizando coluna de sílica gel. O EB proveniente da extração com ACE80 não foi purificado por essa técnica, por conter 20 % de água. Analisando a Tabela 1, pode ser observado que, mantendo os mesmos gradientes de polaridade para a eluição dos compostos presentes nos extratos brutos EB-D-CM, EB-ACE e EB-ACE80, a amostra que apresenta

o maior número de manchas de cores distintas é o EB-ACE80. A celulose, utilizada como fase estacionária, é constituída por mais de duas mil unidades de glicose anidra, ligadas por átomos de oxigênio, fazendo com que os componentes menos solúveis na fase estacionária tenham movimentação mais rápida ao longo do papel, isto é, maiores R_f. Como foram utilizados solventes orgânicos como eluentes, isto é, solventes menos polares, eles são repelidos pela estrutura celulósica (53).

Tabela 1: Fator de retenção (Rf) dos extratos brutos (EB), a partir das extrações com diclorometano P.A (DCM), solução aquosa de acetona 80 % (ACE 80) e acetona PA (ACE).

PR	Eluente	Solvente extrator (EB)					
		DCM		ACE80		ACE	
		CM	Rf (± sd)	CM	Rf (± sd)	CM	Rf (± sd)
2,71	DCM:TOL:ACE (1:8:1)	VEC	96,67 (± 1,53)	AML	97,33 (± 0,58)	VEM	96,33 (± 0,33)
3,01	ACE:TOL:DCM (1:5:4)	VER	96,67 (± 0,58)	AML	97,37 (± 1,09)	VEM	97,00 (± 0,00)
		VEC	89,67 (± 0,58)				
3,12	TOL:ACE:DCM (5:1,5:3,5)	AMQ	98,33 (± 0,58)	VEM	97,34 (± 0,58)	VEM	98,00 (± 0,00)
3,31	ACE:TOL:DCM (1:2:7)	VER	95,67 (± 1,15)	VEC	97,33 (± 0,58)	VEM	96,67 (± 0,33)
3,42	DCM:TOL:ACE (5:3:2)	VEM	97,33 (± 0,58)	VEM	97,69 (± 0,60)	VEM	97,00 (± 0,00)
				AZC	58,74 (± 1,56)		
4,20	DCM:TOL:ACE (5:0,5:4,5)	VMC	97,33 (± 0,58)	VMC	97,00 (± 1,00)	AMC	96,67 (± 0,58)
		VEM	96,33 (± 0,58)	AZC	96,00 (± 1,00)	VEM	96,33 (± 0,58)
4,23	ACE:TOL:DCM (5:1,25:3,75)	VEM	96,33 (± 0,58)	VMC	98,00 (± 1,00)	VEM	96,68 (± 2,40)
				RXC	97,33 (± 0,58)		
4,25	TOL:ACE:DCM (1:5:4)	VEM	96,33 (± 2,08)	VEM	96,67 (± 0,58)	VEM	96,00 (± 0,00)
				AZU	98,33 (± 0,58)		
				VER	97,33 (± 0,58)		
				VEM	97,00 (± 1,00)		
4,26	DCM:TOL:ACE (1:3:6)	VER	97,33 (± 0,58)	VEM	97,33 (± 0,58)	VEM	96,00 (± 0,00)
4,88	DCM:TOL:ACE (1:1:8)	VER	96,67 (± 1,53)	VER	96,00 (± 1,00)	AMC	89,33 (± 1,53)
				VEC	85,00 (± 3,61)		

CM = Cor da Mancha. PR = Polaridade Relativa. DCM = Diclorometano. ACE = Acetona. Rf = Índice de retenção. AMC = Amarelo Claro. AMQ = Amarelo Queimado. AZU = Azul. AZC = Azul Claro. RXC = Roxo Claro. VER = Verde. VEC = Verde Claro. VEM = Verde Musgo. VMC = Verde Musgo Claro.

Os extratos brutos foram purificados por cromatografia em coluna para posteriormente serem analisados por espectroscopia no UV-Vis e CP. A amostra EB-DCM foi dividida em 6 frações por CC, sendo utilizado o TOL, o mesmo solvente de empacotamento da coluna, para separar as primeiras 4 frações e DCM para separar as outras 2 frações. As frações foram separadas utilizando a cor como parâmetro qualitativo.

