



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GILSANDRO ALVES DA COSTA

CAROTENOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Spondias* DO NORDESTE
BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO E BIOACESSIBILIDADE

“CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS OF *Spondias* FROM THE
BRAZILIAN NORTHEAST: COMPOSITION AND BIOACCESSIBILITY”

CAMPINAS

2018

GILSANDRO ALVES DA COSTA

**CAROTENOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Spondias* DO NORDESTE
BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO E BIOACESSIBILIDADE**

**CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS OF *Spondias* FROM THE
BRAZILIAN NORTHEAST: COMPOSITION AND BIOACCESSIBILITY**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Science.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Gilsandro Alves da Costa, orientado pela Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante.

Supervisor/Orientadora: ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C823c Costa, Gilsandro Alves da, 1979-
Carotenoides e compostos fenólicos de *Spondias* do Nordeste brasileiro : composição e bioacessibilidade / Gilsandro Alves da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutas tropicais. 2. LC-MS/MS. 3. *Spondias*. 4. Carotenoides. 5. Fenólicos. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Carotenoids and phenolic compounds of *Spondias* from the brazilian northeast: : composition and bioacessibility

Palavras-chave em inglês:

Tropical fruits

LC-MS/MS

Spondias

Carotenoids

phenolics

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante

Leila Queiroz Zepka

Lilian Regina Barros Mariutti

Renata Aparecida Soriano Sancho

Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Data de defesa: 20-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Comissão Examinadora:

Profª Drª Adriana Zerlotti Mercadante (Orientadora)

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profª Drª Leila Queiroz Zepka (Membro Titular)

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Profª Drª Lilian Regina Barros Mariutti (Membro Titular)

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof. Drª Renata Aparecida Soriano Sancho (Membro Titular)

Pesquisadora

Profª Drª Solange Guidolin Caniatti Brazaca (Membro Titular)

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ, USP

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Ainda sinto o suor e o coração disparado, parece que foi ontem!

Certa noite fui surpreendido com uma mensagem que me veio através de um sonho. A realidade se misturava com a fantasia, mensagem no formato de parábola. Aquele vidro era tão grande e a ladeira tão íngreme que mal podia suportar, a angústia de não ter chegado ao destino me fez parar no meio da ladeira e pensar.

Será que chegarei ao meu destino?

Será que eu consigo Senhor?

Esse vidro é muito grande e pesado. Como alguém pode levar?

E com a ajuda Dele, eu finalmente consegui chegar ao destino.

Muito ofegante, coração palpitando e encharcado de suor, mas satisfeito.

Deus, Tu és o autor de minha vida! Aquele quem usa a quem quer, na hora que quer, cujo o caráter não muda e sobre quem repousa a verdade.

Quando me deste esse sonho nem imaginava que se tratava de algo tão especial.

Esse trabalho é dedicado ao Senhor, que velou por sua palavra, e fez com que se cumpri-se tudo aquilo que me foi dito.

Obrigado Pai!

Este trabalho é dedicado a Ti.

AGRADECIMENTO

À minha esposa, Patricia de kássia Coutinho Pereira Costa, que com amor entendeu e participou de forma intensa na concretização desse plano de Deus em nossas vidas. Te Amo!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Adriana Zerlotti Mercadante, pela amizade, conhecimentos, profissionalismo e suporte cedidos para que esse trabalho fosse uma realidade. Peço a Deus que continue a te abençoar com força e vigor para que a Ciência em nosso País continue a crescer.

À Unicamp, em particular, ao corpo docente e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela contribuição indispensável. Aos colegas e funcionários do Laboratório de Química de Alimentos, pelo agradável convívio diário e pela troca de experiências. Levarei para sempre a recordação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que de forma inderita tem uma participação em todo o trabalho aqui realizado.

À banca examinadora pela disponibilidade, atenção e sugestões.

Às pessoas mais importantes da minha vida, minha família. Meus pais, Antônio Viera da Costa e Linadaura Alves da Costa, a meus irmãos, Gilson Alves da Costa, Juliana Alves da Costa e Édipo de Brito Alves, e sobrinhos, Julia Vitória Alves Dantas e Bruno Alves Souza, e a minha segunda família, Jose Pereira, Terezinha Martins e Diego Coutinho, e aos meus Tios, a todos esses quero agradecer pela torcida e vibração nas conquistas e pela constante presença nas dificuldades. Pelo amor sem medida, dedicação, confiança, conselhos, orações e muitas vezes até renúncias. Muito Obrigado! Amo Vocês!

Aos amigos que fizeram parte da minha caminhada até aqui. Obrigada por estarem sempre presentes e compartilhando comigo todos os momentos. Conexão CV novos e antigos, Mafia, Amigos da Mari, Dr. Gilsandro Professor, DGTA, Bonde do Gil, Chacara Barão, GB BC I, Amo vocês!

Agradeço a Deus, acima de tudo, pela vida, força, coragem, oportunidade e pelas pessoas especiais que colocou em meu caminho.

RESUMO

O Nordeste brasileiro é uma região que apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento de algumas espécies da flora que são consideradas exóticas e dentre essas podemos destacar as frutas do gênero *Spondias*. Os frutos do gênero *Spondias* apresentam alto potencial não só para consumo *in natura* como também para o uso no processamento de polpas, sucos, geleias, sorvetes, compotas e doces. Do ponto de vista fitoquímico, as espécies do gênero *Spondias* se destacam por serem ricas em compostos bioativos; no entanto, um grande número de substâncias bioativas nessas espécies ainda são desconhecidas. Assim, esse trabalho objetivou separar, identificar e quantificar carotenoides, ésteres de carotenoides e compostos fenólicos usando HPLC-DAD-MS/MS em cajá (*Spondias mombin* L.), umbu (*Spondias tuberosa*), umbu-cajá (*Spondias* spp.) e seriguela (*Spondias purpurea*), como também avaliar a bioacessibilidade *in vitro* dos carotenoides e seus ésteres em bebidas preparadas com polpa de cajá. De uma forma geral, as espécies de *Spondias* estudadas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico de carotenoides e ésteres de carotenoides, com exceção da seriguela. Os teores de carotenoides totais encontrados foram: $192,39 \pm 8,20$ ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$) em cajá, $74,58 \pm 1,73$ ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$) em seriguela, $28,07 \pm 2,04$ ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$) em umbu e $125,76 \pm 4,21$ ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$) em umbu-cajá. Considerando todas as frutas do gênero *Spondias*, os carotenoides majoritários foram (all-*E*)-luteína, (all-*E*)- β -criptoxantina, (all-*E*)- β -caroteno, (all-*E*)- β -criptoxantina laurato e (all-*E*)- β -criptoxantina miristato. A rutina foi o composto fenólico majoritário em cajá, umbu e umbu-cajá, e o galoil-HHDP-hexosideo foi o majoritário na seriguela. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada por HPLC-DAD através de curvas analíticas de ácido gálico, rutina e quercetina, obtendo-se $405,51 \pm 10,26$ $\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$, $202,64 \pm 3,79$ $\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$, $179,77 \pm 6,65$ $\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$ e $179,55 \pm 0,57$ $\mu\text{g.g}^{-1}\text{bs}$ em cajá, seriguela, umbu e umbu-cajá, respectivamente. O aumento da bioacessibilidade dos carotenoides em bebida de cajá acompanhou o aumento na quantidade de lipídios existentes no leite adicionado à bebida; a adição de açúcar aumentou a bioacessibilidade em uma extensão similar de todos os carotenoides na ordem água>leite desnatado>leite integral.

ABSTRACT

The Brazilian Northeast is a region that presents favorable conditions for the development of some species of flora that are considered exotic, among which we can highlight the fruits of the genus *Spondias*. The fruits of the genus *Spondias* present high potential not only for *in natura* consumption but also for the use in the processing of pulps, juices, jellies, ice-creams and sweets. From the phytochemical point of view, the species of the genus *Spondias* stand out because they are rich in bioactive compounds; however, a large number of bioactive substances in these species are still unknown. Thus, this work aims to separate, identify and quantify carotenoids, carotenoid esters and phenolic compounds using HPLC-DAD-MS MS in cajá (*Spondias mombin* L.), umbu (*Spondias tuberosa*), umbu-cajá (*Spondias* spp.) and seriguela (*Spondias purpurea*), as well as to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of carotenoids and their esters in beverages prepared with cajá pulp. In general, the evaluated *Spondias* species presented the same chromatographic profile of carotenoids and carotenoid esters, except for seriguela. The total carotenoids contents were: 192.39 ± 8.20 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in cajá, 74.58 ± 1.73 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in seriguela, 28.07 ± 2.04 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu and 125.76 ± 4.21 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu-cajá. Considering all fruits of the genus *Spondias*, the major carotenoids were (all-*E*)-lutein, (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)- β -carotene, (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate and (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate. The phenolic compound rutin was the major one in *Spondias mombin*, *Spondias tuberosa* and *Spondias* spp., and galoyl-HHDP-hexoside 1 was the major in *Spondias purpurea*. The quantification of the total phenolic compounds was carried out by HPLC-DAD through analytical curves of gallic acid, rutin and quercetin, with 405.51 ± 10.26 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$, 202.64 ± 3.79 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$, 179.77 ± 6.65 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ and 179.55 ± 0.57 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ in cajá, seriguela, umbu and umbu-cajá, respectively. The increased bioaccessibility of carotenoids in cajá beverage accompanied the increase in the amount of lipids in the milk added to the beverage; the addition of sugar increased the bioaccessibility in a similar extent for all carotenoids in the order water > skimmed milk > whole milk.

SUMÁRIO

CAPITULO I INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CAPITULO II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. <i>Spondias</i> do Nordeste brasileiro	23
2. Carotenoides	26
2.1. Biossíntese de carotenoides	29
2.2. Ésteres de carotenoides	29
3. Compostos fenólicos	32
3.1. Estrutura dos compostos fenólicos	33
4. Compostos bioativos em frutas do gênero <i>Spondias</i>	36
4.1. Compostos bioativos em cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	36
4.2. Compostos bioativos em umbu (<i>Spondias tuberosa</i>)	37
4.3. Compostos bioativos em umbu-cajá (<i>Spondias</i> spp.)	41
4.4. Compostos bioativos em seriguela (<i>Spondias purpurea</i> L.)	43
5. Bioacessibilidade de carotenoides	43
6. Referências Bibliográficas	46

CAPITULO III Identification and Quantification of Carotenoid Esters in Fruits of the Genus *Spondias*

ABSTRACT	60
1. Introduction	61
2. Materials and methods	62
2.1. <i>Materials</i>	62
2.2. <i>Samples</i>	62
2.3. <i>Carotenoid extraction</i>	63
2.4. <i>HPLC-DAD-MS/MS analysis</i>	63
3. Results and discussion	64
3.1. <i>Identification of free carotenoids and carotenoid esters in Spondias</i>	64
3.2. <i>Identification of chlorophyll derivatives</i>	72
3.3. <i>Quantitative composition of carotenoids</i>	72
4. Literature cited	76

CAPITULO IV IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-DAD-MS/MS DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ESPÉCIES DE *SPONDIAS*

RESUMO	82
INTRODUÇÃO	83
MATERIAL E MÉTODOS	85

PADRÕES E REAGENTES	85
AMOSTRAS DE FRUTOS	85
PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	86
ANÁLISE EM HPLC-DAD-MSⁿ	86
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	87
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	87
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	97
CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	100

CAPITULO V

***In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages**

ABSTRACT	108
1. Introduction.....	108
2. Materials and metods	109
2.1. Materials.....	109
2.2. Samples	109
2.3. In vitro bioaccessibility analysis.....	109
2.4. Carotenoid analysis.....	109
2.4.1. Extraction from pulp and beverages.....	109
2.4.2. Determination of total carotenoid content by UV/Vis spectrophotometry....	109
2.4.3. HPLC-DAD-MS/MS	110
2.5. Statistical analysis.....	110
3. Results and discussion.....	110
3.1. Carotenoids in cajá frozen pulp	110
3.2. Carotenoid bioaccessibility in pulp based beverages	112
4. Conclusions.....	113
References	114

DISCUSSÃO GERAL.....	115
-----------------------------	------------

CONCLUSÃO GERAL.....	119
-----------------------------	------------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
---	------------

ANEXOS	146
---------------------	------------

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em 2014, o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor de frutas no mundo de acordo com a FAO (Reetz et al., 2014). Um considerável percentual da produção nacional de frutas é atribuído à região Nordeste do Brasil, a qual apresenta condições edafo-climáticas favoráveis ao desenvolvimento da atividade de fruticultura (de Souza et al., 2017). A região Nordeste do Brasil apresenta uma rica diversidade de frutas, em especial aquelas que são consideradas exóticas e exclusivas da região (Santos et al., 2012; Fernandes & Araújo, 2011; de Almeida et al., 2008; Mota et al., 2008; Torres et al., 2003). As frutas do gênero *Spondias* são sazonais e climatéricas; no entanto, podem ser encontradas na forma de polpa durante todo o ano em diversas regiões do Brasil (de Moura et al., 2013).

Existem 17 espécies do gênero *Spondias* descritas, das quais 7 são nativas da região neotropical que vai do Sul dos EUA e compreende toda a América Central e América do Sul. Existem também algumas espécies nativas da Ásia Central (Hazra et al., 2008). As espécies *Spondias tuberosa* (umbu) e *Spondias* spp. (umbu-cajá) são descritas na literatura como sendo nativas da região Nordeste do Brasil (Mertens et al., 2017; Ritzinger et al., 2008). Por outro lado, *Spondias mombin* L. (cajá) e *Spondias purpurea* L. (seriguela), mesmo sendo nativas de outras regiões, adaptaram-se bem ao clima e são facilmente encontradas no Nordeste brasileiro (Genovese et al., 2008; Lira Junior et al., 2005).

As espécies de *Spondias* encontradas no Nordeste brasileiro são procedentes de plantios não comerciais e desordenados. No entanto, a produção tem grande significado econômico para a região, que comercializa as frutas não só na forma *in natura* como também destina às indústrias para a produção de sorvetes, polpas, sucos, geleias, entre outros (Ribeiro et al., 2017; Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2015; Vieira et al., 2014; Moura et al., 2011).

Os frutos do gênero *Spondias* são apreciados para consumo por possuírem aroma agradável e serem ricos em compostos bioativos. Estes fatos despertaram o interesse da comunidade científica nos últimos anos, que tem publicado inúmeros estudos que vão desde a caracterização e aproveitamento

até o uso farmacológico e medicinal das frutas deste gênero (Gouvêa et al., 2017; Muñoz-López et al., 2017; Neiens et al., 2017; Mohiuddin et al., 2016; Giuffrida et al., 2015; Gomes et al., 2013; Silva et al., 2005; Ceva-Antunes et al., 2003).

Os compostos bioativos dos frutos do gênero *Spondias* foram estudados, porém a maioria dos estudos apresentam a quantidade total de carotenoides ou a quantidade total de compostos fenólicos. Poucos trabalhos descrevem a identificação desses compostos, a qual foi realizada com base em comparações com os poucos padrões disponíveis comercialmente e espectros UV-vis (Giuffrida et al., 2015; Moreira et al., 2012; Almeida et al., 2011; Melo & Andrade, 2010; Gonçalves et al., 2010; Genovese et al., 2008; Hamano & Mercadante, 2001).

Compostos bioativos provenientes da dieta humana contribuem para a diminuição dos riscos no desenvolvimento de inúmeras doenças, como as crônicas degenerativas, o câncer, as cardiovasculares, a catarata, a degeneração macular e inflamações como a aterosclerose, entre outras. Uma das hipóteses para tais ações benéficas se deve ao fato de que essas substâncias bioativas funcionam como antioxidantes que desativam os radicais livres, e dessa forma retardam o envelhecimento celular (Stanner et al., 2004; Braca et al., 2002; Lampe, 1999; Serdula et al., 1996; Maxwell, 1995).

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela cor em frutas e vegetais, que varia do amarelo ao laranja (Buena et al., 2014; Britton, 1995). Os carotenoides mono ou di-hidroxilados (xantofilas) estão esterificados com ácidos graxos na maioria das frutas (Breithaupt & Bamedi, 2001).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas como resposta a situações críticas e de estresse. Os compostos fenólicos podem ser encontrados em todas as partes das plantas como caules, folhas e frutos. No entanto, as maiores concentrações podem estar disponíveis em partes específicas da planta, e no caso dos frutos, a casca pode apresentar maior teor de compostos fenólicos em relação à polpa (Shahidi & Naczsk, 2011; Andrés-Lacueva et al., 2010).

A bioacessibilidade de carotenoides é um termo usado para se referir à fração de carotenoides que é liberada do alimento ingerido na dieta, tornando-se acessível para ser absorvido no organismo (Fernández-García et al., 2012).

Inúmeros fatores como a complexidade da matriz alimentar, os distintos processos tecnológicos aplicados aos alimentos, quantidade de lipídios nos alimentos, dentre outros, influenciam a bioacessibilidade dessas substâncias (da Costa & Mercadante, 2017; Rodrigues et al., 2016; Xavier et al., 2014; Fernández-García et al., 2012; Parker, 1996). O estudo da bioacessibilidade de substâncias presentes nos alimentos ganhou novo rumo após a publicação de um método padronizado pela ação COST denominada INFOGEST. Este protocolo apresenta-se como alternativa aos métodos *in vivo* e *in vitro* que muitas vezes são dispendiosos e sem padronização (Minekus et al., 2014).

Inúmeros fatores estão envolvidos no processo de liberação e absorção de carotenoides pelo organismo (Parker, 1996). Os carotenoides presentes em tomate tornam-se mais disponíveis para serem absorvidos quando o mesmo é submetido a um processo de homogeneização, provando que a matriz pode causar efeito na bioacessibilidade dessas substâncias. Além do processamento, o tipo de carotenoide também influencia esse processo (Panozzo et al., 2013). No entanto, ainda existem poucas informações sobre o processo de bioacessibilidade de carotenoides em produtos alimentícios (Granado-Lorencio et al., 2010).

Frutas e vegetais ricos em carotenoides precisam ser submetidas a testes de bioacessibilidade com a finalidade de identificar e quantificar os compostos disponíveis para absorção no organismo humano.

Assim, as frutas do gênero *Spondias* do nordeste brasileiro foram escolhidas para o estudo mais aprofundado de alguns compostos bioativos (carotenoides e fenólicos), como também para apontar o quanto carotenoides e seus ésteres podem de fato estar disponíveis para exercer as funções no organismo.

2. OBJETIVOS

O estudo foi conduzido a fim de atender os seguintes objetivos:

1. Separar, identificar e quantificar carotenoides livres e ésteres de carotenoides em frutos de cajá (*Spondias mombin* L.), umbu-cajá

- (*Spondias* spp.), umbu (*Spondias tuberosa*) e seriguela (*Spondias purpurea* L.);
2. Separar, identificar e quantificar compostos fenólicos em frutas de cajá (*Spondias mombin* L.), umbu-cajá (*Spondias* spp.), umbu (*Spondias tuberosa*) e seriguela (*Spondias purpurea* L.);
 3. Determinar a bioacessibilidade *in vitro* de carotenoides livres e ésteres de carotenoides em bebidas elaboradas a partir da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155-2159.

Andrés-Lacueva, C., Medina-Remon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rochetes-Ribalta, M. & Lamuela-Raventos, R. M. (2010). Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, 53-80.

Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 379-381.

Breithaupt, D. E., & Bamedi, A. (2001). Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on β -cryptoxanthin esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2064-2070.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9, 1551-1558.

Bunea, A., Socaciu, C., & Pinte, A. (2014). Xanthophyll esters in fruits and vegetables. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 310.

Ceva-Antunes, P. M. N., Bizzo, H. R., Alves, S. M., & Antunes, O. A. C. (2003). Analysis of volatile compounds of taperebá (*Spondias mombin* L.) and cajá (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and solid phase microextraction (SPME). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1387-1392.

da Costa, G. A. & Mercadante, A. Z. (2017). *In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. In Press. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.02.012

de Almeida, E. J., Torrecillas Scalopii, E. M., de Jesus, N., Martins, G., & Baldo, A. (2008). Propagação de jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.) por estaquia de ramos herbáceos. *Bioscience Journal*, 24, 39-45.

de Moura, F. T., de Melo Silva, S., Schunemann, A. P., & Martins, L. P. (2013). Frutos do umbuzeiro armazenados sob atmosfera modificada e ambiente em diferentes estádios de maturação. *Revista Ciência Agronômica*, 44, 764.

de Souza, S. F., da Silva, J. L. M., Guedes, J. P. M., & de Lima, J. R. F. (2017). Competitividade e parcela de mercado das exportações brasileiras de manga: uma análise do modelo Constant Market Share. *Revista Econômica do Nordeste*, 47, 39-48.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérda, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.

Fernandes, D. R. R., & Araújo, E. L. (2011). Occurrence of *Zaprionus indianus* gupta (Diptera: Drosophilidae) in "juazeiro" fruits *Ziziphus joazeiro* mart.

(rhamnaceae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 1356-1358.

Genovese, M. I., Pinto, M. S., Gonçalves, A. E. S. S., & Lajolo, F. M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14, 207-214.

Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., & Murillo, E., (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70, 163-172.

Gomes, E. B., Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., Miranda, R. C. M., Nigam, N., & Narain, N. (2013). A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 1-10.

Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4666-4674.

Gouvêa, R. F., Ribeiro, L. O., Souza, É. F., Penha, E. M., Matta, V. M., & Freitas, S. P. (2017). Effect of enzymatic treatment on the rheological behavior and vitamin C content of *Spondias tuberosa* (umbu) pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2176-2180.

Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B., Delgado-Pando, G., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Lutein-enriched frankfurter-type products: physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 120, 741-748.

Hamano, P. S., & Mercadante, A. Z. (2001). Composition of carotenoids from commercial products of cajá (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition Analysis*, 14, 335-343.

Hazra, B., Biswas, S., & Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 8, 63.

Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475-490.

Maxwell, S. R. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49, 345-361.

Melo, E. A., & Andrade, R. A. M. S. (2010). Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. *Alimentos e Nutrição*, 21, 453-457.

Mertens, J., Germer, J., Siqueira Filho, J. A., & Sauerborn, J. (2017). *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), a threatened tree of the Brazilian Caatinga?. *Brazilian Journal of Biology*, 77, 542-552.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb, A., (2014). Standardised static in vitro digestion method suitable for food an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.

Mohiuddin, M., Arbain, D., Shafiqul Islam, A. K. M., Ahmad, M. S., & Ahmad, M. N. (2016). Alpha-glucosidase enzyme biosensor for the electrochemical measurement of antidiabetic potential of medicinal plants. *Nanoscale Research Letters*, 11, 95.

Moura, C. L. A., Pinto, G. A. S., & Figueiredo, R. W. (2011). Processamento e utilização da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). *Boletim CEPPA*, 29, 237-252.

Moreira, A. C. C. G., Nascimento, J. D. M., Andrade, R. A. M. S., Maciel, M. I. S., & Melo, E. A. (2012). Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de cajá-umbuzeiras. *Alimentos e Nutrição*, 23, 235-241.

Mota, D. M. D., Schmitz, H., & Silva Júnior, J. F. D. (2008). Atores, canais de comercialização e consumo da mangaba no nordeste brasileiro. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 46, 121-143.

Muñoz-López, C., Urrea-Garcia, G. R., Jiménez-Fernandez, M., Rodríguez-Jiménes, G. del C., & Guadalupe Luna-Solano, G. (2017). Effect of drying methods on the physicochemical and thermal properties of Mexican plum (*Spondias purpurea* L.). *CyTA - Journal of Food*, 16, 127-134.

Neiens, S. D., Geißlitz, S. M., & Steinhaus, M. (2017). Aroma-active compounds in *Spondias mombin* L. fruit pulp. *European Food Research and Technology*, 243, 1073-1081.

Oliveira, E. N. A., Santos, D. C., Rocha, A. P. T., & Gomes, J. P. (2015). Perfil microbiológico e sensorial de geleias convencionais de umbu-cajá. *Comunicata Scientiae*, 6, 250-254.

Panozzo, A., Lemmens, L., Loey, A. V., Manzocco, L., Nicoli, M. C., & Hendricky, M. (2013). Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by high pressure homogenisation: a case study on differently coloured tomatoes. *Food Chemistry*, 141, 4094-4100.

Parker R. S. (1996). Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB Journal*, 10, 542-551.

Reetz, E. R., Kist, B. B., Santos, C. E., Carvalho, C., & Drum, M. (2014). *Brazilian Fruit Year Book*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 104p, ISSN 1808-493.

Ribeiro, L. O., Pontes, S. M., Ribeiro, A. P. O., Pacheco, S., Freitas, S. P., & Matta, V. M. (2017). Evaluation of cold storage on the bioactive compounds and physical-chemical and microbiological characteristics of pasteurized umbu juice. *Brazilian Journal Food Technology*, 20.

Ritzinger, R., Soares Filho, W. S., & Carvalho, P. C. L. (2008). Evaluation of umbu-caja germplasm in the state of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8, 181-186.

Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016). An *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food & Function*, 7, 4992-5001.

Santos, T. C., do Nascimento-Júnior, J. E., & do Nascimento Prata, A. P. (2012). Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. *Scientia Plena*, 8, 1-7.

Serdula, M. K., Byers, T., Mokdad, A. H., Simões, E., Mendlein, J. M., & Coates, R. J. (1996). The association between fruit and vegetables intake and chronic disease risk factors. *Epidemiology*, 7, 161-165.

Shahidi, M. N. F., & Naczki, M. (2005). Analysis of Polyphenols in Foods. *Methods of analysis of food components and additives*, 199-259.

Silva, L. M. M., Santos, A. R. L., Silva, C. N., Souza, J. A. R., & Arguello, V. M. (2015). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 17, 349-358.

Silva, R. N. G., Figueirêdo, R. M. F., Queiroz, A. J. M., & Galdino, P. O. (2005). Armazenamento de umbu-cajá em pó. *Ciência Rural*, 35, 1179-1184.

Stanner, S. A., Hughes, J., Kelly, C. N. M., & Buttriss, J. (2004). A review of the epidemiological evidence for the “antioxidant hypothesis”. *Public Health Nutrition*, 7, 407-422.

Torres, L. B., Figueirêdo, R. D., & Queiroz, A. D. M. (2003). Caracterização química de carambolas produzidas em região semi-árida do Nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Especial, 43-54.

Vieira, M. M. S., Bezerra, J. M., Santos, A. F., & Silva, F. V. G. (2014). Development of mixed drinks seafood *Spondias* gender-based coconut water. *Revista Verde*, 9, 242-249.

Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Garrido-Fernández, J., & Pérez-Gálvez, A. (2014). Fat content affects bioaccessibility and efficiency of enzymatic hydrolysis of lutein esters added to milk and yogurt. *Food Research International*, 65, 171-176.

CAPITULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Spondias* no Nordeste brasileiro

Grande parte das frutas tropicais conhecidas é originária da América do Sul e do Sudeste da Ásia. Acredita-se que um grande número de frutas tropicais ainda não conhecidas também serão provenientes dessas regiões (Martin, 1987). Geograficamente, o Brasil está localizado na região tropical, o que lhe confere características peculiares para a atividade da fruticultura, como uma fonte de produtos nativos subutilizados, com árvores frutíferas consideradas exóticas com alto potencial agroindustrial, representando uma importante fonte econômica para a população (Alves et al., 2008).

