

CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA α -CRIPTOXANTINA E INCIDÊNCIA DE CAROTENÓIDES MINORITÁRIOS PROVITAMÍNICOS A EM VERDURAS FOLHOSAS VERDES¹

Adriana Z. MERCADANTE^{2*}, Délia RODRIGUEZ-AMAYA²

RESUMO

Numerosos trabalhos comprovaram que os carotenóides principais de folhas verdes são invariavelmente luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina. No entanto, há discordância em torno dos carotenóides minoritários. Portanto, a espectrometria de massas por impacto de elétrons e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos foram utilizados para confirmar a identidade de carotenóides minoritários com atividade provitamínica A em verduras folhosas brasileiras. Os carotenóides pró-vitamínicos A, incluindo os isômeros *cis* e *trans* de β -caroteno, foram separados em coluna de C₁₈ polimérica, Vydac 201TP54, com metanol/água (98:2) como fase móvel. Os espectros UV-visível e de massas confirmaram o carotenóide monoidroxilado como sendo α -criptoxantina e não β -criptoxantina como aponta a literatura internacional. Todas as onze folhas analisadas (agrião, alface crespa, alface lisa, almeirão, caruru, chicória, couve, espinafre, rúcula, salsinha e taioba) apresentaram α -criptoxantina, 13-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno, enquanto que α -caroteno foi encontrado em apenas quatro folhas (caruru, couve, salsinha e taioba).

Palavras-chave: carotenóides; espectrometria de massas; cromatografia líquida de alta eficiência; verduras folhosas verdes.

SUMMARY

CONFIRMATION OF THE IDENTITY OF α -CRYPTOXANTHIN AND INCIDENCE OF MINOR PROVITAMIN A CAROTENOIDS IN GREEN LEAFY VEGETABLES. The main carotenoids from green leafy vegetables have been consistently found to be lutein, β -carotene, violaxanthin and neoxanthin. However, there is a controversy about the identity of minor carotenoids. Therefore, electron impact mass spectrometry and high performance liquid chromatography with a diode array detector were used in order to confirm the identity of the minor provitamin A carotenoids in Brazilian green leaves. The provitamin A carotenoids, including the *cis* and *trans* isomers of β -carotene, were separated on a polymeric C₁₈ column, Vydac 201TP54, with MeOH/H₂O (98:2) as mobile phase. The UV-visible and mass spectra confirmed that the monohydroxy carotenoid present in Brazilian green leafy vegetable to be α -cryptoxanthin, and not β -cryptoxanthin as reported in the international literature. All eleven green leaves analyzed (water-cress, unheaded lettuce, lettuce, wild chicory, "caruru", common chicory, kale, spinach, endive, roquette, parsley, and "taioba") had α -cryptoxanthin, 9-*cis*- and 13-*cis*- β -carotene, whereas α -carotene was found in only four of these leaves ("caruru", kale, salsinha and "taioba").

Keywords: carotenoids; mass spectrometry; high performance liquid chromatography; green leafy vegetables.

¹ Recebido para publicação em 25/01/00. Aceito para publicação em 18/05/01. Parte da Tese de Doutorado da 1ª autora, realizada junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP

² Professora do Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Caixa Postal 6121, Campinas, 13083-970. E-mail: mercadan@obelix.unicamp.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

1 – INTRODUÇÃO

Segundo GOODWIN [18], os tecidos de plantas verdes superiores possuem quatro carotenóides principais: β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Esta afirmação foi comprovada em numerosos trabalhos. No entanto, há discordância, em torno dos carotenóides minoritários. Os pigmentos que são esporadicamente relatados, em pequenas quantidades, são: *cis*-isômeros de β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina e 5,6-epóxi-luteína.

ROUCHAUD *et al* [36] e o grupo de RODRIGUEZ-AMAYA [24, 25, 34] foram os únicos pesquisadores que encontraram α -criptoxantina ao invés de β -criptoxantina em folhas verdes. Nos trabalhos citados acima, a identificação foi baseada no espectro de absorção na região visível (λ_{\max} e forma), nas propriedades cromatográficas e nos três últimos estudos [24, 25, 34], também na reação de metilação que indicou a posição alílica da hidroxila. Como existem três possíveis carotenóides monoidroxilados (Figura 1), ainda existe na literatura internacional uma confusão sobre a identidade do carotenóide monoidroxilado presente em folhas verdes, sendo que na maioria dos trabalhos foi escolhido um ou outro sem a devida comprovação.