A partir da purificação de EB-DCM, a primeira fração (espectro FE_{DCM} TOL 1, Figura 6), mostrou ser rica em carotenos (9, 27), caracterizada pela coloração amarela do extrato (Figura 7A), em virtude das duplas ligações conjugadas (41), e espectroscopicamente (Figura 6, FE_{DCM} TOL 1), pela presença de ombros de absorção em 443,0 nm e em 490,8 nm e uma banda de absorção em 461,1 nm. Com base no trabalho realizado por Xu e cols. (2006), e no cálculo teórico do comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos carotenoides (Equação 1), provavelmente, a substância

purificada foi o licopeno, pois teoricamente seu λ_{max} é 476,3 nm e o licopeno (P.A.) possui três bandas de absorção características em 450, 470 e 505 nm (41), que são comprimentos de onda próximos aos observados neste trabalho (Figura 6, FE_{DCM} TOL 1).

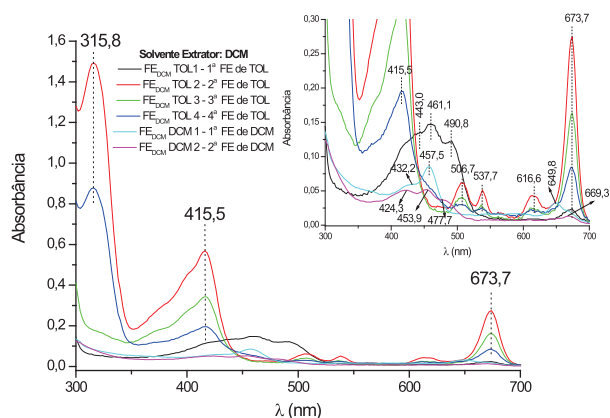


Figura 6: Espectros no ultravioleta-visível (UV-Vis) das frações dos extratos de *Hydrangea sp* em diclorometano

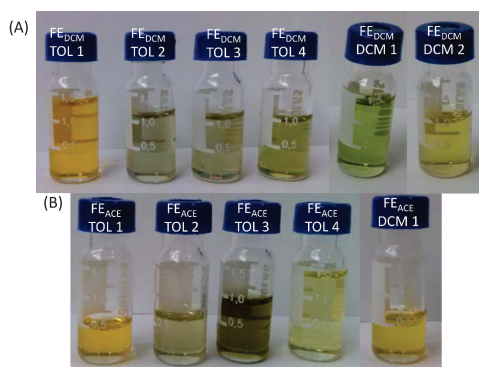


Figura 7: Frações de *Hydrangea sp* obtidas após purificação em CC, utilizando como eluentes TOL e DCM. Solvente extrator: (A) DCM. (B) ACE

Na segunda, terceira e quarta frações do extrato de EB-DCM purificado, ainda utilizando tolueno como eluente (Figura 6, FE_{DCM} TOL 2, FE_{DCM} TOL 3 e FE_{DCM} TOL 4, respectivamente), foi observada a presença de banda de absorção em 415,5 nm, definida como banda de Soret, sendo normalmente observada entre 400 e 420 nm, indicando a presença da principal banda de absorção de um derivado do tipo porfirina/clorina (14), e em 673,7 nm, definida como banda Q (14), sendo normalmente uma banda de absorção intensa e típica de derivados de clorofila (27, 51) (Figura 6, espectros FE_{DCM} TOL 2, FE_{DCM} TOL 3 e FE_{DCM} TOL 4).

As frações coletadas eram esverdeadas (Figura 7A) e as bandas de absorção em 506,7, 537,7 e 616,6 nm (Figura 6, espectros FE_{DCM} TOL 2, FE_{DCM} TOL 3 e FE_{DCM} TOL 4) acompanham a banda Q e também são devidas às transições eletrônicas da porfirina da clorofila (14). O quinto extrato da amostra EB-DCM, utilizando diclorometano como eluente (Figura 6, espectro FE_{DCM} DCM 1) mostrou-se como um intermediário do quarto e do sexto extrato, com bandas pouco evidentes na região de carotenos, com duas bandas em 424,3 e 453,9 nm, e na região de clorofilas. A banda de absorção observada em 649,8 nm (Figura 6, espectro FE_{DCM} DCM 1) apresentava baixa intensidade, com coloração da fração verde claro, tendendo a um amarelo (Figura 7A).