A região Nordeste do Brasil compreende uma área de 1.556 mil km² e caracteriza-se, do ponto de vista geoambiental, por uma diversidade de paisagens, apresentando condições desde semiaridez de caráter sazonal até alta variabilidade pluviométrica espacial e temporal (Sales, 2003). Na região Nordeste do Brasil existem inúmeras espécies de árvores frutíferas consideradas exóticas, que fornecem frutos comestíveis apreciados pela população, que não só aos utilizados para consumo *in natura* como também aos destinados ao processamento (Silva et al., 2012; Almeida et al., 2011; Rufino et al., 2010; Carvalho et al., 2000).

Dentre as frutas cultivadas ou típicas do nordeste brasileiro podemos destacar o abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.), a graviola (*Annona muricata* L.), a pinha ou fruta do conde (*Annona squamosa* L.), a jaca (*Artocarpus integrifolia* L.), o murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth.), o mamão (*Carica papaya* L.), a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), o sapoti (*Manilkara zapota* L. P. Rayen), a siriguela (*Spondias purpurea* L.), o umbu (*Spondias tuberosa*) e o tamarindo (*Tamarindus indica* L.). Todas estas frutas têm sido estudadas visando conhecer mais profundamente os compostos bioativos, qualidade e modos de conservação pós-colheita, bem como desenvolvendo e aplicando tecnologias para preservação da segurança e da qualidade organoléptica (Mariutti, et al., 2014; Almeida et al., 2011; de Sousa Galvão, et al., 2011).

Algumas frutíferas consideradas exóticas são nativas do nordeste brasileiro como alguns frutos do gênero *Spondias*: umbu (*Spondias tuberosa*) e umbu-cajá (*Spondias* spp.) que é um híbrido natural entre as espécies umbu e cajá (Carvalho et al., 2010). Outras frutíferas exóticas não têm sua origem na região Nordeste, porém foram domesticadas e adaptaram-se ao clima como é o caso do cajá (*Spondias mombin* L.), da siriguela (*Spondias purpurea* L.) e do cajá-manga (*Spondias dulcis*) que é um híbrido entre o cajá e a manga (Santos & Oliveira, 2008).

As frutas cajá, umbu, umbu-cajá e seriguela são as mais comuns dentre as mencionadas acima e possuem importância comercial para a região. Em sua maioria, essas frutas são consumidas *in natura*; no entanto, os processamentos as transformam em produtos muito apreciados como polpa, suco, geleia, compota, néctar e bebida láctea, entre outros (Silva et al., 2014, Moura et al., 2011, Folegatti et al., 2003). O sucesso desses produtos está associado à peculiaridade no aroma e ao sabor agridoce (Omena et al., 2012; Carvalho et al., 2008; Adedeji et al., 1991; Basu, 1980). Como resultado do aumento na produção, esses frutos têm sido destinados ao aproveitamento agroindustrial, com consequente comercialização dos produtos derivados das *Spondias* e aumento do número estudos conduzidos com objetivo de explorar e conhecer essas matrizes. Substâncias bioativas, como compostos fenólicos e carotenoides, já foram descritas na composição dessas espécies (Dutra et al., 2017; Giuffrida et al., 2015; Engels et al., 2012; Hamano & Mercadante, 2001). As frutas das *Spondias* possuem altos teores de vitamina C e de provitamina A devido à presença de carotenoides como a β -criptoxantina e o β -caroteno (Satpathy et al., 2011; Tiburski et al., 2011; Koziol & Macía, 1998).

O cajá (*Spondias mombin* L.) (Figura 1A) é uma fruta pequena com formato elíptico, tendo 3-4 cm de comprimento, e quando madura apresenta casca e polpa com cor amarela intensa, sabor agradável e considerável valor nutritivo (da Silva et al., 2014; Pinto et al., 2003) (Figura 2A). O fruto no Brasil é encontrado nas Regiões Norte e Nordeste, porém, a Região Nordeste destaca-se como sendo a detentora do maior número de cajazeiras que é o nome da árvore que gera a espécie. As cajazeiras não estão organizadas em plantios comerciais e a atividade é caracterizada como sendo extrativista (Lira Junior et al., 2005).

O umbu (*Spondias tuberosa*) (Figura 1B), também conhecido como imbu ou ambu, é caracterizado morfológicamente por ser uma drupa glabra ou levemente pilosa, arredondada, com 2 a 4 cm de diâmetro, 10 a 20 g de massa e superfície lisa ou com 4 a 5 pequenas protuberâncias na porção distal, tendo a casca de cor amarelo-esverdeada e a polpa branco esverdeada, mole, succulenta, de sabor agri-doce (Figura 2B) (Folegatti et al., 2003; Mendes, 1990; Silva et al., 1987).



Figura 1. Fotos registradas por Gilsandro (2016). A: frutos de cajá (*Spondias mombin* L.), B: frutos de umbu (*Spondias tuberosa*), C: frutos de umbu-cajá (*Spondias* spp.) e D: frutos de seriguela (*Spondias purpurea* L.).

O umbu-cajá (*Spondias* spp.) (Figura 1C) é um híbrido natural entre o cajá e o umbu, também encontrada no Nordeste brasileiro, provavelmente tem sua origem na região e a planta de onde provêm o fruto é caracterizada como xerófita (Giacometti, 1993). O fruto de umbu-cajá é caracterizado como sendo uma drupa arredondada com casca fina e lisa de cor amarela, com endocarpo grande, branco, suberoso e enrugado, localizado na parte central do fruto, no interior do qual se encontram os lóculos, que podem ou não conter uma semente (Figura 2C) (Moreira et al., 2012).

A seriguela (*Spondias purpurea* L.) (Figura 1D), também conhecida como *red mombin*, ciruela, *purple mombin*, tem a sua origem nas plantas conhecidas como jacote que são originárias das florestas subtropicais da América Central (Engels et al., 2012). Os frutos de seriguela são bastantes difundidos na Região Nordeste do Brasil, no entanto, podem ser encontrados em todo o país. A seriguela é caracterizada como uma drupa elipsoidal de cor amarelada ou mesmo avermelhada quando madura, com comprimento entre 2,5 e 5 centímetros e pode pesar de 12 a 28 g; visualmente é bem parecida com o cajá, porém, ao contrário desse, é bastante doce (Figura 2D) (Engels et al., 2012; Popenoe et al., 1980).

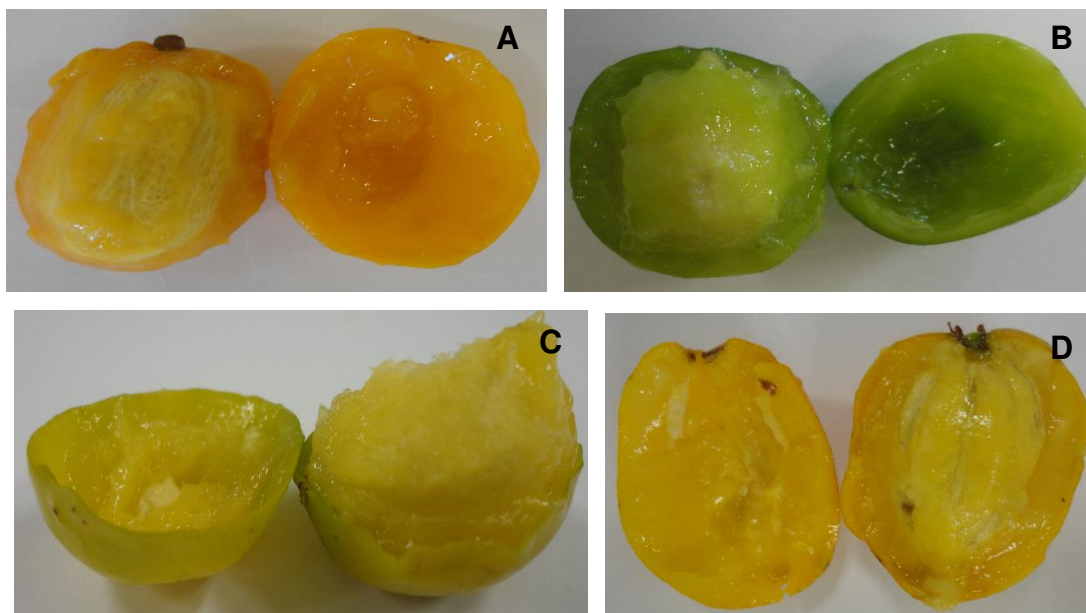


Figura 2. Fotos dos frutos partidos ao meio, registradas por Gilsandro (2016). A: cajá (*Spondias mombin* L.), B: umbu (*Spondias tuberosa*), C: umbu-cajá (*Spondias* spp.) e D: seriguela (*Spondias purpurea* L.).

2. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis de coloração que pode variar do amarelo ao vermelho, distribuídos no reino vegetal, animal e em microrganismos. As plantas superiores e os microrganismos são capazes de sintetizar estes compostos, enquanto que nos animais, o pigmento é obtido através da ingestão na dieta. De uma forma geral, os carotenoides são

moléculas de tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades de isoprenoides, ligados de forma linear tendo a simetria da molécula invertida no centro da estrutura (Britton, 1995).

A alteração na estrutura pode incluir ciclização de uma ou das duas extremidades na estrutura básica dos carotenoides, como também mudanças no nível de hidrogenação e adição de grupos funcionais contendo oxigênio (Britton, 1995). Assim, os carotenoides podem ser divididos em dois grupos, os carotenos que são hidrocarbonetos e as xantofilas que são derivados oxigenados (Figura 3).

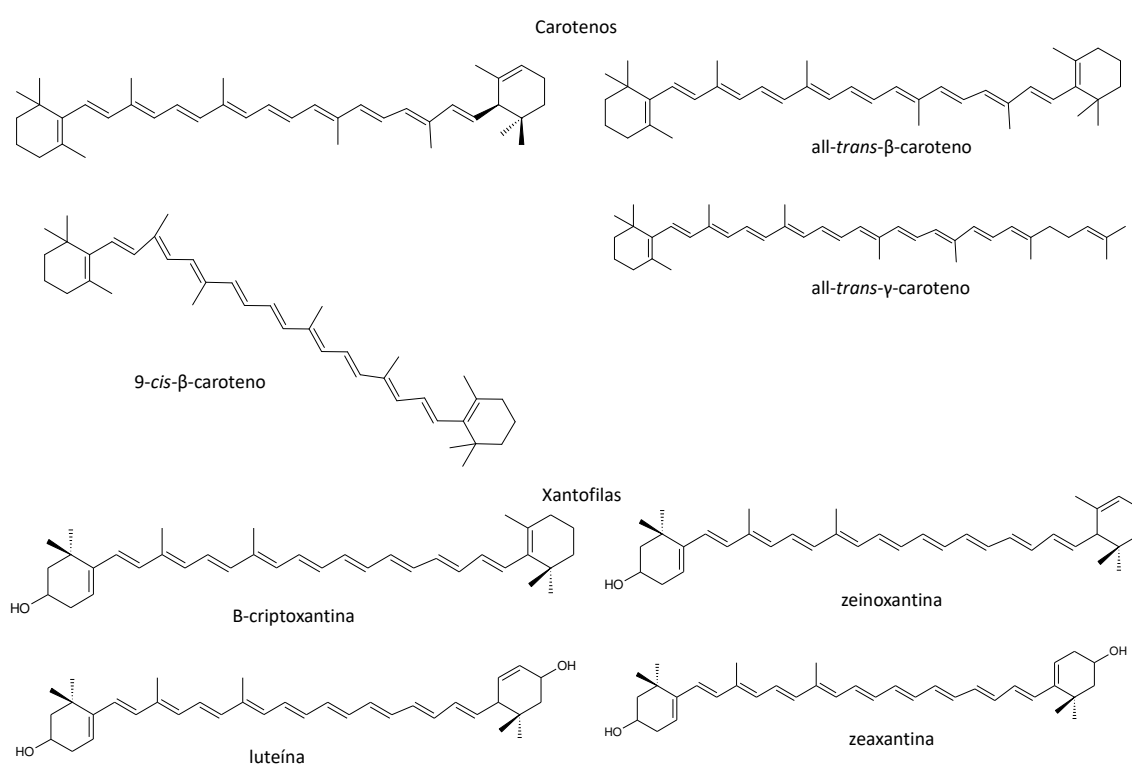


Figura 3. Estrutura química de alguns carotenos e xantofilas.

Os grupos terminais dos carotenoides podem ser acíclicos, monocíclicos ou dicíclicos. As xantofilas possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos e/ou epóxidos. Muitas outras modificações na estrutura podem ocorrer, resultando na grande diversidade de

estruturas químicas desses compostos que já tiveram mais de 750 estruturas relatadas (Britton et al., 2004; Britton, 1995).

Os carotenoides ainda podem sofrer isomerização geométrica, o que permite não somente a existência de estrutura *all-trans*, mas também diversas possibilidades de *mono-cis* e *poli-cis*. Entretanto, apenas alguns isômeros *cis* são encontrados na natureza, isto porque a presença de uma ligação *cis* cria impedimento estérico entre átomos de hidrogênio e/ou grupo metila próximos, tornando esse tipo de isômero termodinamicamente menos favorável que a forma *all-trans*. Os carbonos na posição 9, 13 e 15 possuem impedimento estérico menor, facilitando a formação e relativa estabilidade destes isômeros, do que as posições 7 e 11, que raramente são encontradas na natureza (Britton, 1995).

A cadeia linear dos carotenoides apresenta uma série de ligações duplas conjugadas (l.d.c), que por ressonância gera um sistema de elétrons π que se movimentam sobre a cadeia poliênica, proporcionando alta reatividade química e absorção de luz. Quanto maior for o número de l.d.c na estrutura do carotenoide, maior é o cromóforo da estrutura que, por consequência, terá o maior comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) da estrutura (Britton, 1995).

O sistema de l.d.c gera uma alta reatividade na estrutura tornando os carotenoides susceptíveis à degradação quando submetidos a determinadas condições de alta temperatura, meio ácido, presença de luz, entre outros fatores, podendo sofrer isomerização e oxidação. Essas alterações podem levar à diminuição do poder corante e da atividade provitamina A (Mercadante, 2008).

As funções e ações naturais dos carotenoides são determinadas pelas propriedades físicas e químicas das moléculas que são definidas pelas estruturas moleculares (Britton, 1995). Dentre as propriedades que essas moléculas apresentam, a cor é uma das mais interessantes, ela é percebida pelos olhos humanos quando a molécula tem ao menos um total de 7 l.d.c., como por exemplo, o ζ -caroteno que é ligeiramente amarelo. Porém, também existem carotenoides incolores, como o fitoeno com 3 l.d.c e o fitoflueno com 5 l.d.c (Britton, 1995).

2.1. Biossíntese de carotenoides

Os carotenoides são biossintetizados a partir do geranil-geranil difosfato (GGPP), para formar o carotenoide incolor fitoeno, em uma reação catalisada pela fitoeno-sintase (PSY), que nos organismos fotossintéticos é obtido da rota Metileritritol Fosfato (MEP). Por outro lado, alguns organismos do reino Archaea, como bactérias e fungos utilizam a via do Ácido Mevalônico (MAV) (Walter & Strack, 2011; Britton, 1998). Antes da formação do licopeno, a molécula de fitoeno passa por quatro reações sequenciais catalisadas por duas enzimas dessaturases e duas enzimas isomerases, que são: fitoeno-dessaturase (PDS), ζ -caroteno dessaturase (ZDS), carotenoide-isomerase (CRTISO) e ζ -caroteno isomerase (ZISO). Após a formação do licopeno, inicia-se a ciclização pela ação das enzimas licopeno β -ciclase (LCYb) e licopeno ϵ -ciclase (LCYe), formando respectivamente δ -caroteno e γ -caroteno. Neste ponto, há uma ramificação na via biossintética, de onde serão originados uma série de outros carotenoides (Britton, 1998). Quando a LCYb atua nas duas extremidades do licopeno, introduzindo um anel β -ionona em cada uma delas, ocorre a formação do β -caroteno. Já no outro ramo, há a participação de duas enzimas, LCYb e licopeno LCY, que introduzem respectivamente um anel β -ionona e um anel ϵ -ionona no licopeno para formar α -caroteno (Britton, 1998).

Uma vez que os carotenos estão formados, as xantofilas podem ser sintetizadas a partir da hidroxilação do C3 de cada anel dos hidrocarbonetos β -caroteno e α -caroteno, através da ação da enzima hidroxilase (HYb) e formar, por exemplo, a β -criptoxantina e logo após a zeaxantina (Britton, 1998). No outro ramo, o α -caroteno sofre uma hidroxilação (HYb) para formar zeinoxantina, que pode ser então hidroxilada novamente (HYe) e formar luteína (Britton, 1998).

2.2. Ésteres de carotenoides

Em algumas frutas, os carotenoides estão naturalmente presentes tanto na forma livre como esterificados com diferentes ácidos graxos (Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez, 1994; Hornero-Méndez, & Mínguez-Mosquera,

2000). Os ésteres de carotenoides são formados com a inserção por esterificação dos ácidos graxos nos grupos hidroxila das xantofilas, catalizada pela enzima xantofila acetil transferase (XAT), codificada por genes nucleares e que atuam via colesterol acil transferase (Acil-CoA) e proteína transportadora (Acil-ACP) (Britton, 1998).

Frutos maduros de cajá (*Spondias mombin* L.) apresentam ácidos graxos ligados a carotenoides, sendo encontrados mono e diésteres de carotenoides em sua composição. Estudos recentes identificaram os ácidos graxos mirístico, palmítico e esteárico ligados às xantofilas β -criptoxantina, zeinoxantina e luteína (da Costa & Mercadante, 2017; Giuffrida et al., 2015).

Pode-se encontrar as xantofilas ligadas a apenas um ácido graxo (Figura 4), a qual é denominada de monoéster de carotenoide e xantofilas ligadas a dois ácidos graxos (Figura 5) que são diésteres de carotenoide. No caso de serem dois ácidos graxos iguais ligados à xantofila, tem-se um homodiéster, e em heterodiéster há dois ácidos graxos diferentes ligados à xantofila nas posições C3 e C3' (Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2000).

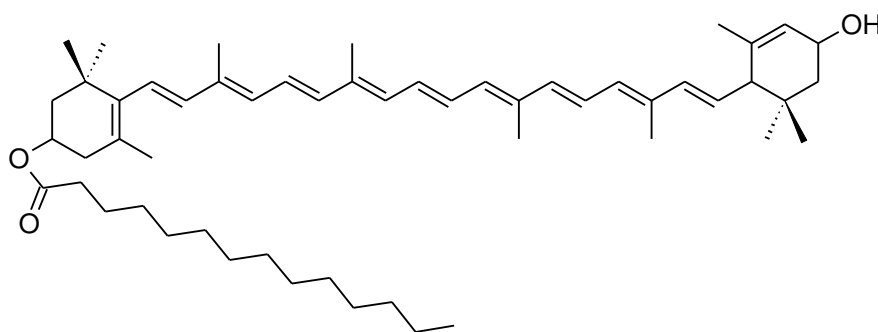


Figura 4. Monoéster de carotenoide – Luteína miristato.

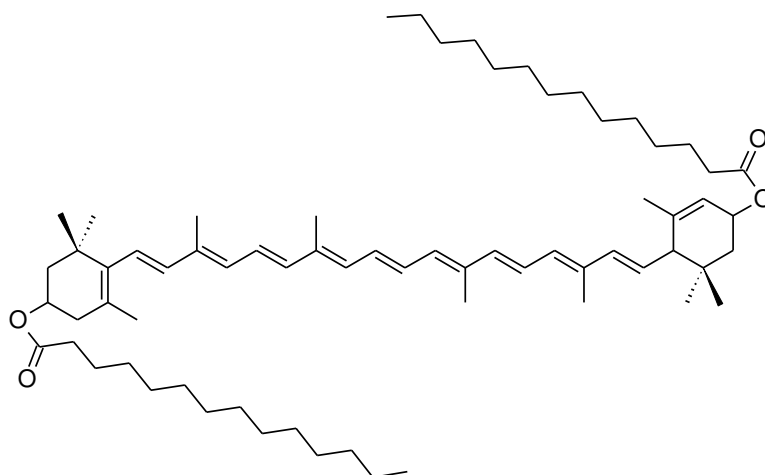


Figura 5. Diéster de carotenoide – Luteína dimiristato.

A denominação dos monoésteres de carotenoides é dada pelo nome do carotenoide seguido da posição e nome do ácido graxo, como por exemplo, (*all-E*)-luteína 3-O-palmitato, referindo-se a um ácido graxo de cadeia 16:0 (ácido palmítico) ligado à xantofila (*all-E*)-luteína na posição C3 (Rodrigues et al., 2016; Petry & Mercadante, 2016). Alguns monoésteres de carotenoides como a β -criptoxantina miristato (Figura 6) e β -criptoxantina laurato já foram identificados em cajá (*Spondias mombin* L.), apresentando abundância relativa de 2,2 e 1,1 %, respectivamente (Giuffrida et al., 2015).

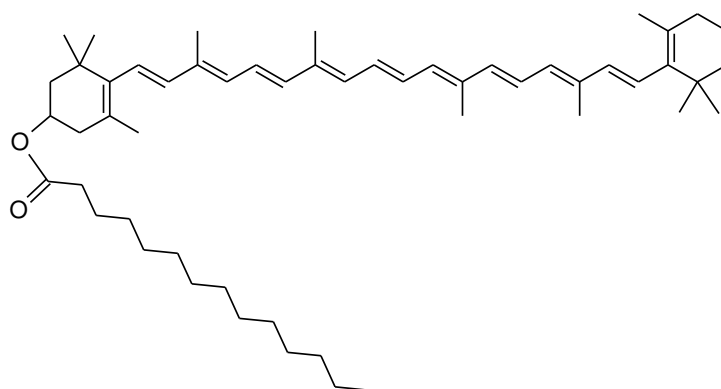


Figura 6. Monoéster de carotenoide – β -criptoxantina miristato

A denominação de diésteres de carotenoides é dada de forma similar à de monoésteres, isto é, pelo nome do carotenoide seguido do nome dos dois ácidos graxos ligados a xantofila, como por exemplo, o diester (*all-E*)-luteína dimiristato (Figura 5), onde a luteína encontra-se ligada a dois ácidos graxos

14:0 (ácido mirístico) nas posições C3 e C3'. No caso de heterodiéster, como por exemplo, (*all-E*)-luteína 3-O-miristato-3'-O-laurato, o ácido graxo 14:0 está ligado na posição C3 e o ácido láurico (12:0) está ligado na posição C3' da xantofila (Rodrigues et al., 2016; Petry & Mercadante, 2016).

Os ésteres de carotenoides são moléculas mais estáveis que os carotenos e xantofilas livres e podem estar, na maioria das vezes, em quantidades superiores nos frutos, flores e vegetais carotenogênicos (Britton & Khachik, 2009; Pérez-Gálvez & Minguez Mosquera, 2005). O perfil e quantidade das xantofilas esterificadas presentes dependem da ação da enzima xantofila acetil transferase presente nos cromoplastos e do metabolismo carotenogênico específico para cada vegetal (Petry & Mercadante, 2016; Giuffrida et al., 2015; Fernández-Orozco et al., 2013; Giuffrida et al., 2013). Os vegetais carotenogênicos podem ser definidos como aqueles que possuem síntese e acumulação de carotenoides associados à transformação dos cloroplastos em cromoplastos, com consequente degradação das clorofilas (Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez, 1994).

3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o seu desenvolvimento normal como resposta às condições de estresse, tais como infecções, ferimentos e radiação UV (Naczki & Shahidi, 2004; Beckman, 2000). Os compostos fenólicos participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (Dornas et al., 2009; Dixon & Harrison, 1990). As principais fontes dos compostos fenólicos incluem os frutos (uvas, cerejas, maçã, groselhas, frutas cítricas, castanhas, grãos, sementes, entre outros) e as hortaliças (pimenta, tomate, espinafre, cebola, brócolis, dentre outras folhosas) (Barnes et al., 2001).

O consumo de frutas e vegetais ricos em fenólicos está associado à redução de riscos de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (Coimbra & Jorge, 2013; Oliveira & Bastos, 2011). O descontrole na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pode ser associado ao início de inúmeras doenças tais como câncer, reumatismo, artrite, mal de

Parkinson e Alzheimer. No entanto, os compostos fenólicos agem como neutralizadores desses radicais livres e conseqüentemente, previnem o aparecimento dessas doenças (Almeida et al., 2011; Ali et al., 2008; Matteo & Esposito, 2003). Além disso, extratos do caule, folhas e polpas ricas em compostos fenólicos têm apresentado efeito na desativação dos radicais livres e também mostrado eficácia no combate ao vírus da dengue, sugerindo que essas substâncias possam ser usadas no combate de inúmeros processos patológicos (Silva et al., 2011; Roesler et al., 2007; Sousa et al., 2007).

Os principais compostos fenólicos presentes em alimentos e que fazem parte da dieta são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Estes ocorrem nos alimentos em quantidades que variam entre 1 a 3 mg/kg de alimento, e são difíceis de serem avaliados devido à complexidade e ao elevado número de compostos presentes nas matrizes. Além disso, a quantidade e tipo desses compostos podem variar de acordo com alguns fatores como espécie, cultivar, sistema de cultivo, localização geográfica, estágio de maturação, partes avaliadas e condições de armazenamento (King & Young, 1999).

3.1. Estrutura dos compostos fenólicos

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo os seus derivados funcionais. Possuem estrutura variável, constituindo um amplo grupo de substâncias, com mais de 8000 estruturas largamente distribuídas em todo o reino vegetal (Bravo, 1998).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o número de anéis fenólicos e elementos estruturais ligados aos anéis. Assim, adota-se a divisão em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides apresentam estrutura básica composta por um núcleo flavano, que consiste em quinze átomos de carbono distribuídos em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são denominados A, B e C (Figura 7).

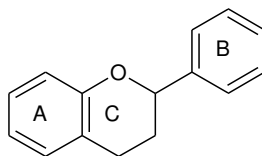


Figura 7. Estrutura básica dos flavonoides.

Dentre os flavonoides estão incluídos os subgrupos das flavanonas, flavonas, dihidroflavonois, flavonóis, flavan-3-ols, antocianinas, isoflavonas, cumarinas, chalconas, diidrochalconas e auronas (Figura 8).

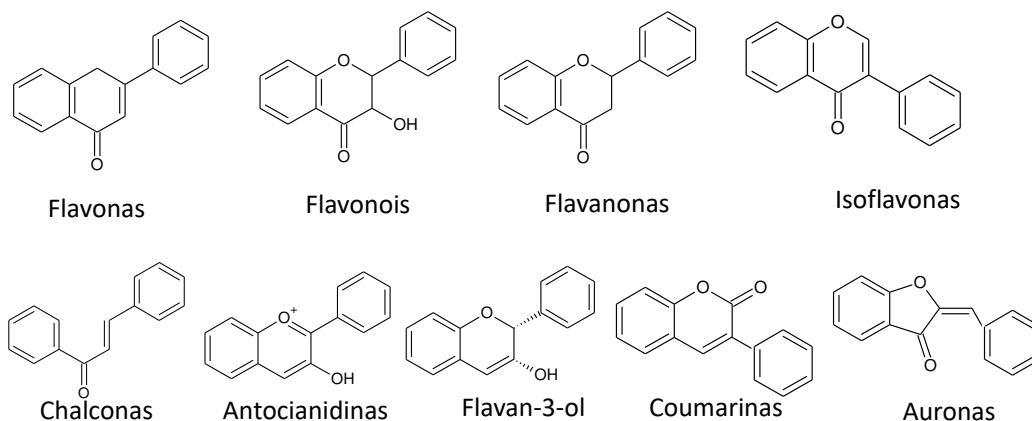


Figura 8. Estrutura dos subgrupos dos flavonoides.