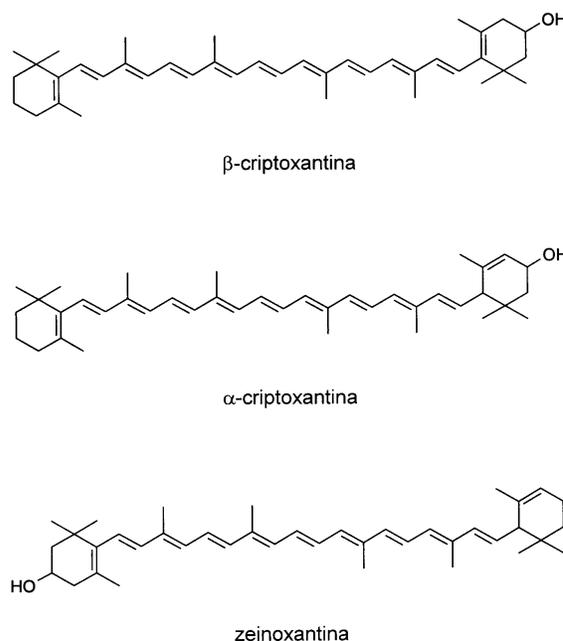


FIGURA 1. Estrutura dos carotenóides monoidroxilados: β -criptoxantina, α -criptoxantina e zeinoxantina.

A introdução da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na área de carotenóides em alimentos

permitiu a separação de um maior número de compostos, incluindo diversos isômeros geométricos, tornando ainda mais difícil a identificação conclusiva destes compostos. Desta forma, um grande número de trabalhos na literatura tem apresentado identificações equivocadas.

Um conjunto de parâmetros é utilizado para a identificação dos carotenóides: (a) espectro de absorção no UV-visível, (b) ordem de eluição na coluna cromatográfica, (c) co-cromatografia com amostras autênticas e (d) espectro de massas [23]. O uso do detector de arranjo de diodos (DAD) permite a obtenção "on line" dos espectros de absorção. A espectrometria de massas (EM) é uma técnica altamente recomendada para a confirmação da identidade de carotenóides e para a elucidação da estrutura de carotenóides desconhecidos, pois quase sempre fornece a massa molecular e alguns dos fragmentos obtidos por impacto de elétrons são indicativos dos grupos terminais. A EM foi largamente utilizada para a elucidação ou confirmação das estruturas de carotenóides em fungos, algas e bactérias. O seu maior uso para carotenóides em alimentos é um acontecimento mais recente [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32].

No presente trabalho, os parâmetros mencionados acima foram utilizados para confirmar a identidade dos carotenóides minoritários provitamínicos A em folhas verdes.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Amostras

As seguintes verduras folhosas foram compradas no comércio de Campinas e imediatamente levadas ao laboratório para análise: alfaces cressa e lisa (*Lactuca sativa*), caruru (*Amaranthus viridis*), couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), taioba (*Xanthosoma* spp.), agrião (*Nastrutium officinale*), salsinha (*Petroselinum hortense*), rúcula (*Eruca sativa*), almeirão (*Chicorium intybus*), chicória (*Chicorium endivia*) e espinafre (*Spinacea oleracea*). Cada maço de folha foi triturado separadamente em multiprocessador e retirada a quantidade necessária de amostra para análise por CLAE (aproximadamente 5g).

A α -criptoxantina foi extraída de dois maços de caruru (aproximadamente 100g), pois esta folha foi a que apresentou o maior teor de α -criptoxantina dentre as várias folhas previamente analisadas no Brasil [24, 25, 34].

2.2 – Etapas pré-cromatográficas

As etapas de extração e saponificação foram executadas de acordo com o método de RODRIGUEZ-AMAYA *et al* [35]. Apesar da saponificação não ter sido necessária para a separação dos carotenóides de folhas [24, 25], esta etapa foi incluída no presente trabalho com o intuito de eliminar lipídeos e clorofila a fim de facilitar o posterior isolamento e visualização dos carotenóides minoritários.