Na sexta fração (Figura 6, espectro FE_{DCM} DCM 2) foi observado, no UV-Vis, uma fraca banda de absorção na região de clorofila (14, 27) em 669,3 nm, devida às transições eletrônicas da porfirina da clorofila. Também bandas de absorção em 424,3, 453,9 e 477,7 nm, região característica de β -caroteno. Esses valores experimentais estão em consonância com o λ_{max} teórico (32) calculado a partir da Equação 1 para o β -caroteno, de 453,3 nm na Figura 6, espectro FE_{DCM} DCM 1 e ao valor descrito por Xu e cols. (2009) de 450 nm (41) e por Srichaoren e cols. (2016) de 460 nm (42).

A coloração do extrato é predominantemente amarela (Figura 7), em virtude das duplas ligações conjugadas do β -caroteno (32, 41, 54). Geralmente, o β -caroteno e o licopeno são constituintes que estão presentes de forma sinérgica nas plantas (41, 42, 45, 55) o que também é observado neste trabalho a partir dos extratos de HY utilizando como solvente extrator o diclorometano (espectros FE_{DCM} TOL 1 e FE_{DCM} DCM 2, na Figura 6).

Quando o comportamento das FE foi analisado por CP (Tabela 2), foi observado que a amostra FE_{DCM} TOL 1 proveniente da extração utilizando DCM, apenas nas proporções com polaridades relativas de 2,71 e de 4,20 as cores obtidas por CP foram são verde-claro (VEC), devido provavelmente à clorofila. Nos demais gradientes de solventes testados, as cores observadas no papel foram amarelo-claro (AMC). Tendo em vista que por UV-Vis (Figura 6, espectro FE_{DCM} TOL 1) esse extrato apresentou comportamento espectroscópico do licopeno, pode ser sugerido que os Rf apresentados na linha FE_{DCM} TOL 1, na Tabela 2, nos gradientes 3,01; 3,12; 3,31; 3,42; 4,23; 4,25; 4,26 e 4,88 sejam devidos ao licopeno.

Nas amostras FE_{DCM} TOL 2, FE_{DCM} TOL 3 e FE_{DCM} TOL 4, todas as cores obtidas em CP foram verde, nos 10 gradientes de polaridade usados, indicando que apenas clorofila eluiu nas condições testadas, estando este comportamento coerente com os espectros FE_{DCM} TOL 2, FE_{DCM} TOL 3 e FE_{DCM} TOL 4, da Figura 6, que indicaram apenas a presença de bandas de absorção da clorofila, e qualitativamente, na Figura 7A, pela coloração verde das frações do extrato EB-DCM purificado. A amostra FE_{DCM} TOL 4, eluída com a mistura de polaridade relativa 4,20 evidenciou a presença de manchas, com dois Rf bem distintos, sendo uma mancha azul (AZU), com Rf 70,3 e a outra mancha verde claro (VEC), com Rf 96,3. É difícil prever quais são os compostos que foram eluídos, mas pode ser que tenha ocorrido a separação da clorofila *a* da clorofila *b* presentes no extrato.

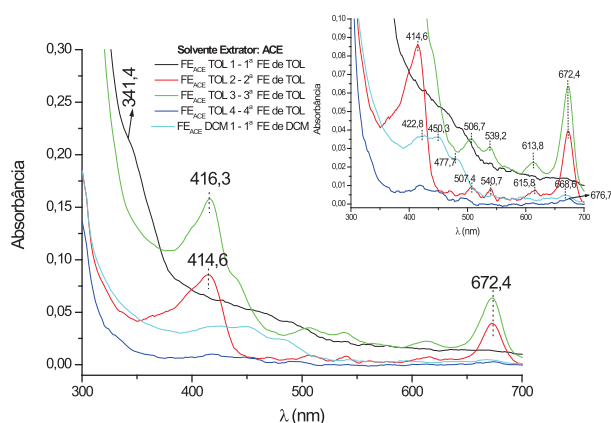


Figura 8: Espectros no ultravioleta-visível (UV-Vis) das frações dos extratos de *Hydrangea sp*. em acetona, utilizando como eluente na CC tolueno e diclorometano, respectivamente