Os não flavonoides estão classificados de acordo com o número de carbonos que eles possuem, sendo subdivididos em fenóis simples, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, taninos hidrolisáveis, acetofenonas, benzofenonas, xantonas, estilbenos e lignanas (Figura 9) (Andrés-Lacueva et al., 2010; Crozier et al., 2009).

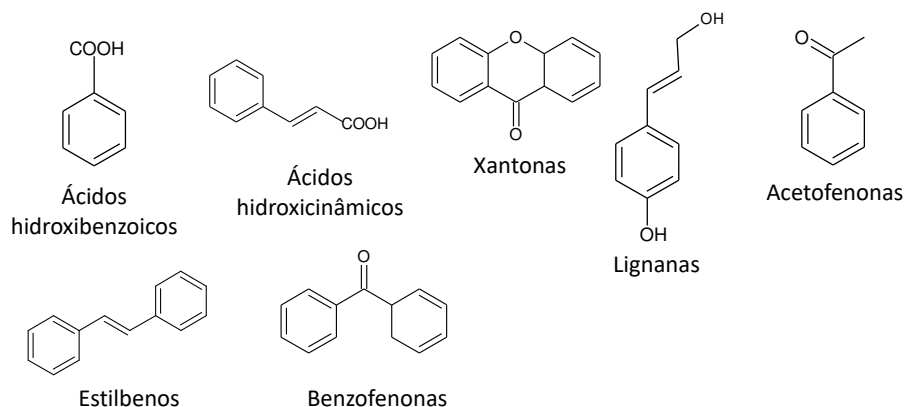


Figura 9. Estrutura do subgrupo dos não flavonoides.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono ($C_6 - C_1$) e são os mais simples encontrados na natureza, o segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono ($C_6 - C_3$), e as cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 10) (Soares, 2002).

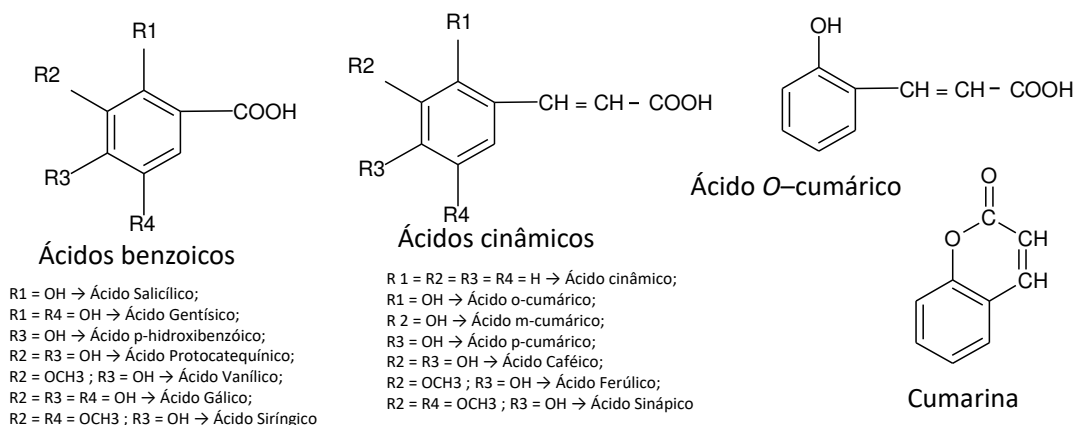


Figura 10. Estrutura química básica dos principais compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na

forma livre ou ligados a açúcares e a proteínas (Angelo & Jorge, 2007; Bravo, 1998). Os flavonoides são encontrados na forma de aglicona ou glicosilada, com o açúcar ligado a um carbono ou a um grupo hidroxila. Os açúcares ligados às hidroxilas da aglicona encontram-se comumente nas posições C3 ou C7 e os que estão ligados a carbono apresentam-se normalmente no C₆ e C₈. Independentemente da ligação, os monossacarídeos mais comuns são a ramnose, glicose, galactose e arabinose (Angelo & Jorge, 2007).

4. Compostos bioativos em frutas do gênero *Spondias*

4.1. Compostos bioativos em cajá (*Spondias mombin* L.)

O fruto do gênero *Spondias* mais estudado é o cajá (*Spondias mombin* L.), é o mais difundido e conhecido e, no Nordeste do país, é aproveitado das mais diversas formas. O cajá está comumente envolvido em estudos de caracterização, farmacológicos e médicos; as substâncias bioativas podem ser usadas para prevenir inúmeras doenças, incluindo os distúrbios cardiovasculares (Saheed et al., 2017; Pakoussi et al., 2016; Bailão et al., 2015; Carvalho et al., 2015; Tiburski et al., 2011).

A polpa congelada de cajá destaca-se por apresentar carotenoides $40,68 \pm 2,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $48,69 \pm 1,57 \mu\text{g.g}^{-1}$, flavonoides amarelos $5,25 \pm 0,22 \text{ mg.100g}^{-1}$ e compostos fenólicos $102,88 \pm 3,0 \text{ mg.100g}^{-1}$, resultados expressos em peso fresco (Silva et al., 2012; Tiburski et al., 2011; Giuffrida et al., 2015). Dos carotenoides totais em cajá, $17,08 \pm 2,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ correspondem à β -criptoxantina, $6,43 \pm 0,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ à luteína, $5,47 \pm 6,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ à zeinoxantina, $3,40 \pm 5,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ à α -caroteno e $3,14 \pm 9,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de β -caroteno (Tiburski et al., 2011).

Os carotenoides foram separados e identificados em cajá com o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) em colunas C18 e C30, e confirmados com a injeção dos padrões (Tiburski et al., 2011; Hamano & Mercadante, 2001). Em extratos saponificados, foram identificados fitoeno, fitoflueno, all-*trans*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina (*cis* e *trans*), zeinoxantina e luteína (Tiburski et al., 2011; Hamano & Mercadante, 2001). Já

em extratos não saponificados e com a identidade confirmada por espectrometria de massas (MS) foram identificados luteína, β -criptoxantina-5,6-epóxido, (13Z/13Z')- β -criptoxantina, fitoeno, zeinoxantina, fitoflueno, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina miristato e β -criptoxantina palmitato (Giuffrida et al., 2015).

Estudos genéticos recentes investigaram as populações de cajazeiras e observaram as diferenças e semelhanças genéticas dessas populações, onde concluíram que as semelhanças são maiores entre populações que estão próximas geograficamente (Silva et al., 2017). Assim, diversidades qualitativas e quantitativas são susceptíveis de ocorrerem nos compostos bioativos do cajá.

Inúmeros trabalhos descrevem a capacidade antioxidante dos frutos de cajá (*Spondias mombin* L.) e os compostos fenólicos presentes no fruto são aparentemente os principais responsáveis por esses valores (Tiburski et al., 2011; Vieira et al., 2011). No entanto, na literatura não existem registros sobre a composição dos compostos fenólicos existentes na polpa de cajá; o ácido elágico e a quercetina foram identificados nas folhas da cajazeira (da Silva et al., 2012).

4.2. Compostos bioativos em umbu (*Spondias tuberosa*)

O umbu é uma fruta que vem sendo estudada há anos e é caracterizada como rica em compostos fenólicos, apresentando também baixas quantidades de carotenoides na polpa e na casca (Melo & Andrade, 2010; Rufino et al., 2010). Na polpa, casca e sementes foram encontrados quercetina, ácidos hidroxinâmicos, ácido elágico, ácido clorogênico, protocatequinas, flavonoides amarelos, ácido gálico, ácido vanílico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico (Gomes et al., 2013; Almeida et al., 2011; Gonçalves et al., 2010; Rufino et al., 2010; Melo & Andrade, 2010; Genovese et al., 2008). Os compostos bioativos em umbu apresentados na Tabela 1 foram identificados através de comparações com padrões e informações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Em vinho de umbu, foram detectados $5,48 \pm 0,12$ mg/L e $2,19 \pm 0,21$ mg/L de catequina e epicatequina, respectivamente (Ramalho et al., 2014).

Em frutos de umbu, também foram descritos teores de vitamina C ($18,4 \pm 1,8 \text{ mg.100g}^{-1}$; $19,53 \text{ mg.100g}^{-1}$ de polpa), minerais como potássio, cálcio e magnésio e fibras solúveis (Cavalcanti et al., 2001; Cavalcanti et al., 2000). A avaliação etnofarmacológica dos frutos de umbu revelou que os frutos podem ser usados de diversas formas para tratamento de algumas patologias, entre estas diabetes, inflamações, cólicas uterinas, dores de estômago e como hipocolesterolêmico (Lins Neto et al., 2010). Os frutos de umbu apresentaram pronunciada atividade antioxidante, atribuída à presença de compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides (Almeida et al., 2011; Melo & Andrade, 2010; Rufino et al., 2010; Rufino et al., 2009; Genovese et al., 2008)

Tabela 1. Compostos bioativos em frutos de umbu (*Spondias tuberosa*).

Compostos	Concentração	Método	Parte utilizada	Referências
Fenólicos totais	44,6 ± 27 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu	polpa	Almeida et al. (2011)
Fenólicos totais	32,70 ± 1,23 mg.100 ⁻¹	Folin Ciocalteu	polpa do fruto maduro	Melo & Andrade (2010)
	38,03 ± 1,58 mg.100 ⁻¹		polpa do fruto semi-maduro	
	454,21 ± 18,63 mg.100 ⁻¹		casca fruto maduro*	
	466,17 ± 22,37 mg.100 ⁻¹		casca fruto semi-maduro*	
Carotenoides totais	3,02 µg.g ⁻¹	Espectrofotométrico a 450 nm	polpa do fruto maduro	
	1,70 µg.g ⁻¹		polpa do fruto semi-maduro	
	6,31 ± 0,08 µg.g ⁻¹		casca fruto maduro*	
	7,47 ± 0,92 µg.g ⁻¹		casca fruto semi-maduro*	
Fenólicos totais	4,0 ± 02 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu	polpa	Gonçalves et al. (2010)
Quercetina	9,4 ± 05 mg/100g	HPLC ^b -DAD ^c		
Ácido hidroxinâmico	0,2 ± 0,1 mg/100g			
Ácido elágico livre	0,9 ± 0,1 mg/100g			
Ácido elágico total	314 ± 20 mg/100g			
Fenólicos totais	52,5 ± 5,9 mg GAE ^a .g ⁻¹	Folin Ciocalteu	casca	Omena et al. (2012)
	202 ± 6,9 mg GAE ^a .g ⁻¹		semente	
	40,4 ± 8,7 mg GAE ^a .g ⁻¹		polpa	
Quercetina	32,65 ± 0,65 µg.g ⁻¹	UPLC ^d - MS ^e	casca	
Fenólicos totais	34,1 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu HPLC ^b	polpa	Genovese et al. (2008)
Quercetina	0,96 ± 0,05 mg/100g			
Ácido clorogênico	0,02 ± 0,01 mg/100g			
Ácido elágico	32 ± 2 mg/100g			
Polifenóis	742 ± 19 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu	polpa*	Rufino et al. (2010)
Polifenóis	90,4 ± 2,2 mg GAE ^a /100g		polpa	
Flavonoides amarelos	6,9 ± 1,7 mg/100g			

Carotenoides totais	1,0 ± 0,2 mg/100g	Espectrofotométrico a 450 nm		
Protocatequinas	141, 3 µg.g ⁻¹	UPLC ^d	polpa	Gomes et al. (2013)
Ácido clorogênico	118,9 µg.g ⁻¹			
Ácido gálico	3,5 µg.g ⁻¹			
Ácido vanílico	2,5 µg.g ⁻¹			
Ácido p. cumárico	1,8 µg.g ⁻¹			
Ácido ferúlico	2,2 µg.g ⁻¹			

* matéria seca

^aEquivalente Ácido Gálico

^bCromatografia Líquida de Alta Eficiência

^c Detector Arranjo Diodos

^dCromatografia Líquida de Ultra Performance

^eEspectrometria de Massas

4.3 Compostos bioativos em umbu-cajá (*Spondias spp.*)

O umbu-cajá é uma *Spondias* que também apresenta grande aceitação e pode ser utilizada em inúmeras aplicações tecnológicas como produção de polpa, suco e néctar devido ao seu sabor doce e aroma agradável (Fernandes et al., 2008). O umbu-cajá (*Spondias spp.*) possui fenólicos, flavonoides e carotenoides (Tabela 2).

A quantidade de compostos fenólicos totais como também as identidades de alguns já são conhecidas, pois foram separados e identificados em sistema HPLC-DAD, assim as proantocianinas, ácido elágico e quercetina foram identificados (Correia et al., 2012; Moreira et al., 2012; Borges et al., 2011; Gomes et al., 2009). Entretanto, a espectrometria de massas ainda não foi usada para confirmar a identificação desses compostos.

Em umbu-cajá (*Spondias spp.*), usando cromatografia em coluna aberta (OCC), foram separados os carotenoides 5,6-epóxi- β -caroteno, 5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno, 5,6-epóxi-luteína e α -caroteno (Moreira et al., 2012).

Em vinho obtido de umbu-cajá foram encontrados $4,78 \pm 0,04$ mg/L e $2,53 \pm 0,25$ mg/L de catequina e epicatequina, respectivamente (Ramalho et al., 2014).

Tabela 2. Compostos bioativos em umbu-cajá (*Spondias* spp.).

Compostos	Concentração	Método	Parte utilizada	Referências
Fenólicos totais	188,86 ± 44,36 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu	polpa	Moreira et al. (2012)
Flavonoides totais	2,37 ± 0,26 mg CE ^b /100g	Espectrofotométrico de 350 a 550 nm OCC ^d		
Flavonas totais	2,80 ± 0,08 mg QTE ^c /100g			
Carotenoides totais	11,44 µg.g ⁻¹			
Carotenoides α-caroteno 5,6 epóxi-β-caroteno 5,6-5'6' diepóxi-β-caroteno 5,6 epóxi-luteína				
Fenólicos totais	518,63 ± 11,68 mg CE ^b /100g	Folin Ciocalteu	resíduos* de polpa, semente e casca	Correia et al. (2012)
Proantocianinas	1064 ± 28 mg QTE ^c /100g	HPLC ^e -DAD ^f		
Ácido elágico	2,72 ± 0,04 mg/100g			
Quercetina	3,38 ± 0,01mg/100g			
Carotenoides totais	11,21 ± 13 µg.g ⁻¹	Espectrofotométrico a 450 nm	polpa	Gomes et al. (2009)
Fenólicos totais	1448,3 ± 6,8 mg GAE ^a /100g	Folin Ciocalteu	resíduos* de polpa, semente e casca	Borges et al. (2011)
Antocianinas totais	23,12 ± 0,04 mg/100g	pH diferencial		

* matéria seca

^aEquivalente Ácido Gálico^bEquivalente Catequina^cEquivalente Quercetina^dCromatografia em Coluna Aberta^eCromatografia Líquida de Alta Eficiência^fDetector de Arranjo de Diodos

4.4 Compostos bioativos em seriguela (*Spondias purpurea* L.)

A seriguela é também conhecida como jacote na América Central, e tem sido alvo de pesquisas que comprovam a sua capacidade medicinal, atribuída aos compostos bioativos (Gachet et al., 2010; Genovese et al., 2008; Agra et al., 2007). Os frutos de seriguela possuem minerais como o fósforo, zinco, potássio, cálcio, ferro, sódio e substâncias bioativas como a riboflavina, niacina, ácido ascórbico, ácido málico e carotenoides (Koziol & Macía, 1998). Apesar de possuírem carotenoides, não se encontram registros da identificação destes compostos na literatura.

Em casca de seriguela (*Spondias purpurea* L.), foram identificados os seguintes compostos fenólicos: galolil glicose, ácido gálico, ácido dehidroxibenzóico hexosídeo, ácido 3-cafeilquinico, quercetina 3-*O*-pentosilrutinosídeo, quercetina 3-*O*-pentosilhexosídeo, quercetina 3-*O*-pentosilhexosídeo, quercetina raminosil hexosídeo, quercetina deoxihexosídeo, quercetina pentosídeo, quercetina 3-*O*-rutinosídeo - rutina, quercetina 3-*O*-glucopiranosídeo, quercetina dipentosídeo, kaempferol deoxihexosil hexosídeo, kaempferol 3-*O*-hexosil pentosídeo, quercetina 3-*O*-pentosídeo, kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, kaempferol 3-*O*-glucosídeo (astragalina), ramnetina hexosil pentosídeo, ramnetina hexosídeo, ramnetina dipentosídeo, kaempferídeo hexosil pentosídeo, ácido 3,5-dihidroxibenzoico, ácido 3-cafeoilquinico, quercetina 3-*O*-arabinoglucosídeo, quercetina 3-*O*-rutinosídeo (rutina), quercetina 3-*O*-glucopiranosídeo-Isoquercitrina, kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, quercetina desidratada, isoramnetina, ramnetina, kaempferídeo. No entanto, as suas quantidades não foram determinadas (Engels et al., 2012).

Por outro lado, a maioria dos estudos realizou somente a determinação de fenólicos totais na seriguela. Esses variaram de 351,30 mg GAE/100g de polpa à 862,32 mg GAE/100g de polpa em 11 genótipos diferentes de seriguela (*Spondias purpurea* L.), porém as diferenças encontradas não foram discutidas pelos autores (Silva et al., 2012).

5. Bioacessibilidade de carotenoides

Antes de estarem disponíveis para cumprirem sua função no organismo (biodisponibilidade), as substâncias (carotenoides) contidas nos alimentos ingeridas

através da dieta precisam ser liberadas da matriz alimentar para poderem estar acessíveis para absorção (Olson, 1999). A bioacessibilidade é então o passo que antecede a biodisponibilidade, visto que, tanto fatores ligados ao alimento como aqueles ligados ao organismo influenciam nesse processo (Fernández-García et al., 2009).

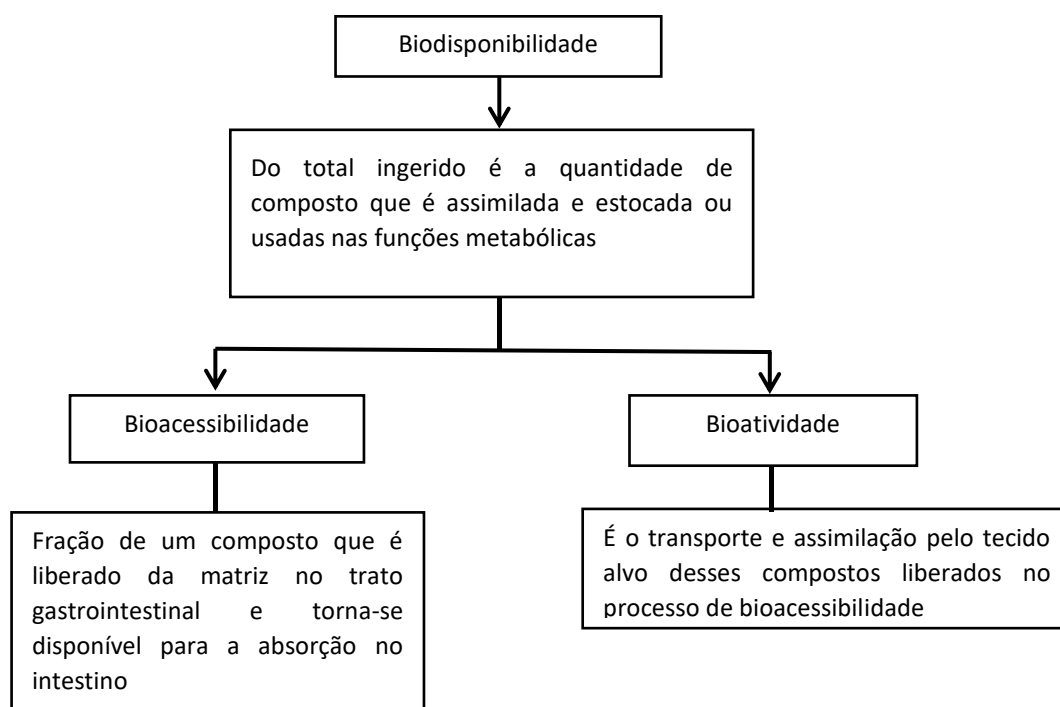


Figura 11. Definição de biodisponibilidade como uma soma da bioacessibilidade e bioatividade. Adaptado de Fernández-Garcia et al. (2009).

A bioacessibilidade de carotenoides vem sendo estudada a fim de esclarecer como essas moléculas estão disponíveis no organismo humano para exercer as funções biológicas. Sugere-se que os carotenoides são liberados da matriz alimentar durante a mastigação e que em seguida eles entram na fase lipídica da emulsão gástrica, depois são incorporados pelas micelas e estabilizados por sais biliares no intestino e então, as micelas são absorvidas pelas células do intestino a fim de atingir a circulação plasmática (Hollander & Ruble, 1978). Os carotenoides são absorvidos e transportados da mucosa intestinal por quilomicros e lipoproteínas através da linfa para o sangue e armazenados no fígado e no tecido adiposo. Sua distribuição depende da hidrofobicidade, do carotenoide e da lipoproteína envolvida (Parker, 1996; Olson, 1994; Erdman et al., 1993).

Alguns fatores como a digestibilidade, os antioxidantes, os nutrientes, a acidez estomacal, a absorção ineficiente de lipídios, o tipo de carotenoide, as fibras dietéticas solúveis, as infecções, a ineficiência de enzimas, os fatores genéticos e o processamento dos alimentos influenciam no processo de absorção dessas substâncias pelo organismo (Ambrósio et al., 2006; Parker, 1996). Sabe-se que a presença da pectina na matriz alimentar dificulta a formação das micelas de gordura e diminui o movimento dos carotenoides para as células de absorção (Lemmens et al., 2009). Outros fatores podem estar envolvidos na bioacessibilidade dos carotenoides, como por exemplo, a concentração de minerais que contribuem de forma significativa na formação das micelas de gordura (Biehler et al., 2011).

Atualmente, testes *in vitro* têm sido propostos como uma forma de expandir os conhecimentos sobre cada etapa da digestão (Berni et al., 2014; Minekus et al., 2014; Fernández-García et al., 2012; Colle et al., 2012; Failla et al., 2008). Porém, não é possível comparar os resultados dos inúmeros trabalhos publicados sobre bioacessibilidade *in vitro* devido ao fato de terem sido usados distintos modelos de digestão. Assim, um grupo de cientistas sugeriu um método harmonizado que propõe a padronização de um modelo de digestão *in vitro* para serem aplicados nas mais distintas matrizes alimentares para diferentes compostos (Minekus et al., 2014). Este método foi adaptado e validado para carotenoides (Rodrigues et al., 2016) e aplicado para avaliar a bioacessibilidade de carotenoides em murici (Rodrigues et al., 2016) e tangerinas (Petry & Mercadante, 2016).

Testes *in vitro* aplicados para avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos ainda são entendidos como sendo incompletos e de difícil aplicação, visto que, os compostos fenólicos ao passarem pelo sistema gastrointestinal são degradados, principalmente em derivados dos ácidos benzóico, fenil-acético e fenil-propiónico (Brown et al., 2012; McDougall et al., 2005).

Assim, a avaliação *in vitro* da bioacessibilidade de carotenoides envolvidos em diferentes tipos de preparo de uma mesma matriz alimentar, deve prever dados e valores importantes relacionados não só com a identidade dos carotenoides que estarão bioacessíveis como também à sua concentração.

6. Referências Bibliográficas

- Agra, M. D. F., Freitas, P. F. D., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 114-140.
- Adedeji, J., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. (1991). Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombin* L.). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 39, 1494-1497.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15.
- Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155-2159.
- Alves, R. E., Brito, E. S., Rufino, M. S. M., & Sampaio, C. G. (2008). Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. *Acta Horticulturae*, 773.
- Ambrósio, C. L. B., Campos, F. D. A. C., & Faro, Z. P. D. (2006). Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. *Revista de Nutrição*, 19, 233-243.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impresso), 66, 01-09.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., & Lamuela-Raventos, R. M. (2010). Phenolic compounds: Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, 53-80.

- Bailão, E. F. L. C., Devilla, I. A., da Conceição, E. C., & Borges, L. L. (2015). Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 23760-23783.
- Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 583-600.
- Basu, S. (1980). Some structural studies on degraded *Spondias dulcis* gum. *Carbohydrate Research*, 81, 200-201.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101-110.
- Berni, P. R. A., Chitchumroonchokchai, C., Brazaca, S. G. C., & Failla, M. L. (2014). Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato cooked according to home styles compared to highly processed baby foods. In: Bioavailability. *Revista Sociedade Brasileira Alimentos e Nutrição*, 39, 1-57.
- Biehler, E., Kaulmann, A., Hoffmann, L., Krause, E., & Bohn, T. (2011). Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 125, 1328-1334.
- Borges, S. V., Martins, M. L. A., Mesquita, K. S., Ferrua, F. Q., & Cavalcanti, N. B. (2011). Efeito de aditivos sobre a cor durante o armazenamento de doces de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câmara) verde e maduro. *Alimentos e Nutrição*, 22, 307-313.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Brown, E. M., McDougall, G. J., Stewart, D., Pereira-Caro, G., González-Barrio, R., Allsopp, P., & Gill, C. I. (2012). Persistence of anticancer activity in berry extracts after simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Plos One*, 7, 11.

Britton G., & Khachik F. (2009). Carotenoids in food. In Carotenoids. Vol. 5 *Nutrition and Health*, Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Eds.). Birkhauser Verlag, Basel, p. 45-66.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids – Handbook. Basel: Birkhauser.

Britton, G. (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. In Britton, G., Pfander, H. P., & Liaaen-Jensen, S. L. J. (Eds.). Carotenoids: biosynthesis and metabolism. Basel: Birkhäuser, pp. 131-48.

Britton, G. (1995). Carotenoids, spectroscopy (v. 1B). in G. Britton, S. Liaaen-Jensen, S. L. J., & H. Pfander (Eds.), UV/visible spectroscopy. Basel: Birkhauser, 13-62.

Carvalho, J. M., Maia, G. A., da Fonseca, A. V. V., de Sousa, P. H. M., & Rodrigues, S. (2015). Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1182-1187.

Carvalho, R. S., Soares Filho, W. S., & Ritzinger, R. (2010). Umbu-cajá como repositório natural de parasitoide nativo de moscas-das-frutas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45, 1222-1225.

Carvalho, P. C. L., Ritzinger, R., Filho, W. S. S., & Ledo, C. A. S. (2008). Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de populações de umbu-cajeira do estado da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 140-147.

Carvalho, H. W. L., Leal, M. L. S., Santos, M. X., Cardoso, M. J., Monteiro, A. A. T., & Tabosa, J. N. (2000). Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho do Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 1115-1123.