2.3 – Isolamento da α -criptoxantina

Para prevenir a contaminação dos carotenóides desde a extração até o isolamento final, não foram usadas

garrafas e pissetas plásticas, e a água destilada foi recolhida em recipiente de vidro [3, 6]. Além disso, todos os solventes grau P.A. foram destilados, e os peróxidos removidos do éter etílico (EE) pela adição de ferro reduzido antes da destilação. O EE, assim purificado, foi utilizado dentro de cinco dias.

Após extração dos carotenóides de caruru, o extrato saponificado foi aplicado em uma coluna de vidro, empacotada à vácuo com MgO/Hyflsupercel (1:2) até a altura de cerca de 10cm. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada ao topo da coluna para reter a água que ainda estivesse presente na amostra. A coluna foi molhada com éter de petróleo (EP) e, após aplicação da amostra, desenvolvida com proporções crescentes de EE em EP. A banda contendo α -criptoxantina foi eluída com 10 a 30% de EE em EP.

Após evaporação do solvente, a fração contendo α -criptoxantina foi acondicionada em ampola âmbar, selada sob atmosfera de N_2 e transportada, sem refrigeração, à Inglaterra. O carotenóide foi purificado por cromatografia em camada delgada de sílica, com EP:EE (3:2) como fase móvel. A banda principal, apresentando cor amarela e R_f 0,7, foi raspada e o carotenóide rapidamente extraído com EE, em funil de vidro sinterizado sob vácuo.

Imediatamente antes da EM, a α -criptoxantina foi re-purificada através de uma mini-coluna de alumina (grau III). Utilizou-se como fase móvel 10% de EE em EP para retirada de possíveis compostos menos polares que ainda estivessem presentes, e a α -criptoxantina foi eluída com 25 a 50% de EE em EP.

2.4 – Espectrometria de massas

Utilizou-se um espectrômetro de massas marca VG (VG Biotech., UK) modelo Quattro Triple Quadrupole. O carotenóide foi introduzido diretamente por sonda na câmara de ionização a 240°C. Empregou-se ionização por impacto de elétrons, com energia de 70eV.

A interpretação do espectro de massas foi baseada nas fragmentações características, disponíveis na literatura [14, 15, 16].

2.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Varian, com sistema ternário de bombeamento de solvente, modelo 9010, e válvula injetora "Rheodyne" com alça de amostra de 10 μ L de capacidade. O DAD da Waters, modelo 994, foi acoplado a um integrador-registrador Varian, modelo 4400. Os carotenóides foram separados em coluna polimérica de C_{18} , marca Vydac 201TP54 (5 μ m, 250 x 4,6mm), utilizando como fase móvel metanol/água (98:2) com vazão de 1,5mL/min [17]. Os cromatogramas foram obtidos a 445nm e os espectros entre 300 e 600nm.

Os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) e grau de estrutura fina (%III/II) dos espectros na região do visível foram comparados com os da literatura [5, 13] fornecendo uma primeira indicação da identidade dos carotenóides.

Para co-cromatografia foram utilizados padrões de β -caroteno e β -criptoxantina (Hoffmann-La Roche), e α -caroteno isolado de cenoura.

Todos os solventes utilizados, de grau cromatográfico, foram previamente filtrados à vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μ m e, a seguir, desgaseificados em ultra-som. A água utilizada foi obtida pelo sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore). Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,45 μ m.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Confirmação da identidade e incidência de α -criptoxantina

O espectro de absorção no visível, fornecido pelo DAD, da α -criptoxantina apresentou λ_{max} (420, 445,

472nm) e estrutura fina similares aos do α -caroteno (Figura 2), fornecendo uma primeira identificação.

O espectro de massas da α -criptoxantina (Figura 3) mostrou o íon molecular a m/z 552 (0,4%) e o fragmento característico de eliminação de água a m/z 534 (0,7%), indicando a presença de uma hidroxila na molécula. A maior intensidade do pico de 534 unidades de massa em relação ao do íon molecular ($[M]^+/[M-18]^+$ de 0,59) indicou que a hidroxila se encontrava em posição alílica. BRITTON & YOUNG [6] também reportaram valor abaixo de 1,0 para a razão citada acima para α -criptoxantina isolada de tecidos fotossintéticos. Devido à baixa concentração deste carotenóide, os picos de eliminação de tolueno e xileno da cadeia poliênica não foram observados (Figura 3).