Tabela 2: Fator de retenção (Rf) das frações dos extratos (FE) purificados em CC utilizando tolueno (TOL) e diclorometano (DCM) como eluentes, a partir dos EB das extrações com diclorometano P.A (DCM) e acetona P.A (ACE).

Extrato	DCM:TOL: ACE (1:8:1)		ACE:TOL: DCM (1:5:4)		TOL:ACE: DCM (5:1,5:3,5)		ACE:TOL: DCM (1:2:7)		DCM:ACE: TOL (5:3:2)		DCM:TOL: ACE (5:0,5:4,5)		ACE:TOL: DCM (5:1,25:3,75)		TOL:ACE: DCM (1:5:4)		DCM:TOL: ACE (1:3:6)		DCM:TOL: ACE (1:1:8)	
	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM	Rf	CM
PR	2,71		3,01		3,12		3,31		3,42		4,20		4,23		4,25		4,26		4,88	
FE	Solvente extrator: DCM																			
FE _{DCM} TOL 1	97,7 (±0,6)	VEC	96,3 (±0,6)	AMC	97,3 (±0,6)	AMC	96,8 (±0,6)	AMC	97,0 (±0,0)	AMC	97,9 (±0,0)	VEC	97,7 (±0,1)	AMC	96,6 (±0,7)	AMC	97,8 (±0,1)	AMC	97,3 (±0,6)	AMC
FE _{DCM} TOL 2	95,7 (±0,6)	VEC	96,6 (±0,5)	VEC	96,6 (±0,1)	VEC	97,6 (±0,1)	VEC	97,0 (±1,0)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,0 (±1,0)	VEC	96,0 (±1,0)	VEC	96,0 (±1,0)	VEC	0,00 (±0,0)	***
FE _{DCM} TOL 3	98,3 (±0,6)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,60 (±0,0)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,3 (±0,1)	VEC	97,0 (±1,0)	VEC	96,0 (±1,0)	VEC	98,3 (±0,6)	VEC	97,3 (±1,2)	VEC	98,0 (±0,0)	VEC
FE _{DCM} TOL 4	97,8 (±1,4)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,6 (±0,0)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,0 (±1,0)	VEC	70,3 (±1,5)	AZC	96,3 (±1,2)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC	97,0 (±1,0)	VEC	97,7 (±0,6)	VEC
FE _{DCM} DCM 1	0,00 (±0,0)	***	0,0 (±0,0)	***	0,0 (±0,0)	***	97,3 (±0,6)	AMC	98,0 (±0,0)	AMQ	96,3 (±0,6)	VEC	97,7 (±0,6)	AMQ	96,3 (±0,6)	AZC	97,3 (±0,6)	VEC	95,3 (±0,6)	VEC
FE _{DCM} DCM 2	97,3 (±0,6)	AMC	97,3 (±0,6)	AMC	96,0 (±1,0)	AMC	95,0 (±1,0)	AMC	96,3 (±0,6)	AMC	95,0 (±1,0)	AMC	96,7 (±0,6)	AMC	96,3 (±0,6)	AZC	97,0 (±1,0)	AMC	95,3 (±0,6)	AMC

FE = Fração do Extrato. CM = Cor da Mancha. PR = Polaridade Relativa. DCM = Diclorometano. TOL = Tolueno. ACE = Acetona. Rf = Índice de retenção. AML = Amarelo. AMC = Amarelo Claro. AMQ = Amarelo Queimado. AZC = Azul Claro. VEC = Verde Claro. VEM = Verde Musgo. VMC = Verde Musgo Claro.