Cavalcanti, N. B., Resende, G. M., & Brito, L. T. L. (2001). Emergência e crescimento de plântulas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) em diferentes substratos. *Pesquisa Brasileira Agropecuária*, 58, 19.

Cavalcanti, N. B., Lima, J. B., Resende, G. M., & Brito, L. T. L. (2000). Ciclo reprodutivo do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) no semiárido do Nordeste brasileiro. *Revista Ceres* 47, 421–439.

Coimbra, M. C., & Jorge, N. (2013). Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and fatty acids present in oils extracted from palm fruits. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 31, 309-320.

Colle, I. J., Van Buggenhout, S., Lemmens, L., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2012). The type and quantity of lipids present during digestion influence the *in vitro* bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Research International*, 45, 250-255.

Correia, R. T., Borges, K. C., Medeiros, M. F., & Genovese, M. I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18, 539-547.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.

da Costa, G. A., & Mercadante, A. Z. (2017). *In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. In Press. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.02.012

da Silva, G. A., de Brito, N. J. N., dos Santos, E. C. G., Lópes, J. A., & das Graças Almeida, M. (2014). Gênero *Spondias*: Aspectos botânicos, composição química e

potencial farmacológico. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 10.

da Silva, A. R. A., de Moraes, S. M., Mendes Marques, M. M., de Oliveira, D. F., Barros, C. C., De Almeida, R. R., Vieira, I. G. P., & Guedes, M. I. F. (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharmaceutical Biology*, 50, 740-746.

de Sousa Galvão, M., Narain, N., dos Santos, M. D. S. P., & Nunes, M. L. (2011). Volatile compounds and descriptive odor attributes in umbu (*Spondias tuberosa*) fruits during maturation. *Food Research International*, 44, 1919-1926.

Dixon, R. A., & Harrison, M. J. (1990). Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, 28, 165-234.

Dornas, W. C., Oliveira, T. T. D., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F. D., & Nagem, T. J. (2009). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28, 241-249.

Dutra, R. L. T., Dantas, A. M., de Araújo Marques, D., Batista, J. D. F., de Albuquerque Meireles, B. R. L., de Magalhães Cordeiro, Â. M. T., Magnani, M., & Borges, G. D. S. C. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 100, 650-657.

Engels, C., Grater, D., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Ganzle, M. G., & Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jacote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, 46, 557-562.

Erdman, J. W., Bierer, T. L., & Gugger, E. T. (1993). Absorption and transport of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691, 76-85.

Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., & Ishida, B. K. (2008). *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *The Journal of Nutrition*, 138, 482-486.

Fernandez-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2013). Carotenoid profiling in tubers of different potato (*Solanum* sp) cultivars: Accumulation of carotenoids mediated by xanthophyll esterification. *Food Chemistry*, 141, 2864-2872.

Fernandes, T. K., Figueirêdo, R. M., Queiroz, A. J. M., Melo, K. S., & Bezerra, M. C. T. (2008). Estudo do comportamento reológico da polpa de umbu-cajá em função da concentração de maltodextrina. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 10, 171-180.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.

Folegatti, M. I. S., Matsuura, F. C. A. U., Cardoso, R. L., Machado, S. S., Rocha, A. S., & Lima, R. R. (2003). Aproveitamento industrial do umbu: processamento de geleia e compota. *Ciência e Agrotecnologia*. 27, 1308-1314.

Gachet, M. S., Lecaro, J. S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Muñoz, R. A., Bauer, R., & Schühly, W. (2010). Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 184-197.

Giacometti, D. C. (1993). Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. *Simpósio nacional de recursos genéticos de fruteiras nativas*, 1, 13-27.

- Genovese, M. I., Pinto, M. S., Gonçalves, A. E. S. S., & Lajolo, F. M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14, 207-214.
- Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., & Murillo, E. (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70, 163-172.
- Giuffrida, D., Torre, G., Dugo, P., & Dugo, G. (2013). Determination of the carotenoid profile in peach fruits, juice and jam. *Fruits*, 68, 39-44.
- Gomes, E. B., Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., Miranda, R. C. M., Nigam, N., & Narain, N. (2013). A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 1-10.
- Gomes, R. B., Viana, E. S., Oliveira, L. A., Carvalho, L. D., Filho, W. S. S., & Ritzinger, R. (2009). Avaliação da cor e do conteúdo de carotenoides em variedades de umbu-cajá In: 3ª Jornada Científica EMBRAPA, Cruz das Almas, BA. *Anais...* Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF.
- Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4666-4674.
- Hamano, P. S., & Mercadante, A. Z. (2001). Composition of carotenoids from comercial products of cajá (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition Analysis*, 14, 335-343.
- Hollander, D., & Ruble, P. E. (1978). Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 235, 686-691.

- Hornero-Méndez, D., Gómez-Ladrón de Guevara, R., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3857-3864.
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 213-218.
- Koziol, M., & Macía, M. J. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). *Economic Botany*, 52, 373-380.
- Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Oey, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Towards a better understanding of the relationship between the β -carotene in vitro bioaccessibility and pectin structural changes: a case study on carrots. *Food Research International*, 42, 1323-1330.
- Lins Neto, E. M. D. F. L., Peroni, N., & de Albuquerque, U. P. (2010). Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi-arid region of Northeastern Brazil. *Economic Botany*, 64, 11-21.
- Lira Júnior, J. S., dos Santos Musser, R., de Almeida Melo, E., Sucupira MACIEL, M. I., Lederman, I. E., & dos Santos, V. F. (2005). Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias* spp.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25.
- Mariutti, L. R., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Mercadante, A. Z. (2014). The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. *Food research international*, 64, 618-625.

Martin, F. W., Campbell, C. W., & Ruberte, R. M. (1987). Perennial Edible Fruits of the Tropics: An Inventory. Agriculture Handbook No. 642. *United States Department of Agriculture*. Washington DC, USA, 252.

Matteo, V., & Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2, 95-107.

McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005) Anthocyanins from red wine their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.

Melo, E. A., & Andrade, R. A. M. S. (2010). Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. *Alimentos e Nutrição*, 21, 453-457.

Mendes, B. V. (1990). Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.): importante fruteira do semi-árido. Mossoró: ESAM, 564, 63.

Mercadante, A. Z. (2008). Food colorants – Chemical and functional properties. In C. Socaciu (Ed.), Carotenoids in foods: Sources and stability during processing and storage. New York: CRC Press, pp. 213–235.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb, A., (2014). Standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*. 5, 1113–1124.

Minguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Mendez, D. (1994). Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 640-644.

Moura, C. L. A., Pinto, G. A. S., & Figueiredo, R. W. (2011). Processamento e utilização da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). *Boletim CEPPA*, 29, 237-252.

Moreira, A. C. C. G., Nascimento, J. D. M., Andrade, R. A. M. S., Maciel, M. I. S., & Melo, E. A. (2012). Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de cajá-umbuzeiras. *Alimentos e Nutrição*, 23, 235-241.

Nacz, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

Omena, C. M. B., Valentim, I. B., Guedes, G. S., Rabelo, L. A., Mano, C. M., Bechara, E. J. H., Sawava, A. C. H. F., Trevisan, M. T. S., Costa, J. G., Ferreira, R. C. S., Sant'Ana, A. E. G., & Goulart, M. O. F. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, 49, 334-344.

Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34, 1051-1056.

Olson, J. A. (1994). Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1011-1016.

Olson, J. A. (1999). Bioavailability of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49, 26-33.

Pakoussi, T., Kodjo, M. K., Metowogo, K., Lawson-Evi, P., Mouzou, A. P., Aklikokou, A. K., & Gbeassor, M. (2016). Évaluation des propriétés hémostatiques et hypocholestérolémiantes des feuilles de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). *Phytothérapie*, 14, 349-354.

Parker R. S. (1996). Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB Journal*, 10, 542-551.

Petry, F. C., & Mercadante, A. Z. (2016). Composition by LC-MS/MS of new carotenoid esters in mango and citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8207-8224.

Pérez-Gálvez, A., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutrition Research*, 25, 631-640.

Pinto, W. D. S., Dantas, A. C. V. L., Fonseca, A. A. O., Ledo, C. A. D. S., Jesus, S. C. D., Calafange, P. L. P., & Andrade, E. M. (2003). Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 1059-1066.

Popenoe, J. (1980). The genus *Spondias* in Florida. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 92, pp. 277-279.

Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., Neta, M. T. S. L., Batista, R. A., Araújo, S. M., da Silveira Moreira, J. D. J., & Narain, N. (2014). Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 449-457.

Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016). An *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food & Function*, 7, 4992-5001.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 53-60.

Rufino, M. S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

- Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., & Brito, E. S. (2009). Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, 114, 693-695.
- Santos, C. A. F., & Oliveira, V. R., (2008). Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 731-735.
- Sales, M. C. L. (2003). Evolução dos estudos de desertificação no Nordeste brasileiro. *GEOUSP – Espaço e Tempo*, 14, 9-19.
- Satpathy, G., Tyagi, Y. K., & Gupta, R. K. (2011). Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K. an exotic fruit of India. *Food Research International*, 44, 2076-2087.
- Silva, B. M., Rossi, A. A. B., Tiago, A. V., Schmitt, K. F. M., Dardengo, J. F. E., & Souza, S. A. M. (2017). Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 16.
- Silva, G. A., Brito, N. J. N., Santos, E. C. G., López, J. A., & Almeida, M. G. (2014). Gênero *Spondias*: Aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Revista de Biologia e Farmácia*, 10, 1.
- Silva, Q. J., Moreira, A. C. C. G., Melo, E. A., & Lima, V. L. A. G. (2012). Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de ciriguelas (*Spondia purpurea* L.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 23, 73-80.
- Silva, A. R. A., Morais, S. M., Marques, M. M. M., Lima, D. M., Santos, S. C. C., Almeida, R. R., Vieira, I. G. P., & Guedes, M. I. F. (2011). Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species dengue virus. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 406-413.
- Silva, C. M. M. S., Pires, I. E., & Silva, H. D. (1987). Caracterização dos frutos do umbuzeiro. Petrolina: Embrapa – CPATSA, 34, 17.

Sousa, C. D. M., Silva, H. R. Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. D., Araújo, D. S., & Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.

Saheed, S., Olatunde Taofik, S., Oladipo, A. E., Tom, O., & Anofi, A. (2017). *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) enhances detoxification of hepatic and macromolecular oxidants in acetaminophen-intoxicated rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 2109-2117.

Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71-81.

Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Deliza, R., Godoy, R. L. O., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, 44, 2326-2331.

Vieira, L. M., Sousa, M. S. B., Mancini-Filho, J., & Lima, A. D. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 888-897.

Walter, M. H., & Strack, D. (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28, 663-692.

CAPITULO III

Identification and Quantification of Carotenoid Esters in Fruits of the Genus *Spondias*

Gilsandro Alves da Costa^a & Adriana Zerlotti Mercadante^{*,a}

^a*Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil*

Article in preparation for submission to the journal *Food Chemistry*

ABSTRACT

Carotenoids, free and esterified with fatty acids, were determined in four genus of *Spondias* fruits. Non-saponified extracts from freeze-dried edible parts of cajá (*Spondias mombin* L.), seriguela (*Spondias purpurea*), umbu-cajá (*Spondias* spp.) and umbu (*Spondias tuberosa*) were identified and quantified by HPLC-DAD-MS/MS. Despite the high number of carotenoids quantified, the major carotenoids in all the *Spondias* evaluated were (all-*E*)-lutein, (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)- β -carotene, (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate and (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate, with 22 % of the (all-*E*)- β -cryptoxanthin in *Spondias mombin* L., 26 % of the (all-*E*)-lutein in *Spondias tuberosa*, 18 % of the (all-*E*)- β -carotene in *Spondias* spp. and 18 % of the (all-*E*)-lutein in *Spondias purpurea*. Besides those carotenoids, (all-*E*)-zeinoxanthin contributed with 11% in *Spondias mombin* L. and (all-*E*)- α -carotene with 10 % in *Spondias* spp. The highest carotenoid content was found in *Spondias mombin* L. ($192.39 \pm 8.20 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$), followed by $125.75 \pm 4.21 (\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw})$ in *Spondias* spp., $74.58 \pm 1.73 (\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw})$ in *Spondias purpurea* and $28.07 \pm 2.04 (\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw})$ in *Spondias tuberosa*. The levels of provitamin A value followed the same order given above, $997.6 \pm 46.4 \mu\text{g RAE/100 g}$ in cajá, $805.41 \pm 27.40 \mu\text{g RAE/100 g}$ in umbu-cajá, $298.89 \pm 8.37 \mu\text{g RAE/100 g}$ in seriguela and $143.33 \pm 9.15 \mu\text{g RAE/100 g}$ in umbu. The percentage of esters in relation to the total carotenoids was 36 % in *Spondias mombin* L., 23 % in *Spondias tuberosa*, 32 % in *Spondias* spp. and 41 % in *Spondias purpurea*. This fact demonstrates that esters of carotenoids are important in the composition of such compounds in these fruits.

Keywords: xanthophyll esters, tropical fruit, LC-MS, *Spondias*, carotenoids, carotenoid esters

1. Introduction

The *Spondiadeae* subfamily, belonging to the *Anacardeaceae* family, includes 17 genus and 140 species, with about 14-15 species of the genus *Spondias*, with 9 of them occurring in Neotropical regions of the world (Bachelier & Endress, 2009; Mitchell & Daly, 2015). The climate of the tropical regions of the Northeast and Northern of Brazil favors the development of plants from the *Anacardiaceae* family, such as mango (*Mangifera indica* L.), cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and the fruits from genus *Spondias*.

Species of the genus *Spondias* are easily found in Central and South Americas; however, some of them are native to Asia. Yellow mombin (*Spondias mombin* L.), known as cajá in Brazil, is a genus native to the Brazilian Amazon and Atlantic Forest (Mitchell & Daly, 2015), while umbu (*Spondias tuberosa*) and umbu-cajá (*Spondias* spp.) are originated from the Northeastern Brazil, with no records of their existence in other regions of the world (Prado, 2000). The umbu-cajá is a natural hybrid between cajá and umbu and since its specie is not defined, it is nominated *Spondias* spp. (da Silva Junior et al., 2004; de Souza Almeida et al., 2007). On the other hand, *Spondias purpurea* L., known as mombin, purple mombin, Spanish plum, seriguella, ciruela or jocote, has its origin in Mexico and Central America. The species caja, umbu and umbu-cajá have genetic similarities, while the seriguella is genetically different from the others (Santos & Oliveira, 2008; de Souza Almeida et al., 2007). The trees from the genus *Spondias* are xerophytic and deciduous as these plants can support very long periods of dry weather (Cole, 1960), due to morphological structure of their bulbs or tuberous roots which possess the ability to accumulate water into them (Cavalcanti et al., 2002; Miller & Schaal, 2005). These fruits are seasonal and represent an economical source for various local industries (Almeida et al., 2011). However, umbu is the only fruit of this genus that has its production recorded, 8.094 tones in 2015, with Bahia state as the main producer in Brazil (Turini, 2017). They are appreciated by the local population not only for fresh consumption, but also for use in the manufacture of ice-cream, juice, jam and others. All these fruits are small, round or oblong shaped, with color ranging from yellow to orange when ripe, with significant contents of carotenoids. However, umbu presents a yellowish-green color, as chlorophyll pigments are present even when fruits are ripe (Tiburski et al., 2011; Koziol & Macía, 1998).

Carotenoids are not only responsible for the yellow-reddish color of many fruits and vegetables, these substances are also related to the prevention of cardiovascular diseases, some cancers and macular degeneration (Britton et al., 2009; Rao & Rao, 2007; Krinsky & Johnson, 2005). Carotenoids comprise two groups: the carotenes and the xanthophylls, the latter one is commonly found esterified with different fatty acids in fruits (Mercadante et al., 2017). Acylation modifies some of the carotenoid physical-chemical properties and also

confers stability to the pigment (Fu et al., 2010; Subagio et al., 1999; Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez, 1994). However, most of the studies on composition of carotenoids applies a saponification step with consequent hydrolysis of carotenoid esters (de Rosso & Mercadante, 2007; Hamano & Mercadante, 2001; Tiburski et al., 2011). On the other side, identification of esterified carotenoids has increased in recent years considering that this is the most common form of xanthophylls found in most fruits (Delgado-Pelayo et al., 2016; Schweiggert et al., 2016; Giuffrida et al., 2012; Petry & Mercadante, 2016; Rodrigues et al., 2016; Mercadante et al., 2017). Moreover, information about the composition of carotenoids esters can help the elucidation of the arrangement of these molecules into the cells to understand mechanisms and physical-chemical interactions.

Techniques using HPLC-DAD-MS/MS systems are necessary for the separation and identification of esters of xanthophylls (Rodrigues et al., 2016; Schlatterer & Breithaupt, 2005; Breithaupt & Bamedi, 2002), thus the present study aims to identify and quantify both free and esters of carotenoids in samples of four *Spondias*: cajá, umbu, umbu-cajá and seriguela.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Standard of (all-*E*)- β -carotene was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standards of (all-*E*)-lutein and (all-*E*)- β -cryptoxanthin were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). Standards showed at least 97% of purity for (all-*E*)- β -carotene, 92% for (all-*E*)- β -cryptoxanthin and 90% for (all-*E*)-lutein, determined by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD).

Methanol (MeOH) and methyl tert-butyl ether (MTBE) of HPLC grade were acquired from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The other reagents (petroleum ether, ethyl ether and acetone) were all of analytical grade from Labsynth (Diadema, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system (Billerica, MA, USA). The samples and solvents were filtered through Millipore membranes of 0.22 and 0.45 μm , respectively.

2.2. Samples

Fruits of umbu, umbu-cajá, cajá and seriguela were acquired at the public market located in the city of João Pessoa, Paraíba State, Brazil, in January 2016. All ripe fruits (5 kg for each type of *Spondias*) arrived to the laboratory at UNICAMP (Campinas, São Paulo State) within two days after purchase. The seeds were manually removed and pulp with peel was immediately frozen in liquid nitrogen. The frozen pulp was freeze-dried below 40 μHg at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight (Liobrás, São Paulo, Brazil). The freeze-dried pulp was ground

into powder, homogenized, vacuum packaged in polyethylene bags, and stored in the dark at -37°C .

Twenty fresh fruits of each genus were used for physical-chemical characterization. Caja and seriguela showed, respectively, similar physical characteristics: 12.90 ± 2.32 g and 12.99 ± 1.24 g of weight, 26.62 ± 1.81 mm and 25.90 ± 0.88 mm of transverse diameter, 35.37 ± 3.21 mm and 33.93 ± 1.48 mm of longitudinal diameter. Umbu and umbu-cajá showed, respectively, 22.41 ± 3.21 g and 15.85 ± 2.16 g of weight, 13.34 ± 2.14 mm and 9.83 ± 1.85 mm of transverse diameter, and 17.17 ± 1.50 mm and 13.00 ± 1.84 mm of longitudinal diameter. The percentage of moisture, pH and soluble solids ($^{\circ}$ Brix) values were $86.60 \pm 0.46\%$, 2.63 ± 0.10 and 11.4 ± 0.5 in cajá; $73.83 \pm 0.35\%$, 3.04 ± 0.04 and 18.4 ± 0.9 in seriguela; $88.07 \pm 0.80\%$, 2.75 ± 0.02 and 12.2 ± 0.3 in umbu-cajá; and $88.53 \pm 0.24\%$, 2.72 ± 0.07 and 10.7 ± 0.4 in umbu.

2.3. Carotenoid extraction

Freeze-dried sample (1.00 g of umbu, 0.40 g of umbu-cajá, 0.30 g of seriguela and 0.10 g of caja), added of Hyflosupercel was extracted by maceration with 10 ml of acetone, followed by vacuum filtration through a filter paper (Mariutti et al., 2013), the process was repeated exhaustively until complete absence of color. The filtered extracts were combined, partitioned with petroleum ether/ethyl ether (1:2, v/v) and acetone was removed by washing the ether phase with water. Residual water was removed with anhydrous Na_2SO_4 . The contents were dried in a rotary evaporator and stored in vials under nitrogen atmosphere, in the dark at -37°C until analysis. The extraction was carried out in triplicate.

2.4. HPLC-DAD-MS/MS analysis

The dry carotenoid extract of umbu-caja, seriguela, umbu and caja was redissolved, respectively, in 1.00 mL, 1.00 mL, 0.50 mL and 0.40 mL of MeOH/MTBE (50:50, v/v) for analysis by HPLC-DAD-MS/MS.

The carotenoids were separated on a C_{30} YMC column (5 μm , 250 x 4.6mm i.d.) (Waters, MA, USA), kept at 35°C in a Shimadzu (Kyoto, Japan) high pressure liquid chromatography equipment (HPLC) equipped with a quaternary pump (LC-20AD), degasser (DGU- 20A5) and Rheodyne injection valve (20 μL loop, Rohnert Park, CA, USA). This equipment was coupled in series to a diode array detector (DAD) (SPDM20A) and a mass spectrometer with an ion trap analyser with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source (AmaZon Speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The mobile phase consisted of mixtures of methanol, MTBE and water as solvents A (81:15:4, v/v/v) and B (16:80.4:3.6, v/v/v). The linear gradient (1.0 mL/min) was 99% to 44% solvent A in 39 min, 39% to 0% solvent A in 6 min, returning to the initial condition (99% solvent A) in 5 min and

remaining in this condition for 5 min, resulting in a 55 min run (Rodrigues et al., 2016). UV-Vis spectra were acquired from 200 to 600 nm and processed at 270, 348 and 450 nm. The conditions for the ionization by APCI positive mode and MS conditions were the same as those previously described by Rodrigues et al. (2016).

Carotenoid identification was carried out through the combined interpretation of all data obtained by chromatographic elution order, UV-Visible spectra characteristics (maximum absorption wavelength ($\lambda_{\max}$), spectral fine structure (% III/II) and peak *cis* intensity (% A_B/A_{II})), mass spectra features (protonated molecule ($[M+H]^+$) and MS/MS fragments) and comparison with literature data (da Costa & Mercadante, 2017; Petry & Mercadante, 2016; Giuffrida et al., 2015; de Rosso & Mercadante, 2007; Breithaupt et al., 2002; Hamano & Mercadante, 2001). Quantification was done with the same calibration curves as described by da Costa & Mercadante (2017). The NAS-IOM (2001) conversion factor was used to calculate the vitamin A value and the contribution of *Z* isomers of provitamin A carotenoids were calculated as other dietary provitamin A carotenoids.

3. Results and discussion

3.1. Identification of free carotenoids and carotenoid esters in *Spondias*

In all analyzed samples fruits from *Spondias* genus, 18 free carotenoids and 20 carotenoid esters were identified (**Table 1**). Although the chromatographic conditions allowed the separation of higher number of peaks, some peaks with low amounts could not be identified because of the presence of TAGs that impaired the UV-Vis and mass spectra interpretation. Considering all the *Spondias* samples, the percentages, in relation to the total carotenoid contents, were 39-62% of free xanthophylls, 15-29% of carotenes and 23-41% of carotenoid esters.

The characteristics of the carotenoids separated in all of the *Spondias* fruits analyzed are shown in **Table 1** and the HPLC chromatograms on the C₃₀ column are shown in **Figure 1**. The carotenoids in the saponified extract of caja were already reported by Hamano & Mercadante (2001); however, identification was carried out based on elution order on C18 column, UV-visible spectra and some chemical reactions. Recently, da Costa & Mercadante (2017) reported the identification of carotenoids, including esters, in caja, considering all the information provided by elution order on C₃₀ column, UV-visible and mass spectra characteristics.

Table 1. Chromatographic, UV-Vis and mass spectroscopic characteristics, obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of pigments from fruits from *Spondias* genus.