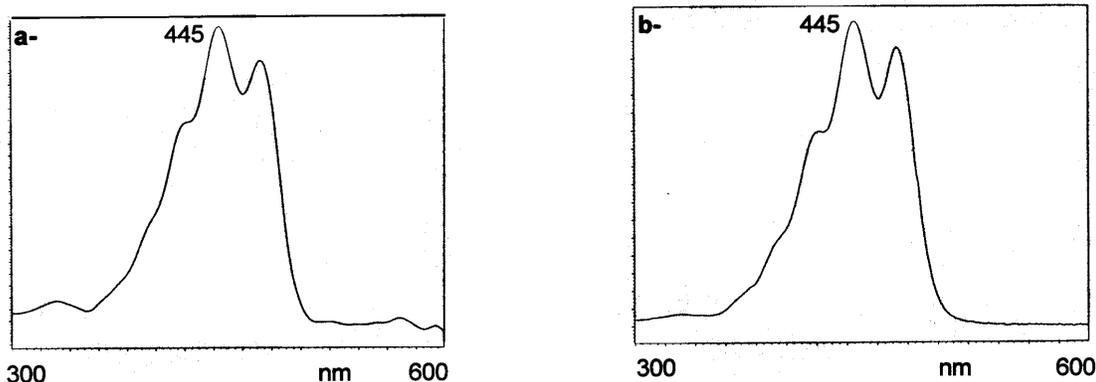


FIGURA 2. Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, em metanol-água (98:2), da a- α -criptoxantina e do b- α -caroteno.

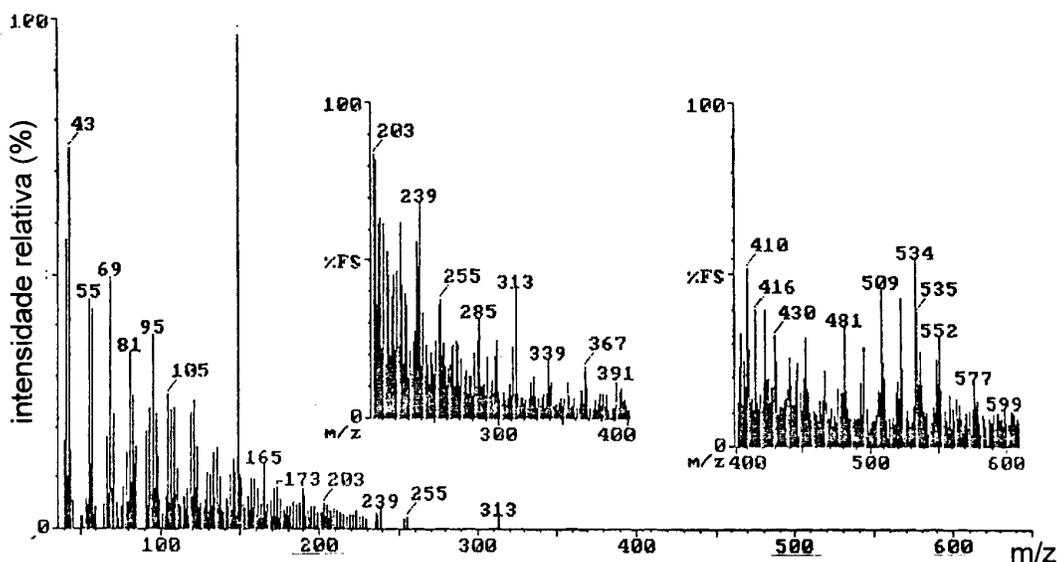


FIGURA 3. Espectro de massas de impacto de elétrons (70eV) da α -criptoxantina, isolada de caruru.

Todas as verduras folhosas analisadas neste estudo apresentaram α -criptoxantina ao invés de β -criptoxantina (Figura 4).

Esta é a primeira comprovação definitiva da presença de α -criptoxantina em plantas superiores. Até então, acreditava-se que o derivado monoidroxilado do

α -caroteno era zeinoxantina em plantas superiores, e α -criptoxantina em alga vermelha [20].