A quinta fração de EB-DCM, a amostra FE_{DCM} DCM 1, apresentou, no gradiente de polaridade 4,25 (Tabela 2), duas manchas azuis e uma amarela, indicando ser este um gradiente de polaridade que permite separar os carotenoides da clorofila, em uma mesma eluição. Em relação à amostra FE_{DCM} DCM 2, analisada por CP (Tabela 2), apenas foram observadas cor amarelo-claro (AMC) no papel, nos 10 gradientes de polaridade testados. Como o espectro FE_{DCM} DCM 2 apresentado na Figura 6, apresentou perfil espectroscópico que pode ser atribuído ao β -caroteno, pode ser sugerido que os Rf obtidos e calculados para a fração do extrato FE_{DCM} DCM 2 proveniente do EB-DCM, que apresentou coloração amarela (Figura 7), sejam atribuídos ao β -caroteno.

Quando a extração foi realizada utilizando ACE (acetona P.A, 99,8 %), foi possível separar 5 frações no processo de purificação por CC (Figura 7B). Os dados indicaram que este solvente foi mais eficiente para extrair clorofila do que carotenoides, pois a primeira fração do extrato de EB-ACE (FE_{ACE} TOL 1), apesar de qualitativamente indicar coloração amarela (Figura 7B) não possuía indicativos espectroscópicos que permitissem descrever ou caracterizar algum componente da mistura. Quanto à segunda e à terceira frações purificadas, apresentaram coloração verde (FE_{ACE} TOL 2 e FE_{ACE} TOL 3, respectivamente, Figura 7B).

A segunda fração purificada a partir de EB-ACE, apresentada na Figura 8 como espectro FE_{ACE} TOL 2, mostrou bandas de absorção em 414,6 nm (banda de Soret) e em 672,4 nm (banda Q), bem como as bandas complementares 507,4, 540,7 e 615,8 nm. A terceira fração purificada de EB-ACE, apresentada na Figura 8, como espectro FE_{ACE} TOL 3 apresentou banda de Soret em 416,3 nm e bandas complementares em 506,7, 539,2 e 613,8 nm, além da banda Q em 672,3 nm.

As bandas de absorção observadas no segundo e no terceiro extrato purificado de EB-ACE (FE_{ACE} TOL 2 e FE_{ACE} TOL 3) são características do espectro eletrônico da clorofila (7, 14). A 4ª fração do extrato de EB-ACE (espectro FE_{ACE} TOL 4, Figura 8) indicou a presença de bandas de absorção de intensidades muito baixas, mas que provavelmente já carregavam consigo traços dos constituintes arrastados na 5ª fração, quando foi utilizado, como eluente, diclorometano (espectro FE_{ACE} DCM 1, Figura 8). O espectro FE_{ACE} DCM 1, apresentado na Figura 8, indicou a presença das bandas de absorção em 422,8, 450,3 e 477,7 nm, devidas, provavelmente, à presença de β -caroteno (41) ou de luteína (43, 44).

A partir dos espectros obtidos não foi possível caracterizar o constituinte da amostra, pois pelo cálculo

teórico do λ_{max} não foi possível afirmar se o constituinte presente na mistura era o β -caroteno ou a luteína, pois teoricamente, o valor do λ_{max} calculado foi 447,5 para o β -caroteno e de 453,3 para a luteína e experimentalmente o valor obtido foi 450,3 nm (Figura 8, espectro FE_{ACE} DCM 1). Todavia, a composição em percentual dos carotenoides pode variar na ordem de 25-40 % para β -caroteno, 40-57 % para luteína, 9-20 % para violaxantina e 5-13% para a neoxantina, dependendo das condições de desenvolvimento e do estresse fisiológico da planta (27). Quanto à avaliação por CP das $FE:ACE$, as mesmas não foram apresentadas na Tabela 2 por não corroborarem com a discussão espectroscópica realizada.