Peak ^a	Pigments	t _R ^b (min)	λ _{max} ^c (nm)	% III/II	% A _B /II	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragment ions (m/z)
1	auroxanthin or neochrome	7.1-7.5	380,401,426	90	nc ^f	601.4	583.4 [M+H-18] ⁺ , 509.4 [M+H-92] ⁺ , 221.0
2	auroxanthin or neochrome	7.6-7.8	380,400,425	80	nc ^f	601.4	583.4 [M+H-18] ⁺ , 509.4 [M+H-92] ⁺ , 221.0
3	mixture	7.5-7.8	401,425,442	10	0	601.4	583.4 [M+H-18] ⁺ , 509.3 [M+H-92] ⁺ , 491.4 [M+H-18-92] ⁺ , 221.1
4	auroxanthin or neochrome	8.1-8.4	380,401,425	87	0	601.4	583.4 [M+H-18] ⁺ , 509.4 [M+H-92] ⁺ , 221.0
5	(all- <i>E</i>)-lutein	8.4-9.9	420,445,472	56	0	569.4	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 477.4 [M+H-92] ⁺ , 459.3 [M+H-92-18] ⁺
6	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	9.9-11.4	425,450,477	13	0	569.4	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 477.4 [M+H-92] ⁺
7	5',6'- or 5',8'-epoxy-β-cryptoxanthin	10.9-12.2	nd ^d	nc ^e	0	569.4	551.3 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 205.1
8	(13 <i>Z</i>)- or (13' <i>Z</i>)-β-cryptoxanthin	13.1-13.4	338,419,444,470	64	21	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺ , 461.3 [M+H-92] ⁺
9	(<i>Z</i>)-5,8-epoxy-β-cryptoxanthin	13.4-13.6	403,425,450	42	0	569.4	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 221.1
10	(all- <i>E</i>)-5,8-epoxy-β-cryptoxanthin	13.9-14.3	405,427,451	60	0	569.4	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 459.3 [M+H-18-92] ⁺ , 221.1
11	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	15.9-16.4	420,445,473	60	0	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺ , 460.3 [M+H-92] ⁺
12	(all- <i>E</i>)-β-cryptoxanthin	16.4-18.8	425,451,478	29	0	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺ , 461.4 [M+H-92] ⁺
13	(9 <i>Z</i>)-β-cryptoxanthin	16.5-19.0	405,430,450	nc ^e	0	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺
14	phytofluene 1 + not identified	18.7-19.0	330,348,368	70	0	543.5	487.5 [M+H-56] ⁺ , 461.5 [M+H-82] ⁺
15	phytofluene 2 + not identified	19.1-19.5	330,348,367	100	0	543.5	487.5 [M+H-56] ⁺ , 461.5 [M+H-82] ⁺
16	(all- <i>E</i>)-luteoxanthin myristate	19.6-20.6	401,427,443	90	0	811.6	793.6 [M+H-18] ⁺ , 719.5 [M+H-18-92] ⁺ , 583.4 [M+H-228] ⁺ , 565.4 [M+H-228-18] ⁺ , 547.3 [M+H-228-18-18] ⁺
17	pheophytin a	21.7-23.9	408,666	nc ^e	nc ^f	871.6	593.3 [M+H-278] ⁺
18	(all- <i>E</i>)-luteoxanthin palmitate	22.7-24.1	402,427,443	90	nc ^f	839.7	821.7 [M+H-18] ⁺ , 747.6 [M+H-92] ⁺ , 583.4 [M+H-256] ⁺
19	pheophytin a'	24.0-24.6	408,666	nc ^e	nc ^f	871.6	593.3 [M+H-278] ⁺
20	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-laurate	23.2-24.9	420,444,473	57	0	nd ^g	551.4 [M+H-200] ⁺ → 533.3 [M+H-200-18] ⁺ , 441.3 [M+H-200-56] ⁺ , 411.2
21	(all- <i>E</i>)-ζ-carotene	25.1-25.3	380,400,426	nc ^e	0	541.4	471.4 [M+H-69] ⁺ , 337.2 [M+H-204] ⁺
22	(all- <i>E</i>)-α-carotene	25.3-25.7	420,446,474	56	0	537.4	481.3 [M+H-56] ⁺ , 444.2 [M+H-92] ⁺
23	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-laurate	25.2-27.1	422,445,471	20	0	nd ^g	733.7 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-200-18] ⁺ → 441.3 [M+H-200-56] ⁺ , 411.3

24	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-myristate	27.1-27.3	420,445,473	60	0	nd ^g	551.4 [M+H-228]⁺ → 533.4 [M+H-228-18] ⁺
25	(all- <i>E</i>)-β-carotene	26.0-28.7	430,451,478	33	0	537.4	445.4 [M+H-92] ⁺
26	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-myristate	26.3-26.4	420,446,473	46	0	nd ^g	761.6 [M+H-18]⁺ → 705.5 [M+H-18-56] ⁺ , 533.4 [M+H-228] ⁺ , 441.3 [M+H-228-56] ⁺ , 411.3
27	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-palmitate	28.6-28.7	420,445,472	nc ^e	0	nd ^g	789.6 [M+H-18]⁺ → 533.4 [M+H-256] ⁺
28	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-oleate	28.7-30.4	420,445,473	52	0	nd ^g	551.4 [M+H-264]⁺ , 533.4 [M+H-282-18] ⁺ , 477.3 [M+H-282-18-56] ⁺ , 441.3 [M+H-282-92] ⁺ , 411.3
29	(all- <i>E</i>)-β-cryptoxanthin caprate	29.1-32.1	420,452,478	nc ^e	0	707.6	615.6 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-172] ⁺ , 443.3 [M+H-172-92] ⁺
30	(all- <i>E</i>)-β-cryptoxanthin laurate	34.1-36.6	428,449,475	nc ^e	0	735.6	643.5 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-200] ⁺ , 443.4 [M+H-200-92] ⁺
31	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-stearate	35.6-37.5	420,446,473	nc ^e	0	nd ^g	817.7 [M+H-18]⁺ → 725.7 [M+H-18-92] ⁺ , 533.4 [M+H-284] ⁺ , 477.3 [M+H-284-56] ⁺ , 441.4 [M+H-284-56-92] ⁺ , 411.3
32	(all- <i>E</i>)-β-cryptoxanthin myristate	35.7-37.8	420,445,4478	31	0	763.7	671.6 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-228] ⁺ , 443.3 [M+H-228-92] ⁺
33	(all- <i>E</i>)-lutein dicaprate	40.3-40.7	426,444,472	nc ^e	0	nd ^g	705.6 [M+H-172]⁺ → 533.4 [M+H-172-172] ⁺ , 441.3 [M+H-172-56-92] ⁺ , 411.3
34	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate	41.8-41.9	420,444,474	40	0	nd ^g	733.6 [M+H-228]⁺ , 761.5 [M+H-200]⁺ , 533.4 [M+H-228-200]⁺
35	(all- <i>E</i>)-β-cryptoxanthin palmitate	41.2-43.1	425,451,477	29	0	791.7	699.6 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-256] ⁺ , 443.4 [M+H-92] ⁺
36	(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	42.7-43.2	426,446,474	60	0	nd ^g	761.7 [M+H-228]⁺ → 742.9 [M+H-228-18] ⁺ , 705.6 [M+H-228-56] ⁺ , 669.5 [M+H-228-92] ⁺ , 533.4 [M+H-228-228] ⁺ , 477.3 [M+H-228-228-56] ⁺ , 441.3 [M+H-228-228-92] ⁺ , 411.3
37	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	44.7-45.5	420, 448, 474-5	44	0	819.7	802.6 [M+H-18] ⁺ , 727.8 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-284] ⁺ , 443.3 [M+H-284-92] ⁺
38	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-myristate-3'-O-palmitate	45.6-46.4	420,444,474	nc ^e	0	nd ^g	761.7 [M+H-256]⁺ → 743.8 [M+H-256-18] ⁺ , 533.4 [M+H-256-228] ⁺ , 477.4 [M+H-256-228-56] ⁺ , 441.3 [M+H-256-228-92] ⁺ , 411.3; 789.7 [M+H-228]⁺ → 771.7 [M+H-228-18] ⁺ , 533.4 [M+H-228-256] ⁺ , 477.4 [M+H-228-256-56] ⁺ , 441.3 [M+H-228-256-92] ⁺ , 411.3
39	(all- <i>E</i>)-lutein dipalmitate	45.6-46.1	420,446,474	40	0	nd ^g	789.7 [M+H-256]⁺ → 533.4 [M+H-256-256]⁺ , 477.4 [M+H-256-256-56] ⁺ , 441.3 [M+H-256-256-92] ⁺ , 411.3
40	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-stearate 3'-O-palmitate	46.1-46.7	420,444,472	nc ^e	0	nd ^g	789.7 [M+H-284]⁺ → 733.7 [M+H-284-56] ⁺ , 697.7 [M+H-284-92] ⁺ , 533.4 [M+H-284-256] ⁺ , 477.4 [M+H-284-256-56] ⁺ , 441.3 [M+H-284-256-92] ⁺ , 411.3; 817.7 [M+H-256]⁺ → 799.7 [M+H-256-18] ⁺ , 725.7 [M+H-256-92] ⁺ , 533.4 [M+H-256-284] ⁺ , 477.4 [M+H-256-284-56] ⁺ , 441.3 [M+H-256-284-92] ⁺ , 411.3

^aNumbered according to the chromatograms shown in Figures 1A, 1B, 1C e 1D for, respectively, cajá (*Spondias mombin* L.); umbu (*Spondias tuberosa*); umbu-cajá (*Spondias* spp.) and seriguela (*Spondias purpurea* L.). ^bRetention time on C30 column (see Material and Methods for chromatographic conditions). ^cLinear gradient containing mixture of MeOH, MTBE, and H₂O. ^dUV/vis spectrum was not clearly detected because of coelution or low concentration. ^e% III/II was not calculated because of poor definition of the UV/vis spectrum or because it was not detected. ^f% A_B/A_{II} was not calculated because of poor definition of the UV/vis spectrum or because it was not detected. ^g[M + H]⁺ or MS/MS fragments were not detected. Underlined fragments are the most abundant in the MS/MS spectrum. Bold face indicates MS in-source fragment ions.

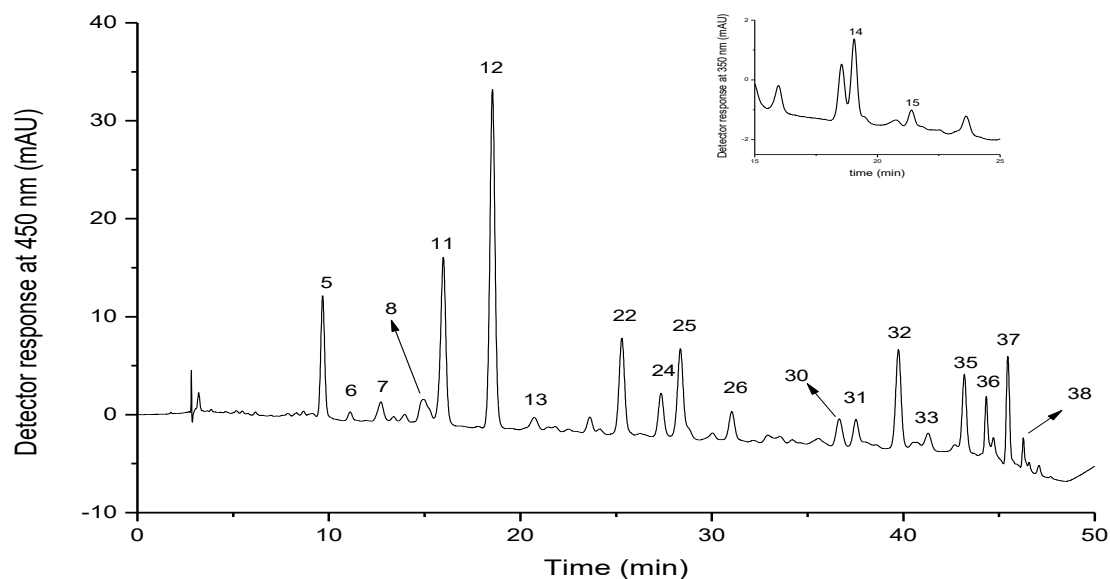


Figure 1. Chromatograms (processed at 450 nm and 350 nm), obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids from caja (*Spondias mombin* L.). See text for chromatographic conditions. Peak identification and characterization are given in **Table 1**.

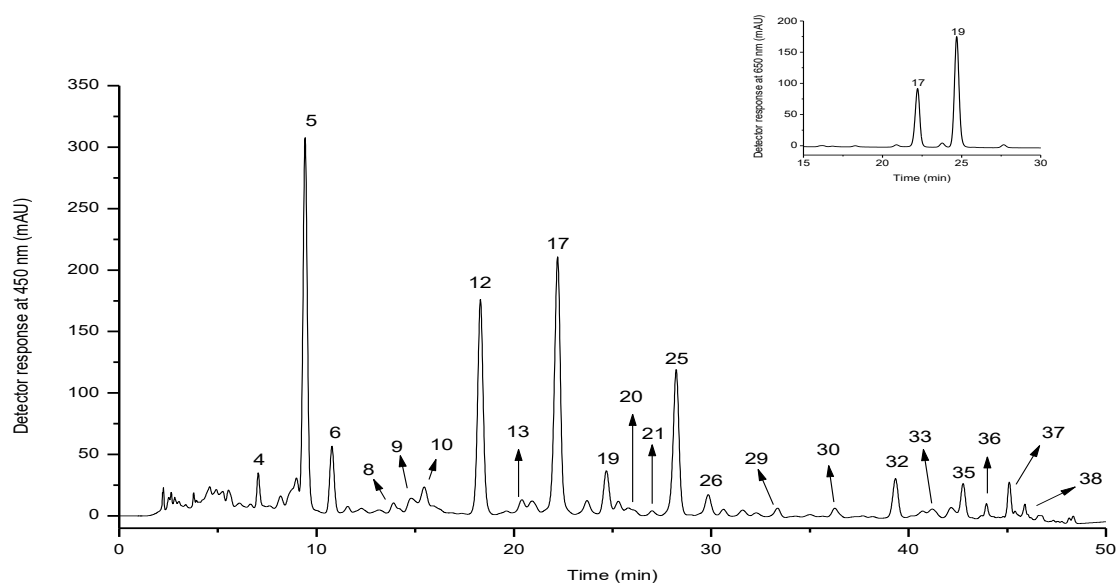


Figure 2. Chromatograms (processed at 450 nm and 350 nm), obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids from umbu (*Spondias tuberosa*). See text for chromatographic conditions. Peak identification and characterization are given in **Table 1**.

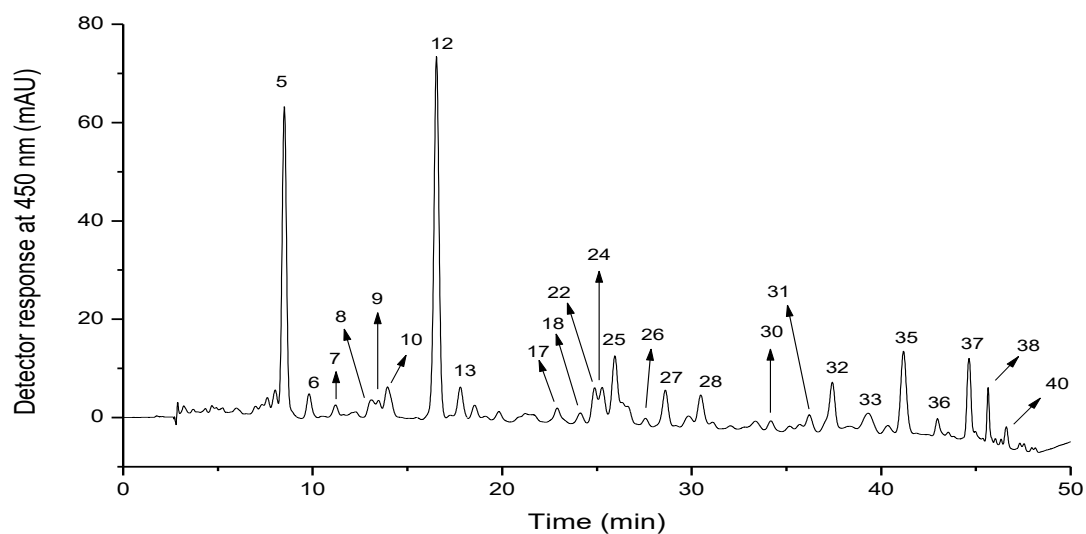


Figure 3. Chromatogram (processed at 450 nm), obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids from umbu-caja (*Spondias* spp.). See text for chromatographic conditions. Peak identification and characterization are given in **Table 1**.

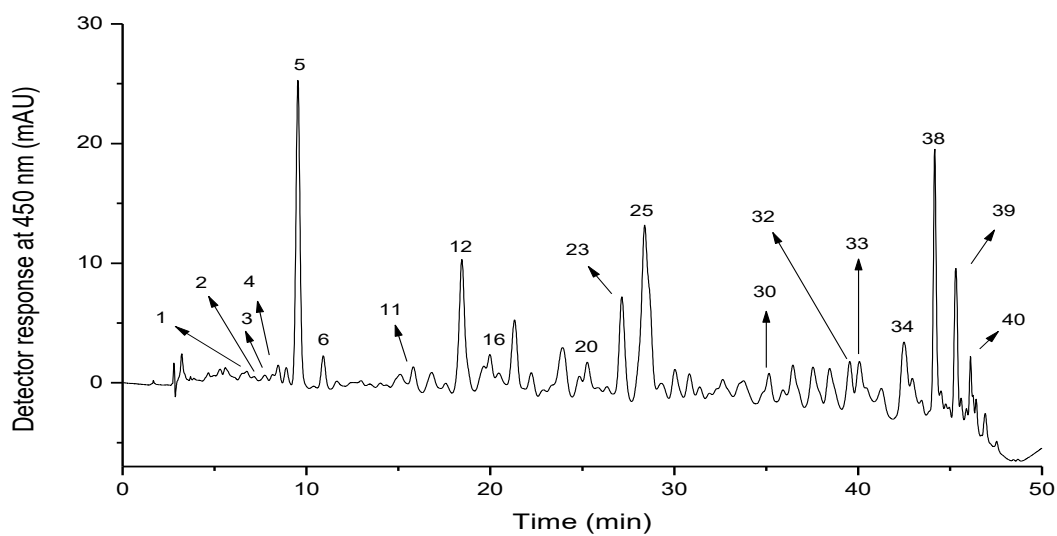


Figure 4. Chromatogram (processed at 450 nm), obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids from seriguela (*Spondias purpurea* L.) See text for chromatographic conditions. Peak identification and characterization are given in **Table 1**.

As can be seen in **Figure 1, 2, 3 e 4** (all-*E*)-lutein (peak 5), (all-*E*)-zeaxanthin (peak 6), (all-*E*)- β -cryptoxanthin (peak 12), (all-*E*)- β -carotene (peak 25) and the following carotenoids esters: (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate (peak 30), (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate (peak 32), (all-*E*)-lutein dicaprate (peak 33) and (all-*E*)-lutein-3'-O-myristate-3'-O-palmitate (peak 38) were identified in all the analyzed species of *Spondias* in present study.

(all-*E*)-lutein (peak 5), (all-*E*)-zeinoxanthin (peak 11), (all-*E*)- β -cryptoxanthin (peak 12), (all-*E*)- α -carotene (peak 22), (all-*E*)- β -carotene (peak 25) were previously found in cajá by Hamano & Mercadante (2001) and da Costa & Mercadante (2017), while (all-*E*)-zeaxanthin (peak 6), (all-*E*)-lutein-3'-O-myristate (peak 24), (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate (peak 32), (all-*E*)- β -cryptoxanthin palmitate (peak 35), (all-*E*)-lutein dimyristate (peak 36) and (all-*E*)-zeinoxanthin stearate (peak 37) were only detected by da Costa & Mercadante (2017). All these carotenoids were also detected in caja fruit in the present study.

The carotene (all-*E*)- ζ -carotene (peak 21), (all-*E*)- β -cryptoxanthin caprate (peak 29) and two chlorophyll-derivatives, pheophytin a (peak 17) and pheophytin a' (peak 19), were only identified in umbu. (all-*E*)-Luteoxanthin palmitate (peak 18), (all-*E*)-lutein-3'-O-palmitate (peak 27) and (all-*E*)-lutein-3'-O-oleate (peak 28) were only identified in umbu-cajá (*Spondias* spp.). Auroxanthin or neochrome (peaks 1 and 2), (all-*E*)-luteoxanthin myristate (peak 16), (all-*E*)-lutein-3'-O-laurate (peak 23) and (all-*E*)-lutein dipalmitate (peak 39) were only identified in seriguela.

Thus, only identification of peaks not reported in those papers is discussed below. The elution order of (*Z*)- and (all-*E*)-carotenoids on the C₃₀ column is well-known (Mariutti et al., 2013; de Rosso & Mercadante, 2007) and the elution order of esters on the C30 column was recently reported (Mercadante et al., 2017; Petry & Mercadante, 2016; da Costa & Mercadante, 2017; Rodrigues et al., 2016) and confirmed by our results.

Peaks 1, 2 and 4 were tentatively identified as auroxanthin or neochrome, all with protonated molecule ([M+H]⁺) at *m/z* 601.4, losses of water (583.4 u) and toluene (509.4 u). The presence of a fragment at *m/z* 221.0 confirmed the loss of an epoxy or furanoid group at 3-hydroxy- β -ring end-group (Mercadante et al., 2017; de Rosso & Mercadante, 2007). The assignment of the *E-Z* isomer was not possible considering that all these peaks presented similar fine structure (% III/II values) and the presence of the *cis* peak could not be measured in peaks 1 and 2. Peaks 1 and 2 were found only in seriguela, while peak 4 was identified in seriguela and umbu.

Although the UV-Vis spectrum of peak 7 was not clear, it was tentatively identified as 5',6' or 5',8'-epoxy- β -cryptoxanthin considering its elution order and MS characteristics. The [M+H]⁺ was detected at *m/z* 569.4, and MS/MS fragments at *m/z* 551.3 and 533.4 indicated the loss of one and two water molecules, respectively. The location of an epoxy/furanoid group in a non-hydroxylated β -ring was confirmed by the detection of the MS/MS fragment at

m/z 205 (de Faria et al., 2009). Peaks 9 and 10 were, respectively, identified as (*Z*)-5,8-epoxy- β -cryptoxanthin and (all-*E*)-5,8-epoxy- β -cryptoxanthin, considering their UV-Vis and elution order, as previously described by de Faria et al. (2009). Although the $[M+H]^+$ and losses of one and two waters molecules were detected at the same m/z values for all those three peaks (7, 9 and 10), the location of the epoxy/furanoid group can be assigned at a 3-hydroxy- β -ring end-group when a MS/MS fragment at m/z 221.1 is detected or at a non-hydroxylated β -ring in case a fragment at m/z 205 is found (de Faria et al., 2009). Peak 7 was identified only in caja and umbu-caja while peaks 9 and 10 were detected in umbu and umbu-cajá.

Considering the MS characteristics of peaks 8, 12 and 13, $[M+H]^+$ at m/z 553.4, MS/MS fragments at m/z 535.4 ($[M+H-18]^+$) and at m/z 461.3 ($[M+H-92]^+$), they were identified as β -cryptoxanthin isomers. Peaks 8 and 13 were tentatively identified as (13*Z*)- or (13'*Z*)- β -cryptoxanthin and (9*Z*)- β -cryptoxanthin, respectively, considering their elution order, % III/II and A_B/II values compared to the literature (de Rosso & Mercadante, 2007; de Faria et al., 2009). The *Z* isomers (peaks 8 and 13) may be formed by the acids naturally found in fruits. (all-*E*)- β -Cryptoxanthin was one of the main carotenoids in all genus *Spondias*, while its *Z* isomers were detected in caja, umbu and umbu-cajá.

Peaks 16 and 18 were identified as esters of (all-*E*)-luteoxanthin acylated, respectively, with myristic and palmitic acids. The features of UV-Vis were identical to data reported for (all-*E*)-luteoxanthin in the literature (Rodrigues et al., 2013). The identification of (all-*E*)-luteoxanthin myristate (peak 16) was further based on the $[M+H]^+$ at m/z 811.6 and MS/MS fragments indicating loss of myristic acid combined with one ($[M+H-18-228]^+$) or two water molecules ($[M+H-18-18-228]^+$), as can be verified in Table 1. Similarly, peak 18 was identified as (all-*E*)-luteoxanthin palmitate considering the $[M+H]^+$ at m/z 839.7 and MS/MS fragments indicating loss of palmitic acid (molecular mass of 256.4 u) combined with one water molecule ($[M+H-18-256]^+$). These data are in accordance with those previously reported by Petry & Mercadante (2016). (all-*E*)-luteoxanthin myristate was identified in seriguela while (all-*E*)-luteoxanthin palmitate was only detected in umbu-cajá.

Peak 21 was identified as (all-*E*)- ζ -carotene considering its UV-Vis with λ_{max} at 380, 400, 426 nm, $[M+H]^+$ at m/z 541.4, and MS/MS fragments at m/z 471.4 ($[M+H-69]^+$) indicating a cleavage between C-3 and C-4 and at m/z 337.2, as previously reported (de Rosso & Mercadante, 2007). This carotene was only identified in umbu.

Besides free lutein, 7 monoesters and 6 diesters of lutein were identified in different genus of *Spondias*. (all-*E*)-Lutein-3'-O-laurate (peak 20), (all-*E*)-lutein-3-O-laurate (peak 23), (all-*E*)-lutein-3'-O-myristate (peak 24), (all-*E*)-lutein-3-O-myristate (peak 26), (all-*E*)-lutein-3-O-palmitate (peak 27), (all-*E*)-lutein-3'-O-oleate (peak 28) and (all-*E*)-lutein-3-O-stearate (peak 31) were the lutein monoesters identified and (all-*E*)-lutein dicaprate (peak 33), (all-*E*)-

lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate (peak 34), (all-*E*)-lutein dimyristate (peak 36), (all-*E*)-lutein-3-O-myristate-3'-O-palmitate (peak 38), (all-*E*)-lutein dipalmitate (peak 39) and (all-*E*)-lutein-3-O-stearate 3'-O-palmitate (peak 40) were the diesters. They all showed UV-Vis features similar to those of (all-*E*)-lutein.

As expected, (all-*E*)-lutein-3'-O-laurate (peak 20) and (all-*E*)-lutein-3-O-laurate (peak 23) did not show the $[M+H]^+$; however, they were identified based on the MS/MS fragments representing loss of the fatty acid alone (m/z 551.4) or combined with water elimination (m/z 533.3) and even combined with loss of the ϵ -ring (m/z 441.3). Differentiation between these two regioisomers were carried out according to Rodrigues et al. (2016); when the substituent is attached to the ϵ -ring, the fragment ion generated in source is more stable and presents a more intense m/z signal in the MS spectrum than that generated when the substituent is attached to the β -ring. In other words, peak 23 presented an intense in source fragment at m/z 733.7 corresponding to loss of water from the ϵ -ring, thus the fatty acid should be located at the β -ring. Following the same rationale, peak 24 was identified as (all-*E*)-lutein-3'-O-myristate, peak 26 as (all-*E*)-lutein-3-O-myristate, peak 27 as (all-*E*)-lutein-3-O-palmitate, peak 28 as (all-*E*)-lutein-3'-O-oleate and peak 31 as (all-*E*)-lutein-3-O-stearate. These characteristics were previously described (Petry & Mercadante, 2016; Rodrigues et al., 2016; Mercadante et al., 2017).

Peaks 33, 36 and 39 were identified as homodiesters of lutein, respectively (all-*E*)-lutein dicaprinate, (all-*E*)-lutein dimyristate and (all-*E*)-lutein dipalmitate. Their identification was mainly based on the MS/MS fragment showing double loss of the fatty acid. For example, in-source fragment at m/z 705.6 ($[M+H-10:0]^+$) and MS/MS fragment at m/z 533.4 corresponding to ($[M+H-10:0-10:0]^+$) were observed for peak 33. These fragments were reported by Petry & Mercadante (2016). Applying the same logic described above, heterodiesters of lutein were also identified in *Spondias*. Peaks 34, 38 and 40 were, respectively, identified as (all-*E*)-lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate, (all-*E*)-lutein-3-O-myristate-3'-O-palmitate and (all-*E*)-lutein-3-O-stearate 3'-O-palmitate.

The (all-*E*)-Lutein-3'-O-laurate was identified in umbu and seriguela, while (all-*E*)-lutein-3-O-laurate and (all-*E*)-lutein dipalmitate were detected only in seriguela. On the other hand, (all-*E*)-lutein-3'-O-myristate and (all-*E*)-lutein-3-O-stearate were detected only in cajá and umbu-cajá, (all-*E*)-lutein-3-O-myristate and (all-*E*)-lutein dimyristate were identified in the later two and also in umbu. The (all-*E*)-Lutein-3-O-palmitate and (all-*E*)-lutein-3'-O-oleate were only detected in umbu-cajá (all-*E*)-Lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate was found in caja and seriguela and (all-*E*)-lutein-3-O-stearate 3'-O-palmitate in umbu-caja and seriguela (all-*E*)-Lutein dicaprinate and (all-*E*)-lutein-3-O-myristate-3'-O-palmitate were observed in all analyzed genus of *Spondias*.

Peaks 29, 30, 32 and 35 were identified as esters of (all-*E*)- β -cryptoxanthin based on their UV-Vis similar to that of the free xanthophyll. Table 1 shows the $[M+H]^+$ detected for all these peaks along with the MS/MS fragment due to the loss of the fatty acid moiety. These characteristics allowed the identification of peak 29 as (all-*E*)- β -cryptoxanthin caprate, peak 30 as (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate, peak 32 as (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate and peak 35 as (all-*E*)- β -cryptoxanthin palmitate.

Although (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate and (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate were detected in all analyzed genus of *Spondias*, (all-*E*)- β -cryptoxanthin caprate was observed only in umbu and (all-*E*)- β -cryptoxanthin palmitate in umbu and umbu-cajá.

Peak 37, identified as (all-*E*)-zeinoxanthin stearate and previously found in caja (da Costa & Mercadante, 2017), was also identified in umbu e umbu-cajá.

The literature shows different fatty acids in various parts of the fruits from the genus *Spondias*. In skin and pulp of caja butyric acid, hexanoic acid, octanoic acid and palmitic acid were identified (Adedeji et al., 1991). Palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and arachidic acid were identified in seeds of umbu (Borges et al., 2007). Hexanoic acid, octanoic acid and decanoic acid were identified as volatile compounds in cajá (Allegrone & Barbeni, 1992). Although most of the data on fatty acid composition is related to different parts of the fruits, considering that the fatty acids found acylated to carotenoids in *Spondias* were myristic, palmitic, lauric, capric, oleic and stearic, apparently there is no correlation between free fatty acids or acylation pattern of triacylglycerols and carotenoids. This behavior was also observed for other fruits, such as murici (Rodrigues et al., 2016), paprika (Breithaupt & Schwack, 2000) and strawberry tree (Delgado-Pelayo et al., 2015).