3.2 – Incidência de α -caroteno

Das 11 verduras folhosas verdes analisadas neste estudo, α -caroteno foi encontrado somente em 4 delas

(caruru, couve, salsinha e taioba), como exemplificado na Figura 4.

Além do espectro obtido pelo DAD (Figura 2), foi realizada co-cromatografia com α -caroteno isolado de cenoura (Figura 5).

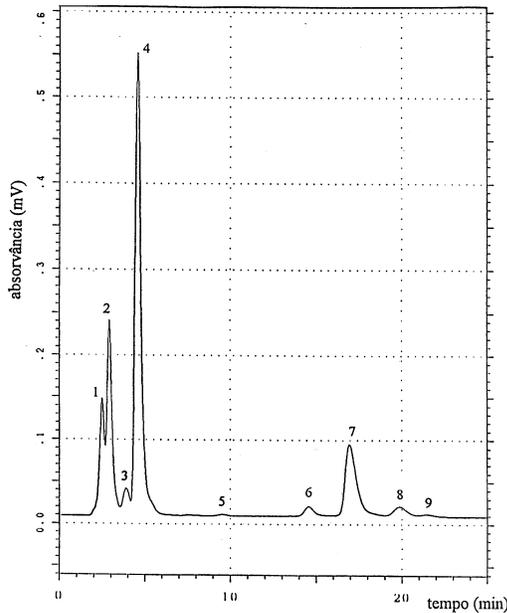


FIGURA 4. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de taioba. Picos: 1, 2, 3 e 4: poliidroxiados, 5: α -criptoxantina, 6: α -caroteno, 7: β -caroteno, 8: 13-*cis*- β -caroteno e 9: 9-*cis*- β -caroteno. Condições cromatográficas: coluna Vydac 201TP54 (5 μ m, 250 x 4,6mm), metanol/água (98:2) como fase móvel com vazão de 1,5mL/min.

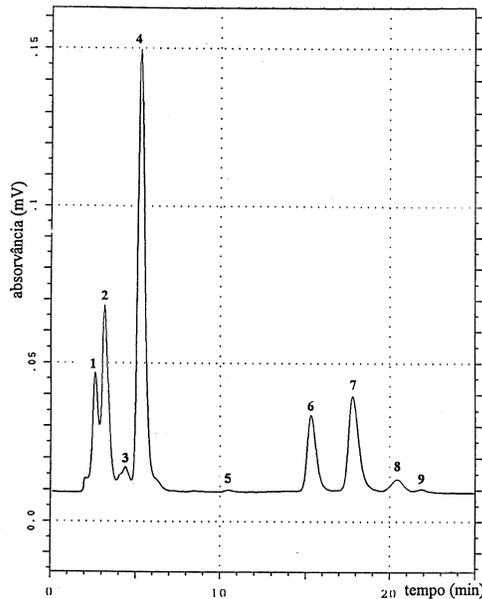


FIGURA 5. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de taioba fortificado com α -caroteno. Picos: 1, 2, 3 e 4: poliidroxiados, 5: α -criptoxantina, 6: α -caroteno, 7: β -caroteno, 8: 13-*cis*- β -caroteno e 9: 9-*cis*- β -caroteno. Condições cromatográficas: coluna Vydac 201TP54 (5 μ m, 250 x 4,6mm), metanol/água (98:2) como fase móvel com vazão de 1,5mL/min.

Dos inúmeros estudos encontrados na literatura sobre composição de carotenóides em folhas, verifica-se que, para a mesma folha, há diferentes relatos quanto à presença de α -caroteno, mesmo entre aqueles que empregaram o mesmo método de separação. A Tabela 1 apresenta esses trabalhos para quatro folhas, nos quais utilizou-se CLAE para a separação dos carotenóides. Dos sete estudos com espinafre, α -caroteno foi encontrado, em traços, apenas em um deles. Em couve e salsinha não foi detectado α -caroteno. Entretanto, em alface, a situação é dividida, já que três dos seis estudos apresentaram α -caroteno com teores variando de traços a 5,15 μ g/100g de amostra.