CONCLUSÃO

A análise por espectroscopia no UV-Vis indicou que: (1) Os extratos brutos EB:DCM e EB:ACE80 foram os que apresentam bandas de absorção na região dos carotenoides (entre 400 e 550 nm) e de clorofila (entre 400 e 420 nm e entre 600 e 700 nm). (2) Após a purificação dos extratos brutos EB:DCM por cromatografia em coluna, foi possível separar 6 frações. A ordem de eluição indicou na que primeira fração (FE_{DCM} TOL 1) o licopeno foi eluído, caracterizado pela presença da banda de absorção com λ_{max} experimental em 461,1 nm. Em seguida, as frações 2, 3 e 4, indicaram bandas de absorção de clorofila (banda de Soret em 415,5 nm e banda Q em 673,7 nm). A quinta fração continha traços dos constituintes da fração 4 e 6. E a sexta fração do extrato de EB:DCM indicou a presença de β -caroteno pela presença da banda de absorção com λ_{max} experimental em 453,9 nm. (3) Após a purificação do extrato bruto EB:ACE, foi possível separar 5 frações. Destas, não houve evidências espectroscópicas que permitissem distinguir os constituintes presentes nas amostras amarelas, que qualitativamente indicaram a presença de carotenoides. No entanto, foi possível verificar a presença de clorofila, pela presença da banda de Soret (em 414,6 na segunda fração eluída; FE_{ACE} TOL 2, e em 416,3 na terceira fração eluída, FE_{ACE} TOL 3) e da banda Q (em 672,4 nm FE_{ACE} TOL 2 e FE_{ACE} TOL 3).

Esses resultados permitem que o estudante seja capaz aprender sobre métodos de extração, de purificação e de análise. A variação da polaridade do solvente pode resultar em diferentes constituintes extraídos da planta, bem como indicar diferentes perfis de eluição, quando analisados os dados por cromatografia em papel e diferentes perfis espectroscópicos quando analisados os espectros UV-Vis.

O estudo fitoquímico por meio das análises por UV-Vis e por CP é ambientalmente favorável pelo baixo gasto com solventes orgânicos. Além de serem métodos clássicos e de baixo custo também apresentam precisão pela sua reprodutibilidade, separando com eficiência a clorofila dos carotenoides presentes nas folhas de *Hydrangea sp.*

AGRADECIMENTOS

Ao IFPR e ao Programa Institucional de Apoio à Pesquisa (PIAP/IFPR – Edital 015/2013) pelo apoio financeiro..

REFERÊNCIAS

1. Graulich N. The tip of the iceberg in organic chemistry classes: how do students deal with the invisible? *Chem Educ Res Pract*, 2015; 16(1): 9-21. DOI: 10.1039/C4RP00165F.
2. Cotton FA, Wilkinson G. Química Inorgânica. s.^a ed., Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro. 1978.
3. Morrison RT, Boyd RN. Química Orgânica. 6^a ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 1992.
4. Barbosa AL. Dicionário de Química. 2^a ed., AB: Goiânia. 2000.
5. Nelson DL, Cox MM. Lehninger - Principles of Biochemistry. 5^a ed., W.H. Freeman and Company: New York. 2008.
6. Oliveira MFD, Pereira-Maia EC. Alterações de cor dos vegetais por cozimento: Experimento de Química Inorgânica Biológica. *Quim. Nova Esc.*, 2007; 25(mai): 34-35.
7. Sheer H. Structure and occurrence of chlorophylls. s.^a ed., CRC Press. 1992.
8. Fleming IAN. Absolute Configuration and the Structure of Chlorophyll. *Nature*, 1967; 216(5111): 151-152. DOI: 10.1038/216151a0.
9. Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 1994; 144(3): 307-313. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
10. Dougherty RC, Strain HH, Svec WA, Uphaus RA, Katz JJ. Structure, properties, and distribution of chlorophyll c. *J. Am. Chem. Soc.*, 1970; 92(9): 2826-2833. DOI: 10.1021/ja00712a037.
11. Miyashita H, Adachi K, Kurano N, Ikemot H, Chihara M, Miyach S. Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll d as the major chlorophyll. *Plant Cell Physiol*, 1997; 38(3): 274-281.
12. Larkum AW, Kuhl M. Chlorophyll d: the puzzle resolved. *Trends Plant Sci*, 2005; 10(8): 355-357. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.06.005.
13. Willows RD, Li Y, Scheer H, Chen M. Structure of chlorophyll f. *Org Lett*, 2013; 15(7): 1588-1590. DOI: 10.1021/ol400327j.
14. Maestrin APJ, Neri CR, Oliveira KTd, Serra OA, Iamamoto Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Quim Nova*, 2009; 32(6): 1670-1672.
15. Kotsiris G, Nektarios PA, Ntoulas N, Kargas G. An adaptive approach to intensive green roofs in the Mediterranean climatic region. *Urban For Urban Gree*, 2013; 12(3): 380-392. DOI: 10.1016/j.ufug.2013.05.001.
16. Zhou L, Roberts DA, Ma W, Zhang H, Tang L. Estimation of higher chlorophylla concentrations using field spectral measurement and HJ-1A hyperspectral satellite data in Dianshan Lake, China. *ISPRS J Photogramm*, 2014; 88(fev): 41-47. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2013.11.016.
17. Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Mohammed AR, Read JJ, Gao W. Leaf and canopy photosynthetic characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum*) under elevated CO₂ concentration and UV-B radiation. *J Plant Physiol*, 2004; 161(5): 581-590.
18. Nektarios PA, Ntoulas N, Nydrioti E, Kokkinou I, Bali E-M, Amountzias I. Drought stress response of *Sedum sediforme* grown in extensive green roof systems with different substrate types and depths. *Sci Hort* 2015; 181(jan): 52-61. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.10.047.
19. Kira O, Linker R, Gitelson A. Non-destructive estimation of foliar chlorophyll and carotenoid contents: Focus on informative spectral bands. *Int J Appl Earth Obs*, 2015; 38(jun): 251-260. DOI: 10.1016/j.jag.2015.01.003.