3.2. Identification of chlorophyll derivatives

Only samples of umbu (*Spondias tuberosa*) showed elution of chlorophyll derivatives. Peaks 17 and 19 were identified as pheophytin a and pheophytin a', respectively, considering their λ_{max} at 408 and 666 nm, along with the $[M+H]^+$ at m/z 871.6 and MS/MS fragment at m/z 593.3 indicating phytol ($C_{20}H_{38}$) elimination. Phytol elimination was also reported in MS/MS analyzes of chlorophyll a in spinach (van Breemen et al., 1991). The fact that chlorophyll derivatives were found in samples of umbu justifies the yellow-green color of the fruits even when ripe.

3.3. Quantitative composition of carotenoids

Among the *Spondias* samples analyzed, seriguela (*Spondias purpurea* L.) is the one that presented the greatest difficulty in the identification of carotenoids, the fact may be associated with the complexity and the genetic differentiation that the seriguela presents

when compared to the caja, umbu and umbu-caja (Santos & Oliveira, 2008; de Souza Almeida et al., 2007).

Table 2 shows the quantification of 24 peaks in umbu-caja (*Spondias* spp.), 21 in caja (*Spondias mombin* L.), 20 in umbu (*Spondias tuberosa*) and 19 in seriguela (*Spondias purpurea* L.). Despite the high number of quantified carotenoids, the major carotenoids in all *Spondias* evaluated were (all-*E*)-lutein, (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)- β -carotene, (all-*E*)- β -cryptoxanthin laurate and (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate, with their sum representing 51 %, 67 %, 54 % and 52 % of the total carotenoids in cajá, umbu, umbu-cajá and seriguela, respectively. Besides those carotenoids, (all-*E*)-zeinoxanthin contributed with 11% in caja (*Spondias mombin* L.) and (all-*E*)- α -carotene with 10 % in umbu-cajá (*Spondias* spp.).

Similar result was reported for pulp of caja (*Spondias mombin* L.), harvested in Panama, with (all-*E*)-lutein, (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)- β -carotene, (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate and (all-*E*)- β -cryptoxanthin palmitate as the major carotenoids (Giuffrida et al., 2015). High amounts of (all-*E*)-zeinoxanthin, a not so commonly found carotenoid, was previously reported in caja as 15-17% of the total carotenoid content (Hamano & Mercadante, 2001; da Costa & Mercadante, 2017).

Among the major carotenoids presented in Table 2, we highlight (all-*E*)-lutein with 14.89 ± 0.93 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) and 13.92 ± 0.73 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu-cajá and seriguela, (all-*E*)- β -cryptoxanthin with 42.70 ± 2.32 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) and 19.12 ± 0.67 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in cajá and umbu-cajá, (all-*E*)- β -carotene with 22.98 ± 0.85 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) and 13.83 ± 0.60 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu-cajá and cajá, (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate with 14.73 ± 0.79 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu-cajá and (all-*E*)-zeinoxanthin stearate with 10.63 ± 0.58 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in cajá.

Murillo et al. (2010), reported the amounts of carotenoids in fresh weight, 8.6 ± 0.7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of (all-*E*)-lutein and 1.2 ± 0.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-zeaxanthin in cajá, 6.3 ± 0.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-lutein and 0.8 ± 0.1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-zeaxanthin in seriguela, values higher than those obtained in this study, also in fresh weight, 1.6 ± 0.1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-lutein and 0.3 ± 0.0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-zeaxanthin values in caja and 3.6 ± 0.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-lutein and 0.7 ± 0.02 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (all-*E*)-zeaxanthin in seriguela.

The highest total carotenoid content was found in caja (*Spondias mombin* L.) (192.39 ± 8.20 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$), followed by 125.75 ± 4.21 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu-caja (*Spondias* spp.), 74.58 ± 1.73 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in seriguela (*Spondias purpurea* L.) and 28.07 ± 2.04 ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) in umbu (*Spondias tuberosa*) (**Table 2**). The levels of provitamin A value followed the same order given above.

Table 2. Pigment composition and vitamin A value of pulp from different fruits of *Spondias* genus.

Peak ^a	Carotenoid	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}^*$)			
		cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	umbu (<i>Spondias tuberosa</i>)	umbu-cajá (<i>Spondias</i> spp.)	seriguela (<i>Spondias purpurea</i> L.)
1	auroxanthin or neochrome	<LOD	<LOD	<LOD	1.34 $\pm$ 0.00
2	auroxanthin or neochrome	<LOD	<LOD	<LOD	1.22 $\pm$ 0.10
3	mixture	<LOD	<LOD	<LOD	1.35 $\pm$ 0.01
4	auroxanthin or neochrome	<LOD	0.61 $\pm$ 0.01	<LOD	1.71 $\pm$ 0.03
5	(all- <i>E</i>)-lutein	11.65 $\pm$ 0.56	7.22 $\pm$ 0.72	14.89 $\pm$ 0.93	13.92 $\pm$ 0.73
6	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	2.09 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.13	1.85 $\pm$ 0.02	2.76 $\pm$ 0.08
7	5',6'- ou 5',8'-epoxy- β -cryptoxanthin	4.18 $\pm$ 0.19	<LOD	1.93 $\pm$ 0.03	<LOD
8	(13 <i>Z</i>)- or (13' <i>Z</i>)- β -cryptoxanthin	3.98 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01	3.00 $\pm$ 0.10	<LOD
9	(<i>Z</i>)-5,8-epoxy- β -cryptoxanthin	<LOD	0.77 $\pm$ 0.06	2.96 $\pm$ 0.10	<LOD
10	5,8-epoxy- β -cryptoxanthin	<LOD	1.16 $\pm$ 0.09	2.09 $\pm$ 0.11	<LOD
11	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	21.51 $\pm$ 0.82	<LOD	<LOD	1.59 $\pm$ 0.03
12	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin	42.70 $\pm$ 2.32	5.39 $\pm$ 0.66	19.12 $\pm$ 0.67	9.26 $\pm$ 0.53
13	(9 <i>Z</i>)- β -cryptoxanthin	2.62 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.03	3.41 $\pm$ 0.03	<LOD
14	phytofluene 1 + not identified	5.13 $\pm$ 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
15	phytofluene 2 + not identified	2.98 $\pm$ 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
16	(all- <i>E</i>)-luteoxanthin myristate	<LOD	<LOD	<LOD	3.41 $\pm$ 0.11
17	pheophytin a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	(all- <i>E</i>)-luteoxanthin palmitate	<LOD	<LOD	2.44 $\pm$ 0.05	<LOD
19	pheophytin a'	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
20	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-laurate	<LOD	0.34 $\pm$ 0.02	<LOD	2.04 $\pm$ 0.04
21	(all- <i>E</i>)- ζ -carotene	<LOD	0.42 $\pm$ 0.01	<LOD	<LOD
22	(all- <i>E</i>)- α -carotene	13.19 $\pm$ 0.53	<LOD	13.00 $\pm$ 0.71	<LOD
23	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-laurate	<LOD	<LOD	<LOD	5.57 $\pm$ 0.17
24	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-myristate	7.00 $\pm$ 0.36	<LOD	3.32 $\pm$ 0.14	<LOD
25	(all- <i>E</i>)- β -carotene	13.83 $\pm$ 0.60	3.74 $\pm$ 0.18	22.98 $\pm$ 0.85	10.78 $\pm$ 0.34
26	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-myristate	5.26 $\pm$ 0.19	0.73 $\pm$ 0.03	1.92 $\pm$ 0.04	<LOD
27	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-palmitate	<LOD	<LOD	3.01 $\pm$ 0.20	<LOD
28	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-oleate	<LOD	<LOD	2.61 $\pm$ 0.19	<LOD
29	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin caprate	<LOD	0.51 $\pm$ 0.03	<LOD	<LOD
30	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin laurate	5.56 $\pm$ 0.24	0.51 $\pm$ 0.04	2.12 $\pm$ 0.06	2.01 $\pm$ 0.03
31	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-stearate	4.67 $\pm$ 0.22	<LOD	1.74 $\pm$ 0.02	<LOD
32	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin myristate	14.73 $\pm$ 0.79	1.29 $\pm$ 0.08	3.84 $\pm$ 0.05	3.04 $\pm$ 0.01
33	(all- <i>E</i>)-lutein dicaprate	3.25 $\pm$ 0.21	0.63 $\pm$ 0.05	2.93 $\pm$ 0.13	1.94 $\pm$ 0.09
34	(all- <i>E</i>)-lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate	9.27 $\pm$ 0.53	<LOD	<LOD	2.75 $\pm$ 0.21

35	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin palmitate	<LOD	0.99 ± 0.07	6.20 ± 0.25	<LOD
36	(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	5.10 ± 0.35	0.36 ± 0.01	1.76 ± 0.04	<LOD
37	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	10.63 ± 0.58	0.63 ± 0.02	4.37 ± 0.07	<LOD
38	(all- <i>E</i>)-lutein-3- <i>O</i> -myristate-3'- <i>O</i> -palmitate	3.08 ± 0.21	0.31 ± 0.01	2.38 ± 0.16	5.24 ± 0.44
39	(all- <i>E</i>)-lutein dipalmitate	<LOD	<LOD	<LOD	3.31 ± 0.24
40	(all- <i>E</i>)-lutein -3- <i>O</i> -stearate 3'- <i>O</i> -palmitate	<LOD	<LOD	1.88 ± 0.05	1.34 ± 0.03
Total		192.39 ± 8.20	28.07 ± 2.04	125.75 ± 4.21	74.58 ± 1.73
Provitamin A Value ($\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$)		997.6 ± 46.4	143.3 ± 9.2	805.4 ± 27.4	298.9 ± 8.4

Values are average and standard deviation of triplicates. The limit of detection (LOD) was 0.1 mg/mL and limit of quantification (LOQ) was 0.2 mg/mL for (all-*E*)-lutein, 0.3 mg/mL for (all-*E*)- β -cryptoxanthin and (all-*E*)- β -carotene according by da Costa & Mercadante (2017). *dw - freeze-dried pulp. ^aNumbered according to the chromatograms shown in Figures 1A, 1B, 1C e 1D for, respectively, caja (*Spondias mombin* L.); umbu (*Spondias tuberosa*); umbu-caja (*Spondias* spp.) and seriguela (*Spondias purpurea* L.).

Only results for carotenoid contents from caja (*Spondias mombin* L.) were found in the literature. Total carotenoid $25.78 \pm 1.1 \mu\text{g.g}^{-1}$ fw in cajá fruit found in the present study was similar to $22.86 \pm 3.76 \mu\text{g/g}$ fw in frozen pulp of cajá (Hamano & Mercadante, 2001) and to $23.9 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ fw in frozen pulp of caja (da Costa & Mercadante, 2017). On the other hand, the contents were lower than those from cajá fruits harvested in Panama, $45.8 \pm 3.1 \mu\text{g.g}^{-1}\text{fw}$ (Giuffrida et al., 2015) and in Aracaju state of Brazil, $48.69 \pm 1.57 \mu\text{g.g}^{-1}\text{fw}$ (Tiburski et al., 2011).

The percentage of esters in relation to the total carotenoids was 36 % in cajá, 22 % in umbu, 29 % in umbu-cajá and 37 % in seriguela. This fact demonstrates that esters of carotenoids play an important role in the carotenoid composition of fruits despite that the percentage in *Spondias* is lower than in other fruits. For example, in murici 66 % of the total carotenoids corresponded to carotenoids esters (Rodrigues et al., 2016), in red bell peppers 96 % of all existing carotenoids are carotenoids esters (Gregory et al., 1987) and in fruit espinheiro-marítimo (*Hippophae rhamnoides* L., ssp. *Carpatica*) cv. Victoria, 65% of the total content of carotenoids corresponded to carotenoid esters (Pop et al., 2014).

4. Literature cited

- Adedeji, J., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (1991). Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombin* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1494-1497.
- Allegrone, G., & Barbeni, M. (1992). Identification of volatile components of caja fruit (*Spondias lutea* L.) and chiral analysis of 3-hydroxy aliphatic esters. *Flavour and Fragrance Journal*, 7, 337-342.
- Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A. & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*. 44, 2155-2159.
- Bachelier, J. B., & Endress, P. K. (2009). Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (*Sapindales*), with a special focus on gynoecium structure and evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159, 499–571.
- Borges, S. V., Maia, M. C. A., Gomes, R. D. C. M., & Cavalcanti, N. B. (2007). Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. *Química Nova*, 30, 49-52.
- Breithaupt, D. E., Wirt, U. & Bamedi, A. (2002). Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 66-70.

- Breithaupt, D. E., & Bamedi, A. (2002). Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): new insights into an ancient vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7175-7181.
- Breithaupt, D. E., Schwack, W. (2000). Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. *European Food Research Technology*, 211, 52-55.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. & Pfander H. (2009). Carotenoids; Vol. 5: Nutrition and health, Birkhauser: Verlag, Basel, Boston, Berl.
- Cavalcanti, N. D. B., Resende, G. M., & Brito, L. D. L. (2002). Levantamento da produção de xilopódios e os efeitos de sua retirada sobre a frutificação e persistência de plantas nativas de imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). *Ciência e Agrotecnologia*, 26, 927-942.
- Cole, M. M. (1960). Cerrado, caatinga and pantanal: the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. *The Geographical Journal*, 126, 168-179.
- da Costa, G. A., & Mercadante, A. Z. (2017). In vitro bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.012>
- da Silva Junior, J. F., Bezerra, J. E. F., Lederman, I. E., Alves, M. A., & de Melo Neto, M. L. (2004). Collecting, ex situ conservation and characterization of “cajá-umbu” (*Spondias mombin* × *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 343-349.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2016). Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, 199, 165-175.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., Hornero-Méndez, D. (2015). Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, Article In press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.135>
- de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062-5072.
- de Faria, A. F., Hasegawa, P. N., Chagas, E. A., Pio, R., Purgatto, E., & Mercadante, A. Z. (2009). Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 196-203.
- de Souza Almeida, C. C., de Lemos Carvalho, P. C., & Guerra, M. (2007). Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Uumbu-cajá (*Anacardiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155, 541-547.

- Fu, H., Xie, B., Fan, G., Ma, S., Zhu, X., & Pan, S. (2010). Effect of esterification with fatty acid of β -cryptoxanthin on its thermal stability and antioxidant activity by chemiluminescence method. *Food Chemistry*, 122, 602-609.
- Giuffrida, D., Pintea, A., Dugo, P., Torre, G., Pop, R. M., & Mondello, L. (2012). Determination of Carotenoids and their Esters in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS. *Phytochemical Analysis*, 23, 267-273.
- Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., & Murillo, E. (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70, 163-172.
- Gregory, G. K., Chen, T. S., & Philip, T. (1987). Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: red bell peppers. *Journal of Food Science*, 52, 1071-1073.
- Hamano, P. S. & Mercadante, A. Z. (2001). Composition of carotenoids from commercial products of cajá (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 14, 335-343.
- Kozioł, M. J., & Macía, M. J. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). *Economic Botany*, 52, 373-380.
- Krinsky, N. I. & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Mariutti, L. R. B., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and *in vitro* scavenging capacity against peroxy radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 155–160.
- Mercadante, A. Z., Rodrigues, D. B., Petry, F. C., & Mariutti, L. R. B. (2017). Carotenoid esters in foods-A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Research International*, 99, 830-850.
- Mitchell, J. D., & Daly, D. C. (2015). A revision of *Spondias* L.(Anacardiaceae) in the Neotropics. *PhytoKeys*, 55, 1.
- Miller, A., & Schaal, B. (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12801-12806.
- Minguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Mendez, D. (1994). Changes in carotenoid esterification during thre fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 640-644.
- Murillo, E., Meléndez-Martínez, A. J., & Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chemistry*, 122, 167-172.

- NAS-IOM., (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *National Academy Press*, Washington, p. 92.
- Petry, F. C., & Mercadante, A. Z. (2016). Composition by LC-MS/MS of New Carotenoid Esters in Mango and Citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8207-8224.
- Pop, R. M., Weesepeol, Y., Socaciu, C., Pinte, A., Vincken, J. P., & Gruppen, H. (2014). Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chemistry*, 147, 1-9.
- Prado, D. E. (2000). Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinburgh Journal of Botany*, 57, 437-461.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
- Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016). Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1457, 116-124.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3022-3029.
- Santos, C. A. F., & Oliveira, V. R. (2008). Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 731-735.
- Subagio, A., Wakaki, H., & Morita, N. (1999). Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 1784-1786.
- Schweiggert, R. M., Vargas, E., Conrad, J., Hempel, J., Gras, C. C., Ziegler, J. U., Mayer, A., Jimenez, V., Esquivel, P. & Carle, R. (2016). Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry*, 200, 274-282.
- Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2005). Cryptoxanthin structural isomers in oranges, orange juice, and other fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6355-6361.
- Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Deliza, R., de Oliveira Godoy, R. L., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, 44, 2326-2331.
- Turini, E. (2017). Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). *Umbu (fruto)*. Disponível em: <

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_21_09_00_06_conjuntura_umbu_-_jan-2017.pdf > Acesso em 29 de novembro de 2017.

van Breemen, R. B., Canjura, F. L., & Schwartz, S. J. (1991). Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1452-1456.

CAPITULO IV
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-DAD-MS/MS DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM ESPÉCIES DE *SPONDIAS*

Gilsandro Alves da Costa^a & Adriana Zerlotti Mercadante^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brasil.

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Food Research International*

RESUMO

O objetivo do trabalho foi identificar e quantificar os compostos fenólicos em frutos do gênero *Spondias*. Os extratos hidrofílicos obtidos com metanol/água dos frutos liofilizados de cajá (*Spondias mombin* L.), seriguela (*Spondias purpurea* L.), umbu-cajá (*Spondias* spp.) e umbu (*Spondias tuberosa*) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS) e quantificados por DAD com curva de calibração analítica. De uma forma geral, as espécies de *Spondias* estudadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, com exceção da seriguela. Em coluna C18, foram separados 26 compostos, 19 compostos fenólicos foram identificados nos quatro frutos estudados do gênero *Spondias*. As maiores quantidades de compostos fenólicos totais foram encontrados em cajá e seriguela, $405,51 \pm 10,26 \mu\text{g.g}^{-1}$ base seca (b.s.) e $202,64 \pm 3,79 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s., respectivamente. A rutina foi o composto fenólico majoritário em cajá, umbu-cajá e umbu, enquanto o galoil-HHDP-hexosídeo foi o majoritário em seriguela. O maior número de ácidos fenólicos foi identificado em cajá, já o maior número de flavonóis derivados de quercetina foi identificado em seriguela. Os frutos de cajá, umbu, umbu-cajá e seriguela apresentaram os seguintes teores de rutina, respectivamente, $193,33 \pm 7,40 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s., $137,24 \pm 5,67 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s., $90,46 \pm 0,53 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s. e $30,74 \pm 1,77 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s.. Em seriguela foram tentativamente identificados dois compostos como galoil-HHDP-hexosídeo, apresentando $78,93 \pm 3,18 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s. e $43,37 \pm 1,81 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.s.. De forma geral, foram encontrados onze ácidos fenólicos e seus derivados em cajá, dois em umbu, quatro em umbu-cajá e cinco em seriguela. Já os flavonóis identificados foram um em cajá, um em umbu, um em umbu-cajá e dois em seriguela.

Palavras-chave: frutos tropicais, LC-MS/MS, flavonoides, ácidos fenólicos, Anacardeaceae

INTRODUÇÃO

Os frutos do gênero *Spondias* podem ser encontrados em algumas regiões no mundo. Algumas espécies de *Spondias* são descritas na literatura como sendo nativas dos continentes Asiático e Africano, e existem também algumas espécies que são originárias da região Neotropical do mundo que compreende a América do Norte e América do Sul (Ayoka et al., 2006; Mitchell & Daly, 2015; Ishak et al., 2005; Miller & Schaal, 2005). Em especial, o Brasil apresenta espécies nativas de *Spondias*, como também, espécies que foram domesticadas às condições edafo-climáticas existentes nas regiões Norte e Nordeste. A maioria das espécies é comercializada na forma *in natura* e pequena parte é destinada ao processamento agroindustrial. Os frutos possuem características sensoriais apreciáveis, o que desperta nas indústrias o interesse para a produção de sucos, polpas, sorvetes, geleias, picolés, vinhos, doces entre outros (Adedeji et al., 1991; Ceva-Antunes et al., 2006; Dias et al., 2003; Duarte et al., 2010; Folegatti et al., 2003; Franco & Shibamoto, 2000).

Os frutos do gênero *Spondias* são sazonais e podem ser encontrados em mercados públicos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil entre os meses de janeiro a maio. Porém, esses frutos são resultantes de plantios desordenados e não comerciais, as árvores são frondosas e altas gerando sombra, o que as torna agradáveis e desejáveis pela população, são plantas produtivas, sendo importante fonte econômica para a renda de inúmeras famílias dessas regiões (Lins Neto et al., 2012; Melo & Andrade, 2010; Cavalcanti et al., 1996).

A *Spondias mombin* L. (cajá) é a mais popular entre os frutos do gênero *Spondias*, e disponível na forma de polpa congelada em todo o Brasil durante todo o ano. Por outro lado, a *Spondias tuberosa* (umbu), *Spondias purpurea* L. (seriguela) e *Spondias* spp. (umbu-cajá) são pouco destinadas à produção de polpa, e a maior expressão se dá no consumo na forma *in natura*. O umbu destaca-se na região do semiárido da Bahia com elevada produção e consumo (Cavalcanti et al., 1999), o umbu-cajá é sua maioria encontrado nos estados de Pernambuco e Bahia de onde segue para abastecer todos os mercados (Lira Junior et al., 2008; Gondim et al., 2013), já a seriguela é predominante cultivado na região Sul do estado do Ceará (da Silva Freire et al., 2011).

Algumas espécies dentro do gênero despertaram o interesse da comunidade científica. O destaque para o uso dessas espécies em estudos diz respeito aos

compostos bioativos existentes em suas composições, sendo que algumas espécies apresentam substâncias com potencial farmacológico (Silva et al., 2014). O extrato metanólico das folhas da cajazeira (*Spondias mombin*) apresenta taninos, saponinas e antraquinonas, substâncias às quais são atribuídas atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella dysenteriae*. Já os extratos metanólicos da casca do caule inibiram o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Abo et al., 1999). A presença de ácido elágico, quercetina e rutina em extratos de folhas de umbuzeiro obtidos com de metanol/água (80:20) apresentou atividade antiviral quando usada contra o vírus da dengue tipo 2 (Silva et al., 2011). As folhas da umbu-cajazeira são empregadas no tratamento de processos inflamatórios e infecciosos, onde extratos metanólico e aquoso apresentaram atividade antimicrobiana e letalidade frente à *Artemia salina* (da Silva et al., 2012).

A literatura mostra que o consumo de uma dieta rica em frutas e vegetais está associado à redução dos riscos no aparecimento de doenças causadas pelo estresse oxidativo como o câncer, as doenças cardiovasculares e doenças degenerativas (Pham-Huy et al., 2008; Liu, 2003; Ness & Powles, 1997; Halliwell, 1994). Isso se deve principalmente às substâncias antioxidantes existentes nas frutas e vegetais (Seeram et al., 2006).

Atualmente mais de 8000 compostos fenólicos já são conhecidos e o conhecimento das estruturas desses compostos pode ser realizado através do uso de HPLC-DAD-MS/MS (Chisté & Mercadante, 2012; Fischer et al., 2011). No entanto, devido à complexidade das matrizes e ao grande número de compostos existentes, a identificação e quantificação por este sistema não é tão simples (Mariutti et al., 2014; Sentandreu et al., 2015), deixando ainda um grande número de compostos fenólicos sem identificação em alimentos.

Os trabalhos publicados envolvendo essas espécies de *Spondias* estão relacionados com a capacidade antioxidante atribuída a substâncias como carotenoides e compostos fenólicos presentes nas frutas do gênero (de Sousa Araújo et al., 2012; Engels et al., 2012; Neiens et al., 2017; Ribeiro et al., 2017; Oladimeji et al., 2016). Os carotenoides livres e ésteres de carotenoides existentes em cajá já foram identificados e relatados (da Costa & Mercadante, 2017; Giuffrida et al., 2015). Por outro lado, a identificação dos compostos fenólicos em frutos de *Spondias* tem sido pouco relatada na literatura. A maioria dos trabalhos publicados apresenta a capacidade antioxidante e total de compostos fenólicos (Dultra et al., 2017; Moreira

et al., 2012; Silva et al., 2012; de Sousa Araújo et al., 2012; Tiburski et al., 2011). No caso da casca de seriguela, foram identificados ácidos fenólicos e flavonoides, ácido 3-cafeoilquínico, quercetina 3-O-pentosilhexosídeo, quercetina 3-O-pentosilglicopiranosídeo e ramentin hexosilpentosídeo (Engels et al., 2012). Outros compostos fenólicos, como os ácidos: clorogênico, p-cumárico e ferúlico foram identificados em polpa de umbu, porém, a identidade foi confirmada somente pela comparação dos espectros e tempo de retenção com padrões (de Barros Gomes et al., 2013).

Conhecer a composição de compostos fenólicos em espécies de *Spondias* disponibilizará não só conhecimento científico sobre essas espécies, mas também chamarão a atenção para a riqueza da biodiversidade existente na região tropical do Brasil. Assim esse trabalho tem como objetivo identificar e quantificar compostos fenólicos em cajá, umbu, umbu-cajá e seriguela, através do uso do sistema HPLC-DAD-MSⁿ.

MATERIAL E MÉTODOS

PADRÕES E REAGENTES

Os padrões de ácido cafeico, ácido gálico, ácido quínico, ácido elágico, ácido hidroxibenzoico, ácido 4-cumárico, ácido ferúlico, catequina, epicatequina, miricetina, kaempferol e quercetina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões apresentaram cerca de 93% de pureza, determinada por HPLC-DAD. O metanol e a acetonitrila de grau HPLC foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água ultrapura foi obtida por meio do sistema Milli-Q (Billerica, MA, EUA). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Dinâmica (São Paulo, Brasil). As amostras e os solventes foram filtradas em membrana Millipore de 0,22 µm e 0,45 µm, respectivamente.

AMOSTRAS DE FRUTOS

O umbu (*Spondias tuberosa*), umbu-cajá (*Spondias* spp.), cajá (*Spondias mombin* L.) e seriguela (*Spondias purpurea* L.) foram adquiridos em mercado público localizado na cidade de João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil em janeiro de 2016.

Estas amostras são as mesmas descritas no capítulo III. Foram adquiridos 5 kg de frutos maduros de cada *Spondias*, os frutos foram transportados para o Laboratório de Química de Alimentos da UNICAMP em caixas térmicas. As sementes dos frutos foram removidas imediatamente após a chegada no laboratório e a polpa foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C . A polpa foi liofilizada a -60°C abaixo de 40 μHg (Liobras, São Paulo, Brasil) até peso constante.

A polpa liofilizada foi triturada, homogeneizada e embalada em sacos de polietileno a vácuo e estocada no escuro em freezer a -80°C . A caracterização físico-química das frutas está apresentada no capítulo III.