Como o α -caroteno esteve presente em pequenas quantidades, quando detectado, esta disparidade nos resultados pode ser explicada pelos diferentes níveis de detecção dos métodos e/ou pelo comprovado efeito das diferentes espécies e cultivares, do clima e do solo sobre o teor de carotenóides e presença dos minoritários em folhas [24]. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam ser a segunda explicação a mais provável, uma vez que as condições analíticas empregadas foram as mesmas para as 11 folhas estudadas.

Por outro lado, ALMEIDA-MURADIAN *et al* [2] relataram a presença de altos teores de α -caroteno em folhas de cenoura, chegando a 29% do total de carotenos em uma das cultivares. Esta alta porcentagem de α -caroteno, nunca relatada anteriormente por outros autores, aproxima-se mais da porcentagem deste carotenóide na raiz. Os autores separaram α - e β -caroteno por CLAE em fase reversa, mas a quantificação destes dois carotenos foi executada após separação em coluna de MgO:hyflosupercel.

TABELA 1. Incidência de α -caroteno em 4 verduras folhosas reportada da literatura.

Folha	α -caroteno	Referência ^a
alface	x	BUREAU & BUSHWAY [7]
	-	BUSHWAY [9]
	x	HEINONEN <i>et al</i> [21]
	x	ABDEL-KADER [1]
	-	TEE & LIM [37]
	-	GRANADO <i>et al</i> [19]
	-	presente trabalho
espinafre	x	BRAUMANN & GRIMME [4]
	-	BUREAU & BUSHWAY [7]
	-	BUSHWAY [9]
	-	KHACHIK <i>et al</i> [22]
	-	HEINONEN <i>et al</i> [21]
	-	ABDEL-KADER [1]
	-	TEE & LIM [37]
	-	GRANADO <i>et al</i> [19]
	-	NYAMBAKA & RYLEY [33]
	-	presente trabalho
couve	x	BUSHWAY [8]
	-	KHACHIK <i>et al</i> [22]
	-	CARVALHO <i>et al</i> [10]
	x	presente trabalho
salsinha	-	HEINONEN <i>et al</i> [21]
	-	YAMAUCHI & WATADA [39]
	x	presente trabalho

^aForam relacionados somente os trabalhos que utilizaram CLAE. x: presença; -: ausência.

3.3 – Incidência de *cis* isômeros de β -caroteno

Os carotenóides geralmente ocorrem na natureza na sua forma mais estável, que é a configuração *trans*. Os *cis* isômeros também podem existir naturalmente, em pequenas quantidades, e como possuem menor biopotência, a sua quantificação em separado vem sendo discutida.

No presente trabalho foi utilizado uma coluna C_{18} polimérica (Vydac 201TP54) capaz de separar os isômeros *cis* de β -caroteno [8]. A identificação foi baseada nos espectros de absorção fornecidos pelo DAD (Figura 6), pois os isômeros *cis* apresentam λ_{max} ligeiramente mais baixos e decréscimo no grau de estrutura fina do que a forma *trans*, aparecimento do pico *cis* na região ultravioleta e comparação da ordem de eluição na coluna com os trabalhos de BUSHWAY [8] e de GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA [17] que utilizaram exa-

tamente as mesmas condições cromatográficas empregadas neste estudo. Neste último trabalho [17] a identidade dos isômeros *cis* foi confirmada por co-cromatografia com padrões isolados por cromatografia em coluna aberta de hidróxido de cálcio, pois já havia sido demonstrado através de ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 a identidade dos isômeros de β -caroteno separados neste mesmo tipo de coluna [38].

Todas as verduras folhosas verdes analisadas no presente estudo apresentaram 9-*cis*- e 13-*cis*- β -caroteno (Figura 4), confirmando os registros da literatura [11, 12, 17, 33]. KHACHIK *et al* [22] relataram a presença de 15-*cis*- β -caroteno em quatro vegetais verdes, entretanto, estes mesmos autores reconheceram, mais tarde, que se tratava na verdade de uma mistura de 13-*cis*- e 15-*cis*- β -caroteno.