20. Kwa S, Groeneveld F, Dekker J, Van Grondelle R, Van Amerongen H, Lin S, Struve W. Steady-state and time-resolved polarized light spectroscopy of the green plant light-harvesting complex II. *BBA-Bioenergetics*, 1992; 1101(2): 143-146.
21. Iglesias-Prieto R, Trench R. Spectroscopic properties of chlorophylla in the water-soluble peridinin-chlorophylla-protein complexes (PCP) from the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *J Plant Physiol*, 1996; 149(5): 510-516.
22. Divya P, Puthusseri B, Neelwarne B. Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Food Res Int*, 2012; 45(1): 342-350. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.09.021.
23. Brabcová I, Hlaváčková M, Šatinský D, Solich P. A rapid HPLC column switching method for sample preparation and determination of β -carotene in food supplements. *Food Chem*, 2013; 141(2): 1433-1437. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.063.
24. Kumar M, Moon UR, Mitra A. Rapid separation of carotenes and evaluation of their in vitro antioxidant properties from ripened fruit waste of *Areca catechu*—A plantation crop of agro-industrial importance. *Ind Crops Prod*, 2012; 40(nov): 204-209. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.03.014.
25. Stoica A, Dobre T, Stroescu M, Sturzoiu A, Pârvulescu OC. From laboratory to scale-up by modelling in two cases of β -carotene extraction from vegetable products. *Food Bioprod Process*, 2015; 94(april): 218-228. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.02.005.
26. Lichtenthaler H, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat Environ Biophys*, 1986; 25(4): 297-308.
27. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 1987; 148(34): 350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
28. Mathobo R, Marais D, Steyn JM. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agric Manage Water Qual*, 2017; 180(nov): 118-125. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.005>.
29. Stratmann T, Lund-Hansen LC, Sorrell BK, Margager S. Concentrations of organic and inorganic bound nutrients and chlorophyll a in the Eurasian Basin, Arctic Ocean, early autumn 2012. *Reg Stud Mar Sci*, 2017; 9(nov): 69-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rsma.2016.11.008>.
30. Sonobe R, Wang Q. Hyperspectral indices for quantifying leaf chlorophyll concentrations performed differently with different leaf types in deciduous forests. *Ecol Inform*, 2017; 37(nov): 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoinf.2016.11.007>.
31. Shen Y, Li J, Gu R, Yue L, Zhan X, Xing B. Phenanthrene-triggered Chlorosis is caused by elevated Chlorophyll degradation and leaf moisture. *Environ Pollut*, 2017; 220(nov): 1311-1321. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.003>.
32. Silverstein RM, Webster FX. Identificação espectral de compostos orgânicos. 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2000.
33. Bachelard G. A Epistemologia. s.ª ed., Edições 70: Lisboa. 2000.
34. Oliveira A, Simonelli F, Marques F. Cromatografando com giz e espinafre: um experimento de fácil reprodução nas escolas do ensino médio. *Quim Nova Esc*, 1998; 7(mai): 37-38.
35. Yoshida K, Ito D, Shinkai Y, Kondo T. Change of color and components in sepals of chameleon *Hydrangea* during maturation and senescence. *Phytochem*, 2008; 69(18): 3159-3165.
36. Eid G, Albatal N, Haddad S. Effect of aluminum sulfate on the chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids and anthocyanin content in some cultivars of *Hydrangea (Hydrangea macrophylla)*. *Int J Hortic*, 2015; 5(9): 1-8. DOI: 10.5376/ijh.2015.05.0009.
37. Yoshida K, Toyama-Kato Y, Kameda K, Kondo T. Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant Cell Physiol*, 2003; 44(3): 262-268.
38. Kondo T, Toyama-Kato Y, Yoshida K. Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of *Hydrangea*. *Tetrahedron Lett*, 2005; 46(39): 6645-6649. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.07.146.
39. Toyama-Kato Y, Yoshida K, Fujimori E, Haraguchi H, Shimizu Y, Kondo T. Analysis of metal elements of *Hydrangea* sepals at various growing stages by ICP-AES. *Biochem Eng J*, 2003; 14(3): 237-241. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00220-6.