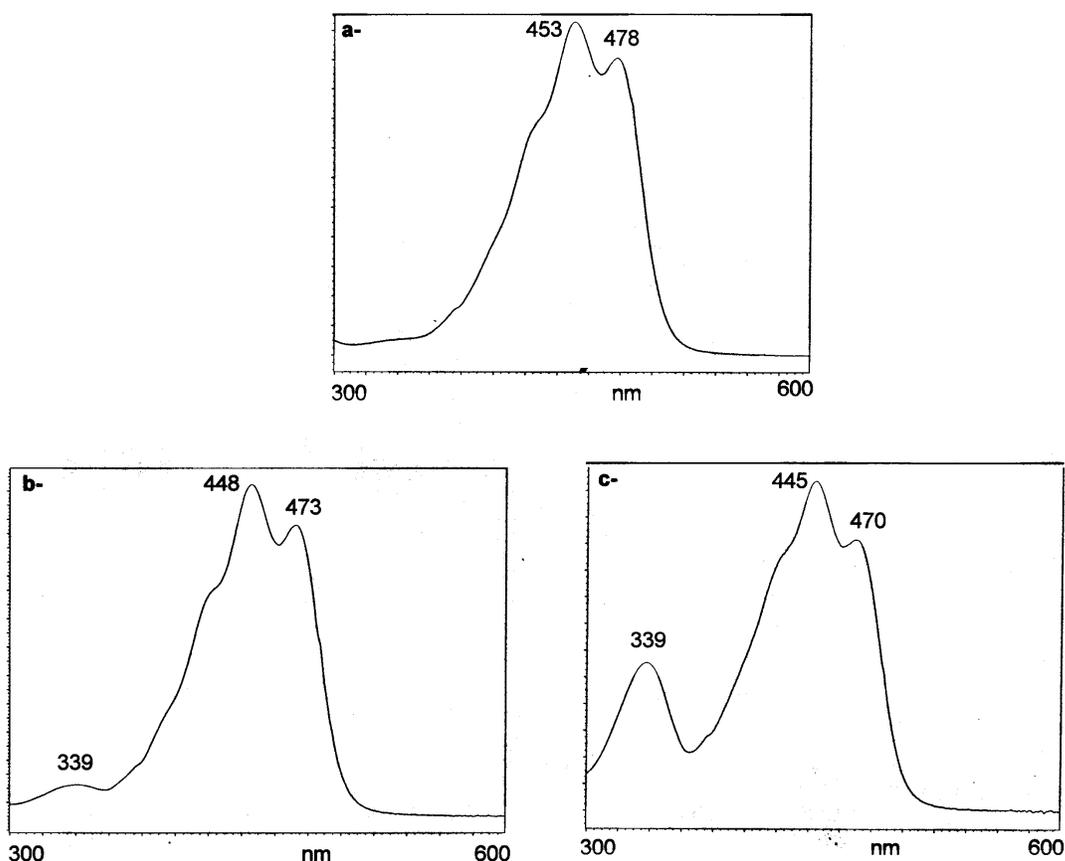


FIGURA 6. Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, em metanol-água (98:2), da a- α -all-*trans*- β -caroteno, b- 9-*cis*- β -caroteno e c- 13-*cis*- β -caroteno.

4 – CONCLUSÕES

- A identidade do carotenóide monoidroxilado das verduras folhosas verdes foi confirmada inequivocadamente como sendo α -criptoxantina.
- Todas as onze verduras folhosas verdes analisadas apresentaram os seguintes carotenóides minoritários próvitamínicos A: α -criptoxantina, 9-*cis* e 13-*cis*- β -caroteno.
- Somente caruru, couve, salsinha e taioba apresentaram α -caroteno.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDEL-KADER, Z.M. Determination of carotenoids in foods by high-performance liquid chromatography. **Die Nahrung**, v.35, p.689-93, 1991.
- [2] ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; POPP, V. & FARIAS, M.P. Provitamin A activity of Brazilian carrots: leaves and roots, raw and cooked and their chemical composition. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, p. 120-4, 1997.
- [3] BIEMANN, K. Mass Spectrometry. In: **Organic Chemical Applications**. New York: Mc Graw Hill, 1962. p. 170-173.
- [4] BRAUMANN, T. & GRIMME, L.H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.637, p.8-17, 1981.
- [5] BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.) **Carotenoids: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995. vol 1B, p. 13-62.
- [6] BRITTON, G.; YOUNG, A.J. Methods for the Isolation and Analysis of Carotenoids. In: YOUNG, A.; BRITTON, G. (Eds.) **Carotenoids in Photosynthesis**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 409-457.
- [7] BUREAU, J.L.; BUSHWAY, R.J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. **J. Food Sci.**, v.51, p. 128-30, 1986.
- [8] BUSHWAY, R.J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 8, p. 1527-47, 1985.
- [9] BUSHWAY, R.J. Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v.34, p. 409-12, 1986.
- [10] CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v.33, p.133-7, 1992.
- [11] CHANDLER, L.A.; SCHWARTZ, S.J. HPLC separation of *cis-trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. **J. Food Sci.**, v. 52, p. 669-72, 1987.
- [12] CHANDLER, L.A.; SCHWARTZ, S.J. Isomerization and losses of *trans*- β -carotene in sweet potatoes, as affected by processing treatments. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 129-33, 1988.
- [13] DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (Ed.) **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press. Vol 2, p. 38-165, 1976.
- [14] ENZELL, C. R. Mass spectrometric studies of carotenoids. **Pure Appl. Chem.** v. 20, p. 497-515, 1969.
- [15] ENZELL, C.R.; FRANCIS, G.W.; LIAAEN-JENSEN, S. Mass spectrometric studies of carotenoids. 2. Survey of fragmentation reactions. **Acta Chem. Scand.** v. 3, p. 727-50, 1969.
- [16] ENZELL, C.R.; BACK, S. Mass Spectrometry. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.) **Carotenoids: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995. vol 1B, p. 261-320.
- [17] GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.1306-13, 1994.
- [18] GOODWIN, T.W. Distribution of Carotenoids. In GOODWIN, T.W. (Ed.) **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2nd ed. London: Academic Press, 1976. p 225-57.
- [19] GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I.; ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, p. 2135-40, 1992.
- [20] GROSS, J. **Pigments in Fruits**. London, Academic Press, 1987. p. 87-258.
- [21] HEINONEN, M.I.; OLLIAINEN, V.; LINKOLA, E.K.; VARO, P.T.; KOIVISTOINEN, P.E. Carotenoids in Finish foods: vegetables, fruits, and berries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, p. 655-9, 1989.
- [22] KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; WHITTAKER, N.F. Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v.34, p. 603-16, 1986.
- [23] LIAAEN-JENSEN, S. Combined Approach: Identification and Structure Elucidation of Carotenoids. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.) **Carotenoids: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995. vol 1B, p. 343-354.
- [24] MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. **J. Agric. Food Chem.**, v.39, p.1094-7, 1991.
- [25] MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. **Intern. J. Food Sci. and Technol.**, v.25, p.213-9, 1990.
- [26] MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; BRITTON, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.120-3, 1997.
- [27] MERCADANTE, A.Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.4102-6, 1998.
- [28] MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 145-151, 1999.
- [29] MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; PFANDER, H.; BRITTON, G. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochem.**, v. 41, p. 1201-1203, 1996.
- [30] MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 1050-1054, 1997.
- [31] MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.**, v. 46, p. 1379-1383, 1997.
- [32] MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.**, v. 52, p. 135-139, 1999.
- [33] NYAMBAKA, H.; RYLEY, J. An isocratic reversed-phase HPLC separation of the stereoisomers of the provitamin A carotenoids (α - and β -carotene) in dark green vegetables. **Food Chem.**, v.55, p.63-72, 1996.
- [34] RAMOS, D.M.R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** v.3, p.147-55, 1987.
- [35] RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T.; ARIMA, H.K. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrometry. **J. Chromatogr. Sci.**, v.25, p.624-9, 1988.

- [36] ROUCHAUD, J.; MOONS, C.; MEYER, J.A. The effects of selected herbicide and fungicide treatments on the carotenes and xanthophylls in lettuce. **J. Hort. Sci.**, v.60, p.245-9, 1985.
- [37] TEE, E.-S.; LIM, C.-L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. **Food Chem.**, v. 41, p. 309-39, 1991.
- [38] TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T.; KOYAMA, Y. Structural elucidation of the main *cis*- β -carotenes. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 27, p. 551-561, 1981.

- [39] YAMAUCHI, N.; WATADA, A.E. Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled or ethylene containing atmosphere. **J. Food Sci.**, v.58, p.616-8, 1993.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro do MCT/FINEP/PRONEX.