40. Kudritskaya S, Zagorodskaya L, Shishkina E. Carotenoids of the sea buckthorn, variety *Obil'naya*. *Chem Nat Compd*, 1989; 25(6): 724-725.
41. Xu F, Yuan Q, Dong H. Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. *J Chromatogr B*, 2006; 838(1): 44-49. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.04.004.
42. Sricharoen P, Limchoowong N, Techawongstien S, Chanthai S. A novel extraction method for β -carotene and other carotenoids in fruit juices using air-assisted, low-density solvent-based liquid-liquid microextraction and solidified floating organic droplets. *Food Chem*, 2016; 203(jul): 386-393. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.093.
43. da Silveira TFF, Meinhart AD, Coutinho JP, de Souza TCL, Cunha ECE, de Moraes MR, Godoy HT. Content of lutein in aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). *Food Res Int*, 2016; 82(April): 165-171. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.12.033.
44. Aman R, Biehl J, Carle R, Conrad J, Beifuss U, Schieber A. Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chem*, 2005; 92(4): 753-763. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.031.
45. Nhung DTT, Bung PN, Ha NT, Phong TK. Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food Chem*, 2010; 121(2): 326-331. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.032.
46. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Carotenoids, Vol. 4: Natural Functions. s.^a ed. 2008.
47. Schirmer RE. Modern Methods of Pharmaceutical Analysis. 2^a ed. 1982.
48. Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 1^a ed., UFRGS; Florianópolis: UFSC. 2001.
49. Ribeiro NM, Nunes CR. Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. *Quim Nova Esc*, 2008; 29(ago): 30-37.
50. Streit NM, Canterle LP, Canto MWd, Hecktheuer LHH. As clorofilas. *Cienc Rural*, 2005; 35(3): 748-755.
51. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids - Extraction, isolation and purification. . Chlorophylls and carotenoids - Extraction, isolation and purification. , 2001; 4(-): 2.1-F4.
52. Atkins PW. Moléculas. 1^a ed., Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo. 2002.
53. Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de Cromatografia. 1^a ed: Editora da Unicamp: Campinas. 2006.
54. Xavier AAO, Mercadante AZ, Domingos LD, Viotto WH. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Quim Nova*, 2012; 35(10): 2057-2062.
55. Barba AO, Hurtado MC, Mata MS, Ruiz VF, De Tejada MLS. Application of a UV-Vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chem*, 2006; 95(2): 328-336. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.02.028.