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada em tubo de teflon utilizando 0,15 g de amostra liofilizada (cajá, seriguela, umbu e umbu-cajá) em 15 mL de solução metanol/água (8:2, v/v), através da agitação em *vortex* (Phoenix Luferco, AP56, São Paulo, Brasil) por 5 min à temperatura ambiente ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Em seguida, foi realizada a centrifugação (Beckman Coulter, Allegra 64R, Palo Alto, CA, EUA) a 22000 *g* por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e uma nova alíquota de solvente foi adicionada ao tubo, o processo foi repetido por 5 vezes até extração exaustiva. A confirmação da exaustão da extração foi realizada qualitativamente utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. (Singleton & Rossi, 1965). Ao final, os sobrenadantes das extrações foram combinados, formando um único extrato, o qual foi aferido em balão volumétrico com o mesmo solvente de extração para um volume final de 25 mL.

ANÁLISE POR HPLC-DAD-MS^N

Os compostos fenólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A5), válvula de injeção Rheodyne com loop de 20 μL e detectores de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e espectrômetro de massas (MS) (AmaZon speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador de massa/carga (*m/z*) *ion trap*. A separação dos compostos foi realizada em coluna C18 Synergi

Hydro RP80A (4 μ m, 250 x 4,6 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) mantida a 29 °C, utilizando como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,5 % de ácido fórmico (v/v), em um gradiente linear (v/v) de A:B 99:1 para 50:50 em 50 min, depois para 1:99 em 5 min, mantendo esta proporção por 5 min, voltando para 99:1 em 5 min e mantendo esta proporção por 10 min para re-equilíbrio da coluna, a uma vazão de 0,9 mL/min (Chisté & Mercadante, 2012).

Para análise no MS, o fluxo proveniente do DAD foi dividido, permitindo a entrada de somente 0,15 mL/min na fonte ESI. O MS foi configurado com os seguintes parâmetros: modo de ionização positivo e negativo; voltagem no capilar: 2000 V; voltagem na saída do capilar: -110 V; skimmer 1: 10 V, skimmer 2: 5 V; end plate offset: -500 V; temperatura do gás de secagem (N₂): 310 °C; vazão: 5 L/min; nebulizador: 30 psi. A energia de fragmentação para obtenção do MS/MS foi de 1,4 V, e energia de fragmentação para obtenção do MS³ foi de 1,8 V (Chisté & Mercadante, 2012).

Os espectros UV-visível foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados em 280 e 360 nm. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 1000. Os compostos fenólicos foram identificados a partir dos seguintes parâmetros: ordem de eluição e tempo de retenção em coluna C₁₈, características dos espectros UV-visível e de massas comparados a padrões nas mesmas condições e a informações na literatura (Bystrom et al., 2008; Chisté & Mercadante, 2012; Clifford et al., 2003; Engels et al., 2012; Fischer et al., 2011; Mariutti et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Sentandreu et al., 2015; Silva et al., 2014; Cuyckens & Claeys (2004); Singh et al., 2009; Tao et al., 2014; Weisz et al., 2009). A quantificação dos compostos foi realizada a partir de curva analítica externa de seis pontos (em triplicata) para ácido gálico (1,0 – 20,0 μ g/mL), rutina (1,0 – 20,0 μ g/mL) e quercetina (1,0 – 20,0 μ g/mL). Para todos os compostos, $r^2 \geq 0,997$, com limite de detecção de 1,4, 0,6 e 0,8 μ g/mL, e limite de quantificação de 4,2, 1,8 e 2,3 μ g/mL, de ácido gálico, rutina e quercetina, respectivamente (Mariutti et al., 2014). Estes limites foram calculados usando-se parâmetros das curvas analíticas segundo o ICH (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos nas espécies de *Spondias* foram determinados pelo uso do sistema HPLC-DAD-MSⁿ. Considerando todas as amostras estudadas, dos 26 picos separados em coluna C₁₈, 17 foram classificados como ácidos fenólicos e 2 como flavonoides da classe flavonóis, 7 compostos não foram identificados.

As Figuras 1A, 1B, 1C e 1D apresentam os cromatogramas dos compostos fenólicos de *Spondias mombin* L. (cajá) (A), *Spondias tuberosa* (umbu) (B), *Spondias* spp. (umbu-cajá) (C) e *Spondias purpurea* L. (seriguela) (D), processados em comprimentos de onda de 280 nm e 360 nm. A Tabela 1 apresenta os picos e identificação tentativa de acordo com a ordem de eluição, comprimento de absorção máxima (λ_{max}), espectro de massas e os fragmentos de massas MS³. Foram separados 16 compostos em cajá, sendo 12 identificados como compostos fenólicos e 4 quatro compostos não identificados, dos identificados 11 correspondem ao grupo dos ácidos fenólicos e 1 ao grupo dos flavonóis. Em umbu-cajá foram separados 9 picos, sendo 4 não identificados, 4 pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos e 1 flavonol; em umbu foram separados apenas 4 picos, sendo 2 ácidos fenólicos, 1 flavonol e 1 não identificado, e em seriguela foram separados 10 picos, sendo 5 ácidos fenólicos, 2 flavonóis e 3 picos não identificados.

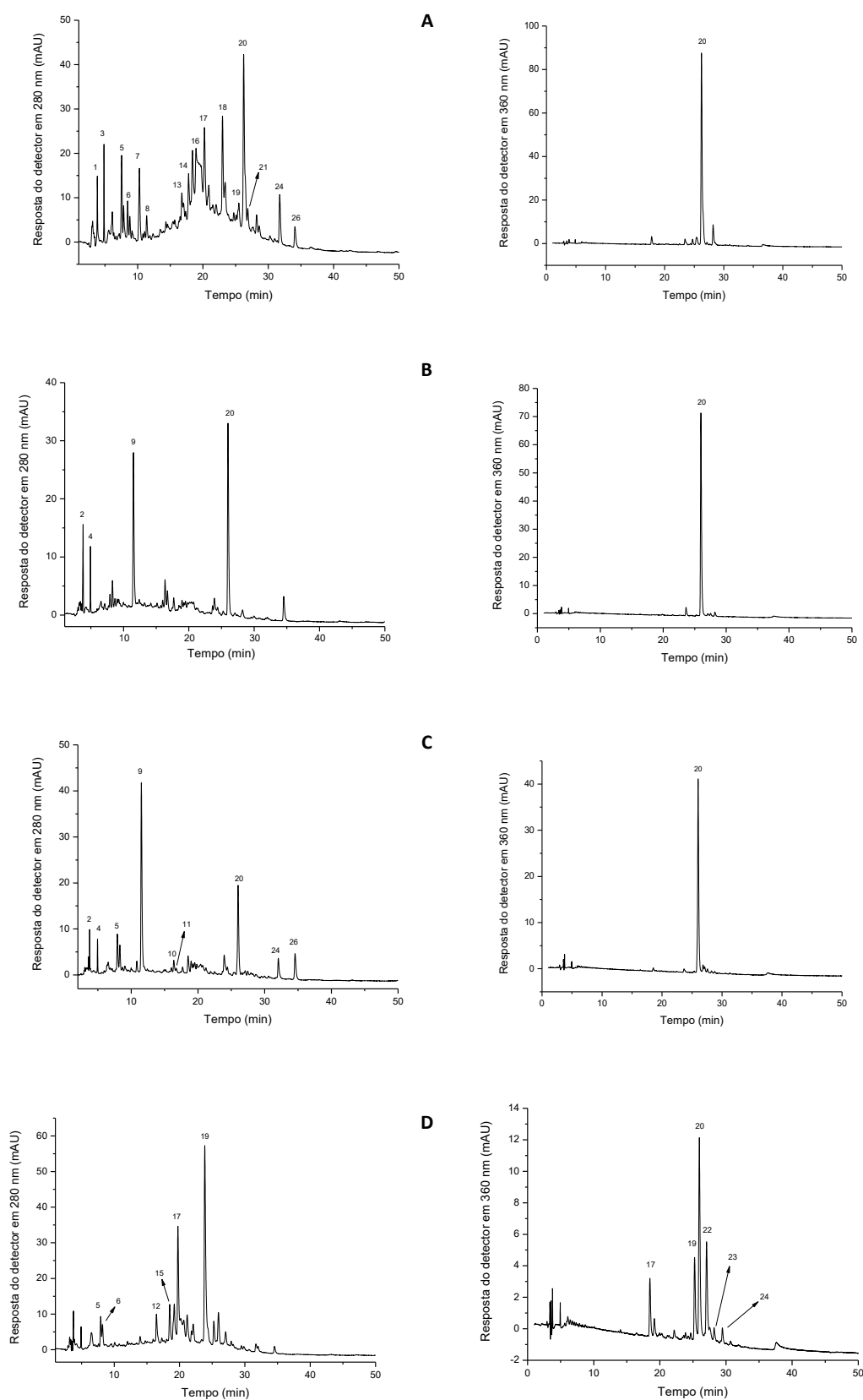


Figura 1. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD de compostos fenólicos em *Spondias mombin* L. (A), *Spondias tuberosa* (B), *Spondias* spp. (C) e *Spondias purpurea* (D), processados em 280 nm e 320 nm. Condições cromatográficas: ver texto. Caracterização dos picos é dada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características cromatográficas e espectroscópicas de espécies de *Spondias*.

Pico ^a	Compostos fenólicos	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos de íons (-) (m/z)
1	não identificado 1	3,8	245	188	MS ² [188]: 127
2	ácido cafeico- <i>O</i> -hexosideo	3,8	260	341	MS ² [341]: 179 MS ³ [179]: 161,143
3	derivado do ácido p-cumaroilquínico 1	4,8	nd ^d	397	MS ² [397]: 337,263,221,163
4	derivado do ácido quínico	4,9	337	379	MS ² [379]: 189 MS ³ [189]: 127
5	não identificado 2	6,9 – 7,5	278,353	353	nd ^d
6	monogaloil hexosideo	7,8 – 8,0	274	331	MS ² [331]: 271,211,193,169,125
7	derivado do ácido p-cumaroilquínico 2	10,3	nd ^d	397	MS ² [397]: 337,221, 163
8	derivado do ácido gálico	11,4	276	411	MS ² [411]: 331,241, 169 ,125
9	não identificado 3	11,5 – 13,9	282	341	MS ² [341]: 281, 179
10	ácido p-cumárico hexosideo	16,1	nd ^d	325	MS ² [325]: 265,187, 163 ,145,119
11	ácido 5 ou 3- <i>O</i> -cafeoilquinico	16,3	nd ^d	353	MS ² [353]: 191
12	derivado do monogaloil hexosideo	16,4	277	483	MS ² [483]: 423,405,331,271,193
13	derivado do ácido clorogênico	17,7	325	353	MS ² [353]: 191
14	derivado do ácido (4 ou 5) 3- <i>O</i> -p-cumaroilquinico	18,4	239,281	397	MS ² [397]: 337,163
15	digaloil hexosideo	18,5	nd ^d	483	MS ² [483]: 331 ,271,193,169
16	não identificado 4	19,0	271	353	MS ² [353]: 191 ,179,127
17	galoil-HHDP-hexosideo 1	19,7 -20,2	275	633	MS ² [633]: 463, 301 ,275 MS ³ [301]: 285,257
18	ácido (4 ou 5) 3- <i>O</i> -p-cumaroilquinico	23,0 – 23,4	239,275	337	MS ² [337]: 163
19	galoil-HHDP-hexosideo 2	23,8	275	633	MS ² [633]: 463, 301 ,275 MS ³ [301]: 285,257
20	rutina	24,5 –26,0	264,360	609	MS ² [609]: 343, 301 ,271,179 MS ³ [301]: 179,151
21	ácido elágico pentosideo	25,5	nd ^d	433	MS ² [433]: 301
22	não identificado 5	26,0 -26,2	359	433	MS ² [433]: 387,301
23	quercetina hexosideo	27,1 - 28,2	248,356	463	MS ² [463]: 417,361, 301 ,179 MS ³ [301]: 179,151
24	não identificado 6	31,7 – 32,0	313	433	MS ² [433]: 301

					MS ³ [301]: 179,151
25	não identificado 7	31,7	312	677	MS ² [677]: 659,645,617,585
26	derivado do ácido p-cumárico	34,1-34,5	nd ^d	337	MS ² [337]: 163

^a Numerado de acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras 1A, Fig. 1B, Fig. 1C e Fig. 1D.

^b Tempo de retenção em Coluna C₁₈ Synergi Hydro (4 µm).

^c Solvente: gradiente de 0,5% de ácido fórmico em água e acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico.

^d não detectado.

O umbu foi a espécie de *Spondia* analisada que apresentou o menor número de picos eluídos nas condições cromatográficas utilizadas por Chisté & Mercadante (2012), e não foram encontrados outros compostos fenólicos quando o cromatograma foi processado a 320 nm.

O pico 2 foi identificado como ácido cafeico-*O*-hexosídeo, apresentado comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 260 nm e $[M-H]^-$ a m/z 341 e fragmento MS^2 a m/z 179, indicando que a aglicona é ácido cafeico (massa molecular de 180 Da) com perda de 162 correspondente a uma hexose; e 161 correspondente à perda de água do fragmento MS^2 a m/z 179. Estas fragmentações estão de acordo com o descrito na literatura para composto fenólico encontrado em casca e polpa de romã (Fischer et al., 2011). O pico 2 foi encontrado em umbu e umbu-cajá.

Os picos 3 e 7 foram identificados como derivados do ácido p-cumaroilquínico. O composto 3 não apresentou UV-Vis bem definido que permitisse ser usado na identificação, já o 7 apresentou comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 268 nm. O pico 3 apresentou massa molecular no espectro de massas em modo negativo $[M-H]^-$ a m/z 397 e fragmentos de íons (m/z) em MS^2 de 337, 263, 221 e 163. Sabe-se que o ácido cumaroil quínico apresenta $[M-H]^-$ a m/z 337 e MS^2 (m/z) 163 (Chisté & Mercadante, 2012), e que o ácido p-cumárico apresenta a $[M-H]^-$ a m/z 163 (Fischer et al., 2011; Moco et al., 2006). O pico 7 apresentou praticamente as mesmas massas, $[M-H]^-$ a m/z 397 e fragmentos de íons (MS^2) a m/z 337, 221 e 163; o pico foi tentativamente identificado de acordo com a literatura (Chisté & Mercadante, 2012). Os picos 3 e 7 foram encontrados apenas em amostras de cajá.

O pico 4 foi tentativamente identificado como sendo um derivado do ácido quínico, com base no comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 337 nm e no espectro de massas apresentando no modo negativo $[M-H]^-$ (m/z) de 379, no fragmento de íons (m/z) em MS^2 de 189 e em fragmento de íon em MS^3 (m/z) de 127. Em trabalho com extratos etanólico e aquoso de amora, foi encontradois o mesmo fragmento em MS^2 a m/z 127, correspondente ao ácido quínico (Gouveia-Figueira & Castilho, 2015). O pico 4 foi encontrado em amostras de umbu e umbu-cajá.

O pico 6 foi tentativamente identificado como sendo monogaloil hexosídeo, com base no $\lambda_{\max}$ de 274 nm e no espectro de massas apresentando no modo negativo $[M-H]^-$ de 331 u e fragmentos de íons (m/z) no MS^2 de 271, 211, 193, 169, 125. O fragmento 169 u corresponde à perda da molécula de hexose (180-18=162), e corresponde a $[M-H]^-$ do ácido gálico (massa molecular de 170 Da). O MS^3 obtido

não forneceu a quebra da massa 169, no entanto, a massa 125 que corresponde a quebra do 169 apareceu no MS². As características deste pico foram similares às da literatura (Chisté & Mercadante, 2012). O pico 6 foi encontrado em cajá e seriguela.

O pico 8 foi tentativamente identificado como um derivado do ácido gálico, devido ao $\lambda_{\max}$ de 276 nm e [M-H]⁻ de 411 u e fragmentos de íons (m/z) em MS² de 331, 241, 169 e 125. O fragmento de íon (m/z) em MS² de 169 corresponde ao ácido gálico (massa molecular 170 Da) que aparece em MS² como sendo fragmento da massa 411, ainda em MS² o fragmento a m/z 125 corresponde à perda de 44 u (CO₂) do fragmento 169. A massa 169 foi submetida à quebra em MS³, no entanto, não se obteve resultado. A confirmação foi feita com a comparação em literatura (Chisté & Mercadante, 2012). Este composto foi somente encontrado em cajá.

O pico 10 foi tentativamente identificado como ácido p-cumárico hexosídeo, apesar de não ter apresentado comprimento de onda característico nítido que permitisse ser utilizado na sua identificação. O espectro de massas mostrou a [M-H]⁻ a m/z de 325 e fragmentos de íons MS² a m/z 265, 187, 163, 145 e 119. O fragmento de íon 163 é correspondente ao ácido p-cumárico (massa molar 164 Da) e o fragmento 119 u indica a quebra do fragmento 163 u. Este pico apresentou características similares às da literatura (Bystrom et al., 2008). O pico 10 foi identificado apenas umbu-cajá.

O pico 11 foi tentativamente identificado como ácido 5 ou 3-O-cafeoilquínico. A identificação das ligações no carbono na posição 5 ou 3 da estrutura da molécula torna-se complicada por tratar-se apenas de arranjo dimensional da estrutura que possui mesma fórmula molecular C₁₆H₁₈O₉. O pico 11 não apresentou comprimento de onda nítido que permitisse a comparação para ajudar na identificação, mas apresentou espectro de massas em modo negativo [M-H]⁻ (m/z) de 353 e fragmento de íons (m/z) em MS² de 191. O fragmento (m/z) em MS² de 191 corresponde ao ácido quínico (massa molecular 192 Da). Foram feitas inúmeras tentativas, mas não ocorreu a quebra da massa 191 para confirmação no MS³. No entanto, tempo de retenção e espectro de massas estão de acordo com a literatura (Rodrigues et al., 2015; Engels et al., 2012). O pico 11 foi identificado apenas em amostras de umbu-cajá.

O pico 12 apresentou comprimento de onda com $\lambda_{\max}$ de 277 nm, [M-H]⁻ (m/z) de 483 e fragmentos de íons (m/z) MS² de 423, 405, 331, 271 e 193. Este pico foi tentativamente identificado como um derivado do monogaloil hexosídeo,

considerando o fato do composto fenólico apresentar características semelhantes às descritas na literatura para o monogaloil hexosídeo (Sentandreu et al., 2015). O pico 12 foi encontrado em amostras de umbu-cajá e seriguela.

O pico 13 foi tentativamente identificado como sendo um derivado do ácido clorogênico. O pico 13 apresentou comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 325 nm, $[M-H]^-$ (m/z) de 353 e fragmento de íons (MS^2) a m/z 191. O fragmento (m/z) em MS^2 de 191 corresponde ao ácido quínico (massa molecular 192 Da) que faz parte da estrutura do ácido clorogênico. A identidade do pico 13 seguiu os parâmetros descritos anteriormente na literatura (Tao et al., 2014). A presença do pico 13 foi confirmada apenas em amostras de cajá.

O pico 14 foi tentativamente identificado como sendo um derivado do ácido 3-O-p-cumaroilquinico (podendo também ser derivado do ácido 4 ou 5-O-p-cumaroilquinico). Este pico apresentou $\lambda_{\max}$ 239, 281 e $[M-H]^-$ com m/z 397 e fragmentos de íons MS^2 a m/z 337 e 163. O fragmento de íon 337 corresponde à massa molecular dos ácidos 3, 4 ou 5-p-cumaroilquinico, confirmado pelo fragmento MS^2 a m/z 163, conforme descrito anteriormente (Rodrigues et al., 2015). O pico 14 foi encontrado apenas em cajá.

Apesar de não apresentar $\lambda_{\max}$ nítido que permitisse ser comparado com a literatura, o pico 15 foi tentativamente identificado como digaloil hexosídeo. O pico 15 apresentou $[M-H]^-$ (m/z) 483 no MS e fragmentos de íons (m/z) de 331, 271, 193 e 169 em MS^2 . O fragmento de íon 331 (m/z) indica a perda do grupo galoil (massa molecular 152 u) da molécula, e o fragmento de íon a m/z 169 indica a perda do grupo galoil e da hexose (massa molecular 162 u) da molécula, conforme descrito por Chisté & Mercadante (2012). Os fragmentos de íons de 271 u e 169 u que aparecem no MS^2 indicam a fragmentação da massa 331 u ainda na fonte de ionização, pois os mesmos são fragmentos esperados pela quebra do 331 u em MS^3 . O pico 15 foi identificado apenas em amostras de seriguela.

Os picos 17 e 19 foram tentativamente identificados como galoil HHDP hexosídeo 1 e galoil HHDP hexosídeo 2, ambos possuem o hexahidroxidifenol hexosídeo (HHDP) ligado ao galoil. Os picos 17 e 19 apresentaram $\lambda_{\max}$ de 275 nm, $[M-H]^-$ (m/z) 633 no MS e fragmentos de íons (m/z) de 463, 301 e 275 em MS^2 e a m/z 285 e 257 em MS^3 . O fragmento de íon 301 u sugere a perda de uma unidade de hexose, o fragmento de íon (m/z) 257 sugere a perda de 44 u (CO_2). Os picos 17 e 19 apresentam características similares às descritas na literatura (Chisté &

Mercadante, 2012) e foram encontrados em cajá e em seriguela. O pico 19 galioil HHDP hexosídeo 2 foi o composto fenólico majoritário em frutas de seriguela.

O pico 18 foi identificado como ácido (4 ou 5) 3-O-p-cumaroilquinico, apresentando $\lambda_{\max}$ de 239 e 275 nm, $[M-H]^-$ (m/z) 337 e fragmentos de íons MS^2 em m/z a 163, conforme as observações feitas para o pico 14 e foi comparado com o descrito em literatura (Rodrigues et al., 2015). O pico 18 foi encontrado apenas em amostras de cajá.

O pico 20 foi identificado como rutina, correspondendo estruturalmente à quercetina 3-O-rutinosídeo. As características do pico 20 foram $\lambda_{\max}$ de 264 e 360 nm, $[M-H]^-$ a m/z 609, apresentando fragmentos de íons (m/z) de 343, 301, 271 e 179 em MS^2 e fragmentos de íons da massa 301 (m/z) 179 e 151 em MS^3 . A identificação deste pico foi confirmada conforme características descritas em literatura e comparação com padrão (Mariutti et al., 2014; Engels et al., 2012). O pico é destacado como majoritário em cajá, umbu e umbu-cajá.

O pico 21 foi tentativamente identificado como ácido elágico pentosídeo, não apresentou comprimento de onda que permitisse a sua identificação, apresentou $[M-H]^-$ (m/z) 433 MS e fragmento de íon a m/z 301 em MS^2 . O fragmento de íon (m/z) de 301 corresponde à perda de uma pentose (massa molecular 132+18 Da). A confirmação se deu com comparação com valores da literatura (Chisté & Mercadante, 2012). O pico 21 foi identificado apenas em amostras de cajá.

O pico 23 foi tentativamente identificado como quercetina hexosídeo, com $\lambda_{\max}$ de 248 e 356 nm, $[M-H]^-$ (m/z) de 463 e fragmentos de íons (m/z) 417, 361, 301, 179 em MS^2 e fragmentos de íons (m/z) 179 e 151 em MS^3 . O fragmento 301 sugere a perda da hexose. O pico 23 apenas foi encontrado em seriguela e teve suas características similares às relatadas em literatura (Engels et al., 2012).

O pico 26 foi tentativamente identificado como um derivado do ácido p-cumárico, com $\lambda_{\max}$ de 237 e 264 nm, com $[M-H]^-$ (m/z) 337 no MS e fragmentos de íons (m/z) de 163 em MS^2 . O fragmento 163 u corresponde ao ácido p-cumárico, como já descrito anteriormente para o pico 3. O pico 26 foi encontrado em amostras de cajá.

O pico 1 não foi identificado, no entanto, acredita-se tratar de um ácido fenólico. O pico 1 apresentou comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 245 nm e $[M-H]^-$ (m/z) de 188 e fragmento de íons (m/z) em MS^2 de 127. O pico 1 apenas foi encontrado em amostras de cajá.

O pico 5 não foi identificado porque apesar de ter apresentado um íon no MS a m/z 353, o mesmo não foi fragmentado no MS². No entanto, a possível massa e a ordem de eluição sugerem que pode corresponder ao ácido clorogênico (Weisz et al., 2009). O pico 5 foi encontrado em cajá, umbu-cajá e seriguela.

O pico 9 não foi identificado (denominado não identificado 3 na Tabela 1), apresentou comprimento de onda $\lambda_{\max}$ de 282 nm, $[M-H]^-$ (m/z) de 341 e fragmentos de íons (m/z) em MS² de 281 e 179. Não houve a quebra do fragmento de massa 179 quando submetido ao MS³. No entanto, o espectro de massas junto com informações na literatura nos deixa propício a acreditar que seja um derivado do ácido cafeico (massa molecular de 180 Da) (Rodrigues et al., 2015). O pico 9 foi encontrado em amostras de umbu e umbu-cajá.

O pico 16 não foi identificado (denominado não identificado 4 na Tabela 1) e apresentou $\lambda_{\max}$ de 271 nm, $[M-H]^-$ (m/z) 353 em MS e fragmentos de íons (m/z) de 191, 179 e 127 em MS². O pico apresenta o fragmento de íon (m/z) de 191 que corresponde ao ácido quínico (massa molecular 192 Da) e o fragmento de íon (m/z) de 179 corresponde ao ácido cafeico (massa molecular 180 Da). Apesar dos valores das massas indicarem tratar-se do ácido 5 (ou 3)-cafeoilquínico, o UV-Vis não permitiu a identificação conforme descrito por Rodrigues et al. (2015). O pico foi encontrado apenas em amostras de cajá.

O pico 22 não foi identificado (denominado não identificado 5 na Tabela 1), o espectro de massas apresenta $[M-H]^-$ (m/z) a 433 e fragmentos de íons (m/z) em MS² a 387 e 301. O fragmento de íon 301 u pode corresponder à perda de uma pentose. Mariutti et al. (2014) descrevem o composto fenólico quercetina pentosídeo apresentando fragmentos no MS a m/z 433 e 301, 179 no MS², e 179 e 151 no MS³ e ainda descreve 269, 287 e 354 nm como os comprimentos de onda característicos desse composto. No entanto, não obtivemos em nossa pesquisa todas as informações que nos permitisse a identificação da estrutura. O pico 22 foi encontrado apenas em amostras de seriguela.

O pico 24 não foi identificado (denominado não identificado 6), apresentou comprimento de onda de 313 nm, $[M-H]^-$ (m/z) de 433 e fragmento de íon (m/z) 301 em MS² e fragmentos de íons (m/z) 179,151 em MS³. O fragmento de íon (m/z) 301 sugere a perda da pentose. O pico 24 foi encontrado em amostras de cajá, umbu-cajá e seriguela.

O pico 25 foi denominado não identificado 7, apresentou $\lambda_{\max}$ de 312 nm, $[M-H]^-$ (m/z) 677 em MS e fragmentos de íons (m/z) de 659, 645, 617 e 585 em MS². É interessante salientar que o $\lambda_{\max}$ e espectro de massas e tempo de retenção do pico 25 foram idênticos ao descrito em literatura como não identificado em extratos de frutas de murici (Mariutti et al., 2014). O pico 25 foi somente encontrado em amostras de umbu-cajá.

QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A Tabela 2 apresenta os valores dos conteúdos dos compostos fenólicos separados em cada espécie estudada de *Spondias*.

A rutina (pico 20) foi o composto fenólico majoritário em cajá, umbu e umbu-cajá, representando 48, 76 e 50% do total de compostos fenólicos, respectivamente. A rutina (pico 20) foi o único composto fenólico encontrado em todas as quatro espécies de *Spondias* estudadas no presente trabalho. O galoil-HHDP-hexosídeo 2 (pico 19) foi o majoritário em seriguela, representando 39% do conteúdo de compostos fenólicos totais. O galoil-HHDP-hexosídeo 2 (pico 19) também foi encontrado em cajá, porém representando apenas 2% do conteúdo total de compostos fenólicos nesta fruta. As diferenças existentes relacionadas à presença e quantidades de compostos fenólicos na espécie *Spondias purpurea* L. (seriguela) quando comparada com às *Spondias mombin* L. (cajá), *Spondias tuberosa* (umbu) e *Spondias* spp. (umbu-cajá) estão associadas provavelmente às diferenças genéticas existentes entre elas, já discutidas em trabalhos anteriores (Santos & Oliveira, 2008). O galoil-HHDP-hexosídeo 1 (pico 17) representou 21% do conteúdo total de compostos fenólicos em seriguela sendo o segundo maior pico presente na espécie. Este composto também foi encontrado em quantidade significativa em cajá, sendo $21,59 \pm 1,07 \mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco, no entanto, representou apenas 5% do conteúdo total de compostos fenólicos nesta espécie.

Tabela 2. Quantidade de compostos fenólicos em espécies de frutas do gênero *Spondias*.

Pico ^a	Compostos fenólicos	Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$ b.s.*)			
		cajá	umbu	umbu-cajá	seriguela
1	não identificado 1 ¹	11,79 $\pm$ 0,45	ND	ND	ND
2	ácido cafeico-O-hexosideo ¹	ND ^b	9,09 $\pm$ 0,41	3,99 $\pm$ 0,14	ND
3	derivado do ácido p-cumaroilquínico 1 ¹	9,84 $\pm$ 0,24	ND	ND	ND
4	derivado do ácido quínico ¹	ND	5,41 $\pm$ 0,15	4,09 $\pm$ 0,17	ND
5	não identificado 2 ¹	20,72 $\pm$ 3,68	ND	9,61 $\pm$ 0,15	9,98 $\pm$ 0,80
6	monogaloil hexosideo ¹	8,34 $\pm$ 0,29	ND	ND	7,15 $\pm$ 0,29
7	derivado do ácido p-cumaroilquínico 2 ¹	19,91 $\pm$ 0,90	ND	ND	ND
8	derivado do ácido gálico ¹	6,52 $\pm$ 0,59	ND	ND	ND
9	não identificado 3 ¹	ND	28,01 $\pm$ 0,52	45,48 $\pm$ 0,27	ND
10	ácido p-cumárico hexosideo ¹	ND	ND	4,21 $\pm$ 0,08	ND
11	ácido 5 ou 3-O-cafeoilquinico ¹	ND	ND	2,17 $\pm$ 0,03	ND
12	derivado do monogaloil hexosideo ¹	ND	ND	ND	11,07 $\pm$ 1,14
13	derivado do ácido clorogênico ¹	12,19 $\pm$ 1,25	ND	ND	ND
14	derivado do ácido (4 ou 5) 3-O-p-cumaroilquinico ¹	11,60 $\pm$ 0,83	ND	ND	ND
15	digaloil hexosideo ¹	ND	ND	ND	13,87 $\pm$ 1,33
16	não identificado 4 ¹	14,47 $\pm$ 2,83	ND	ND	ND
17	galoil-HHDP-hexosideo 1 ¹	21,59 $\pm$ 1,07	ND	ND	43,37 $\pm$ 1,81
18	ácido (4 ou 5) 3-O-p-cumaroilquinico ¹	27,83 $\pm$ 2,80	ND	ND	ND
19	galoil-HHDP-hexosideo 2 ¹	7,49 $\pm$ 1,37	ND	ND	78,93 $\pm$ 3,18
20	Rutina ²	193,33 $\pm$ 7,40	137,24 $\pm$ 5,67	90,46 $\pm$ 0,53	30,74 $\pm$ 1,77
21	ácido elágico pentosideo ¹	6,50 $\pm$ 0,65	ND	ND	ND
22	não identificado 5 ¹	ND	ND	ND	15,01 $\pm$ 1,84
23	quercetina hexosideo ³	ND	ND	ND	2,94 $\pm$ 0,20
24	não identificado 6 ¹	25,64 $\pm$ 1,52	ND	10,55 $\pm$ 0,15	3,43 $\pm$ 0,37
25	não identificado 7 ¹	ND	ND	8,99 $\pm$ 0,05	ND
26	derivado do ácido p-cumárico ¹	7,68 $\pm$ 0,19	ND	ND	ND
Total de compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ b.s.*)		405,51 $\pm$ 10,26	179,77 $\pm$ 6,65	179,55 $\pm$ 0,57	202,64 $\pm$ 3,79

*base seca

^aNumerado de acordo com cromatogramas apresentado na Figura 1.^bNão Detectado.Os picos foram quantificados em equivalentes de ácido gálico¹ (LOD 1,40 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 4,24 $\mu\text{g/mL}$), rutina² (LOD 0,60 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 1,81 $\mu\text{g/mL}$) e quercetina (LOD 0,75 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 2,27 $\mu\text{g/mL}$).

O composto fenólico descrito como não identificado 1 (pico 1), derivado do ácido p-cumaroilquínico 1 (pico 3), derivado do ácido p-cumaroilquínico 2 (pico 7), derivado do ácido gálico (pico 8), derivado do ácido clorogênico (pico 13), derivado do ácido (4 ou 5) 3-O-p-cumaroilquinico (pico 14), não identificado 4 (pico 16), ácido (4 ou 5) 3-O-p-cumaroilquinico (pico 18), ácido elágico pentosídeo (pico 21) e derivado do ácido p-cumárico (pico 26), foram encontrados exclusivamente em amostras de cajá, representando respectivamente 3, 2, 5, 2, 3, 3, 7, 2 e 2 % do conteúdo total de compostos fenólicos nessa fruta. Assim, 29% do conteúdo total de compostos fenólicos não identificados em cajá correspondem a compostos exclusivos desta espécie (Tabela 2).

Os compostos fenólicos derivados do monogaloil hexosídeo (pico 12), digaloil hexosídeo (pico 15), não identificado 5 (pico 22) e quercetina hexosídeo (pico 23) foram encontrados apenas em seriguela, representando 6, 2, 7 e 2 % do conteúdo de compostos fenólicos totais, respectivamente.

O ácido cafeico-O-hexosídeo (pico 2) representou 5 e 2 % do conteúdo de compostos fenólicos totais em umbu e umbu-cajá, respectivamente. O composto fenólico identificado como um derivado do ácido quínico (pico 4) representou 3 e 2% do conteúdo de compostos fenólicos totais em umbu e umbu-cajá, respectivamente. O composto fenólico não identificado 2 (pico 5) representou 5 % do conteúdo de compostos fenólicos totais em cajá, umbu-cajá e seriguela.

O composto fenólico identificado como monogaloil hexosídeo (pico 6) representou 2 e 4 % do conteúdo de compostos fenólicos totais em cajá e seriguela, respectivamente. O composto fenólico não identificado 3 (pico 9) apresentou $45,48 \pm 0,27$ e $28,01 \pm 0,52 \mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco, representando 16 e 25 % do conteúdo de compostos fenólicos totais em umbu e umbu-cajá, respectivamente. O pico 9 teve uma grande representatividade no conteúdo de compostos fenólicos totais para as espécies umbu e umbu-cajá.

Os compostos fenólicos, ácido 5 ou 3-O-cafeoilquinico (pico 10), ácido p-cumárico hexose (pico 11) e não identificado 7 (pico 25), foram exclusivos da espécie umbu-cajá, apresentando $4,21 \pm 0,08$, $8,99 \pm 0,05$ e $2,17 \pm 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco, representando 2, 1 e 5% do conteúdo de compostos fenólicos totais em umbu-cajá. O composto fenólico não identificado 6 (pico 24), apresentou $25,64 \pm 1,52$; $10,55 \pm 0,15$ e $3,43 \pm 0,37 \mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco, representando 6, 6 e 7 % do

conteúdo de compostos fenólicos totais em cajá, umbu-cajá e seriguela, respectivamente.

A quantidade de compostos fenólicos totais obtida foi $405,51 \pm 10,26$, $179,77 \pm 6,65$, $179,55 \pm 0,57$ e $202,64 \pm 3,79$ $\mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco em cajá, umbu, umbu-cajá e seriguela, respectivamente. O teor total de compostos fenólicos em cajá é inferior ao encontrado em frutos de pequiá (*Caryocar villosum*) que foi de $589,4 \pm 41,5$ $\mu\text{g.g}^{-1}$ em base seca (Chisté & Mercadante, 2012).

CONCLUSÃO

Nas quatro frutas do gênero *Spondias* foram separados 26 compostos fenólicos, e dentre estes 19 foram identificados e 7 não foram identificados. A rutina foi o pico majoritário em cajá, umbu e umbu-cajá, e o galoil-HHDP-hexosídeo 2 foi o majoritário em seriguela. O maior número de ácidos fenólicos foi encontrado em cajá, já o maior número de flavonoides derivados de quercetina foi encontrado na seriguela.

REFERÊNCIAS

- Abo, K. A., Ogunleye, V. O., & Ashidi, J. S. (1999). Antimicrobial Potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytotherapy Research*, 3, 494-497.
- Adedeji, J., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (1991). Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombin* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1494-1497.
- Ayoka, A. O., Akomolafe, R. O., Iwalewa, E. O., Akanmu, M. A., & Ukponmwan, O. E. (2006). Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 166-175.
- de Sousa Araújo, T. A., Thijian Nobre de Almeida e Castro, V., de Amorim, E. L. C., & Paulino de Albuquerque, U. (2012). Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. *Pharmaceutical biology*, 50, 754-759.

- Bystrom, L. M., Lewis, B. A., Brown, D. L., Rodriguez, E., & Obendorf, R. L. (2008). Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. *Food Chemistry*, 111, 1017-1024.
- Cavalcanti, N. D. B., Resende, G. D., & Brito, L. D. L. (1999). Desenvolvimento do imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) na região semi-árida do Nordeste brasileiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 23, 212-213.
- Cavalcanti, N. B., Resende, G. M., Brito L. T. L., & Lima, J. B. (1996). Extrativismo do imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda.) como fonte alternativa de renda para pequenos produtores no semi-árido nordestino: um estudo de caso. *Ciência e Agrotécnica*, 20, 529–533.
- Ceva-Antunes, P. M., Bizzo, H. R., Silva, A. S., Carvalho, C. P. S., & Antunes, O. A. C. (2006). Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT-Food Science and Technology*, 39, 437-443.
- Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5884-5892.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Dias, D. R., Schwan, R. F., & Lima, L. C. O. (2003). Methodology for elaboration of fermented alcoholic beverage from yellow mombin (*Spondias mombin*). *Food Science and Technology*, 23, 342-350.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., e Silva, J. B. D. A., & Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1564-1572.
- Dutra, R. L. T., Dantas, A. M., de Araújo Marques, D., Batista, J. D. F., de Albuquerque Meireles, B. R. L., de Magalhães Cordeiro, Â. M. T., Magnani, M., & Borges, G. D. S. C. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 100, 650-657.

- Engels, C., Gräter, D., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, 46, 557-562.
- da Costa, G. A., & Mercadante, A. Z. (2017). *In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.012>
- da Silva, G. A., Lima, W. Q. F., Guedes, A. D. S., & Rodríguez, J. A. L. (2012). Avaliação da letalidade e atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Spondias mombin* aff. *tuberosa*. *FACIDER-Revista Científica*, 1, 1-18.
- da Silva Freire, E. C. B., da Silva, F. V. G., dos Santos, A. F., & de Medeiros, I. F. (2011). Avaliação da qualidade de ciriguela (*Spondias purpurea*, L) em diferentes estádios de maturação. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6, 27-40.
- de Barros Gomes, E., Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., de Miranda, R. D. C. M., Nigam, N. & Narain, N. (2013). A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3,1.
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. *Food Chemistry*, 127, 807-821.
- Folegatti, M. I., Matsuura, F. C. A. U., Cardoso, R. L., Machado, S. S., Rocha, A. S., & Lima, R. R. (2003). Aproveitamento industrial do umbu: processamento de geleia e compota. *Ciência e Agrotecnologia de Lavras*, 27, 1308-1314.
- Franco, M. R. B., & Shibamoto, T. (2000). Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1263-1265.
- Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., & Murillo, E. (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70, 163-172.

- Gondim, P. J., de M Silva, S., Pereira, W. E., Dantas, A. L., Chaves Neto, J. R., & dos Santos, L. F. (2013). Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 17, 11.
- Gouveia-Figueira, S. C. & Castilho, P. C. (2015). Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*, 73, 28-40.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The Lancet*, 344, 721-724.
- ICH, ICH Harmonised Tripartite Guideline - Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 2005; p 13.
- Ishak, S. A., Ismail, N., Noor, M. A. M., & Ahmad, H. (2005). Some physical and chemical properties of ambarella (*Spondias cytherea* Sonn.) at three different stages of maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 819-827.
- Lins, N. E., Peroni, N., Maranhão, C. M., Maciel, M. I., & De Albuquerque, U. P. (2012). Analysis of umbu (*Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae)) in different landscape management regimes: a process of incipient domestication?. *Environmental monitoring and assessment*, 184, 4489-4499.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S-520S.
- Lira Júnior, J. S. D., Musser, R. D. S., Lederman, I. E., & Martins, L. S. (2008). Variabilidade entre genótipos de um banco de germoplasma de cajá-umbuzeiro (*Spondias* spp.) na Zona da Mata de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 3, 116-120.
- Mariutti, L. R., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Mercadante, A. Z. (2014). The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. *Food Research International*, 64, 618-625.
- Melo, E. A., & ANDRADE, R. D. S. (2010). Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro Bioactive compounds and antioxidant potential from the “umbuzeiro” fruits. *Alimentos e Nutrição*, 21, 453-458.

- Miller, A., & Schaal, B. (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12801-12806.
- Mitchell, J. D., & Daly, D. C. (2015). A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the neotropics. *PhytoKeys*, 55, 1–92.
- Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., Vervoort, J. & Ric de Vos, C. H. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, 141, 1205-1218.
- Moreira, A. C. C. G., Nascimento, J. D. A. M., de Sena Andrade, R. A. M., Maciel, M. I. S., & de Almeida Melo, E. (2012). Bioactive phytochemicals in fruits from genotypes of "caja-umbuzeiras"/Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de caja-umbuzeiras. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 23, 235-242.
- Neiens, S. D., Geißlitz, S. M., & Steinhaus, M. (2017). Aroma-active compounds in *Spondias mombin* L. fruit pulp. *European Food Research and Technology*, 243, 1073-1081.
- Ness, A. R., & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26, 1-13.
- Oladimeji, A. O., Aliyu, M. B., Ogundajo, A. L., Babatunde, O., Adeniran, O. I., & Balogun, O. S. (2016). Identification and comparison of the volatile constituents of fresh and dried leaves of *Spondias mombin* found in North-central Nigeria: *in vitro* evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, 54, 2674-2678.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4, 89.
- Ribeiro, L. D. O., Pontes, S. M., Ribeiro, A. P. D. O., Pacheco, S., Freitas, S. P., & Matta, V. M. D. (2017). Evaluation of cold storage on the bioactive compounds and physical-chemical and microbiological characteristics of pasteurized umbu juice. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20, e2015095.
- Rodrigues, N. P., Salva, T. D. J. G., & Bragagnolo, N. (2015). Influence of coffee genotype on bioactive compounds and the *in vitro* capacity to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4815-4826.

- Santos, C. A. F., & Oliveira, V. R. (2008). Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 731-735.
- Sentandreu, E., Cerdán-Calero, M., Halket, J. M. & Navarro, J. L. (2015). Rapid screening of low-molecular-weight phenols from persimmon (*Diospyros kaki*) pulp using liquid chromatography/UV–visible/electrospray mass spectrometry analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1648-1654.
- Seeram, N. P., Lee, R., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 97, 1-11.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S., & Pasakdee, S. (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114, 955-961.
- Silva, G. A., Brito, N. J. N., Santos, E. C. G., López, J. A., & Almeida, M. G., (2014). Gênero *Spondias*: Aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Revista de Biologia e Farmácia*, 10, 1.
- Silva, Q. J., MOREIRA, A. C. C. G., Melo, E. A., & Lima, V. L. A. G. (2012). Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de cirigueias (*Spondia purpurea* L.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 23, 73-80.
- Silva, A. R. A., Moraes, S. M., Marques, M. M. M., Lima, D. M., Santos, S. C. C., Almeida, R. R., Vieira, I. G. P., & Guedes, M. I. F. (2011). Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17, 406-413.
- Tao, B., Ye, F., Li, H., Hu, Q., Xue, S., & Zhao, G. (2014). Phenolic profile and in vitro antioxidant capacity of insoluble dietary fiber powders from citrus (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) pomace as affected by ultrafine grinding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7166-7173.
- Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Deliza, R., de Oliveira Godoy, R. L., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, 44, 2326-2331.

Weisz, G. M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, 115, 758-765.

Capitulo V

***In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages**

Gilsandro Alves da Costa¹ & Adriana Zerlotti Mercadante¹

¹*Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil*

Artigo aceito para a publicação no *Journal of Food Composition and Analysis*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

In vitro bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages

Gilsandro Alves da Costa¹, Adriana Z. Mercadante*

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2017

Received in revised form 17 February 2017

Accepted 21 February 2017

Available online xxx

Keywords:

Spondias mombin L.*In vitro* digestion

Carotenoid

Xanthophyll esters

LC-MS

Food composition

Beverages

Tropical fruit

Cajá

ABSTRACT

Cajá (*Spondias mombin* L.) fruit, native to Latin American tropical forests, is consumed either *in natura* or its pulp is used to prepare beverages. Aside from important physiological actions, carotenoids are responsible for the yellow skin and pulp color of cajá. As xanthophylls are often acylated to fatty acids in fruits, the native carotenoid composition of cajá frozen pulp and of its beverages was evaluated by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry. The main carotenoids in cajá frozen pulp were (all-*E*)- β -cryptoxanthin ($6.5 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (fw)) and (all-*E*)-zeinoxanthin ($3.5 \mu\text{g g}^{-1}$ fw); esters of lutein, β -cryptoxanthin and zeinoxanthin were also identified. As compounds need to be released from the matrix to be available for absorption, *in vitro* bioaccessibility of carotenoids in cajá water and milk based beverages was investigated. Addition of 7% sugar enhanced bioaccessibility to a similar extent of all carotenoids, in the order water > skimmed milk > whole milk based beverages. The increase in carotenoid bioaccessibility accompanied the increase in the lipid amount in milk used in beverages. Milk calcium did not affect carotenoid bioaccessibility while milk proteins were responsible for the four times increased bioaccessibility of carotenoids with free hydroxy group compared to those of carotenes and totally esterified xanthophylls.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Spondias L. is a genus of edible fruit trees that belongs to the botanic family of Anacardiaceae, which comprises 18 species native to both tropical America and Asia, and to Madagascar (Mitchell and Daly, 2015). *Spondias mombin* L., previously considered a synonymous of *S. lutea* L., is native to tropical forests through much of Southern Mexico and Northern Brazil; its ripe fruits are oblong, 3–6 cm in length, with a dark-yellow thin skin and yellow pulp. Ninety six different common names are listed for *S. mombin*, the most commonly ones are yellow mombin and hog plum in English, ciruelo or jobo in most Spanish-speaking countries, while cajá is used in most parts of Brazil and taperebá in the Brazilian Amazonian region (Mitchell and Daly, 2015).

In Brazil, the trees are mostly found in domestic plantations in the Northeast region, and the fruits are economically important as

part of the income of numerous families and small producers of that region. The fruit is consumed *in natura* in the harvested places during season, but as frozen pulp in the other regions where it can be found all the year-around. The pulp or puree of cajá is the unfermented and undiluted product obtained from the edible part of the fruit with minimum total solid content of 9°Brix (BRASIL, 2000). Frozen pulp is one of the most common forms of fruit produced by the agroindustries in Brazil, which is further used by households to prepare beverages, by mixing with water or milk, with or without sugar.

Cajá fruit has been attracting the attention of many researchers because of its sweet pleasant flavour (Neiens et al., 2016), along with the presence of bioactive compounds (Hamano and Mercadante, 2001; Tiburski et al., 2011; Giuffrida et al., 2015) and antioxidant capacity (Rufino et al., 2010; Tiburski et al., 2011). Among the bioactive compounds, carotenoids are related to important functions and physiological actions, provitamin A activity being the most known one, apart from being responsible for the yellow skin and pulp color of cajá fruits.

Although carotenoids are naturally found esterified with fatty acids in fruits, most of the studies did not yet investigate their carotenoid ester composition. The main difficulties in such analysis are related to the high number of peaks that should be separated

* Corresponding author.

E-mail addresses: azmercadante@gmail.com, azm@unicamp.br

(A.Z. Mercadante).

¹ Present address: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial (DGTA), Centro de Ciência Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, 58220-000, Bananeiras-PB, Brazil.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.012>

0889-1575/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

and the interference that fatty acids may cause in the UV/visible (UV/vis) and mass spectra of non-saponified extracts (Mercadante et al., 2017). Previous studies showed that (all-*E*)- β -cryptoxanthin, (all-*E*)-lutein and (all-*E*)-zeinoxanthin are the main carotenoids in the saponified extract of cajá pulp (Hamano and Mercadante, 2001; Tiburski et al., 2011). Recently, the presence of β -cryptoxanthin esterified with myristic and palmitic acids were reported in cajá (Giuffrida et al., 2015).

These compounds need to be released from the matrix and be absorbed to have effects on the body, and *in vitro* bioaccessibility tests have been widely used to study the amount of these substances that are released after digestion (Garrett et al., 1999; Fernández-García et al., 2009). It is known that carotenoid digestion is influenced by several factors related to food (e.g. matrix composition, lipid content, variety/cultivar, ripening stage, degree of process), chemical structure (e.g. hydrophobicity, state and location in cells/organelles) and by analytical aspects (e.g. amount and type of enzymes, use of saponification) (Fernández-García et al., 2012; Estévez-Santiago et al., 2016; Rodrigues et al., 2016a).

As fruit pulps play an important role in contributing to the intake of certain seasonal and regional fruits, *in vitro* bioaccessibility was applied to evaluate the behavior of carotenoids and their esters in different household recipes of cajá beverages. The native carotenoid composition of cajá frozen pulp and its water and milk based beverages was evaluated by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-MS/MS).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ultra high temperature whole milk and skimmed milk, both from the same brand, containing respectively, 3.0% and 0.05% of fat, according to their labels; and refined sucrose from sugarcane were acquired in Campinas city, Brazil.

Standard of (all-*E*)- β -carotene was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standards of (all-*E*)-lutein and (all-*E*)- β -cryptoxanthin were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). Standards showed at least 97% of purity for (all-*E*)- β -carotene, 92% for (all-*E*)- β -cryptoxanthin and 90% for (all-*E*)-lutein, determined by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD).

Methanol (MeOH) and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) were acquired from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The other reagents were all of analytical grade from Labsynth (Diadema, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). α -Amylase (A3176-1MU), pepsin (P7000-25G), pancreatin (P1750-100G), bile (B8381) and other reagents used in the *in vitro* digestion procedures and in the assays of enzyme activity were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Activity of enzymes was determined according to protocols referred in the Supplementary Material of Minekus et al. (2014), adapted to our laboratory by Rodrigues et al. (2016a). Previously to HPLC analysis, samples and solvents were filtered through Millipore membranes of 0.22 μ m.

2.2. Samples

Packages of 100 g of commercial cajá frozen pulp, totaling 3 kg, were acquired at a market located in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil in July 2016. In order to get a homogeneous sample, each package was opened and divided in four; pieces from all packages were mixed and immediately re-packed under vacuum in 30 g unities. The samples were then stored in freezer at -18°C until analysis. The values of pH 3.05 ± 0.0 and °Brix of

9.4 ± 0.2 are within the range given by the Brazilian legislation (BRASIL, 2000).

Cajá frozen pulp based beverages were obtained following the most used homemade recipe of 1:1 (v/v) dilution, 50% of pulp and 50% of Milli-Q water, or whole milk or skimmed milk to prepare water based beverage (BW), beverage with skimmed milk (BSM) and with whole milk (BWM). Following the same dilution, beverages were prepared adding 7.0 g refined sugarcane per 100 ml to obtain water based beverage with sugar (BWS), with skimmed milk and sugar (BSMS) and with whole milk and sugar (BWMS). All the beverages were prepared in a blender by mixing during 30 s. The pH values were 2.7 for water based beverages and 3.8 for those prepared with milk. The values of soluble solids in °Brix were 4.6 ± 0.2 in the BW, 9.6 ± 0.3 in BWS, 8.2 ± 0.3 in BSM, 14.8 ± 0.5 in BSMS, 8.7 ± 0.2 in BWM and 15.3 ± 0.8 in BWMS.

2.3. In vitro bioaccessibility analysis

In vitro digestion of all the frozen pulp based beverages was carried out according to the protocol proposed by INFOGEST (Minekus et al., 2014) and adapted to carotenoids by Rodrigues et al. (2016a). Briefly, this protocol simulates the oral, gastric and intestinal phases, using aqueous solutions containing electrolytes with concentrations based on physiological conditions. The composition of the simulated fluids, enzyme activities and conditions of incubation time, pH and temperature were exactly the same as those described by Minekus et al. (2014) and Rodrigues et al. (2016a). For all the beverages, 5 g of sample was used and the whole protocol was carried out in triplicate.

The bioaccessibility percentage was calculated according to the following equation:

$$\% \text{Bioaccessibility} = \left(\frac{[\text{carotenoid}]_{\text{micelles}}}{[\text{carotenoid}]_{\text{beverage}}} \right) \times 100$$

where $[\text{carotenoid}]_{\text{micelles}}$ corresponds to carotenoid concentration in the supernatant (micelles) after digestion and $[\text{carotenoid}]_{\text{beverage}}$ to concentration of the same carotenoid in the beverage.

2.4. Carotenoid analysis

2.4.1. Extraction from pulp and beverages

The carotenoids from frozen pulp and water based beverages (5 g of sample) were exhaustively extracted with 20 ml acetone by vortexing during 3 min, followed by centrifugation at 12,000g for 10 min at 12°C (De Rosso and Mercadante, 2007). The method developed for lutein extraction from yogurt was applied for extraction from milk based beverages; 5 g of sample was exhaustively extracted with 20 ml of tetrahydrofuran by vortexing during 1 min, followed by 5 min centrifugation at 3500g at 10°C (Xavier et al., 2012). In both cases, the extraction process was repeated until complete absence of sample color. The extract was transferred to petroleum ether/diethyl ether (1:1, v/v) and the extraction solvent (acetone or tetrahydrofuran) was removed by water washing. Residual water present in the extract was removed by addition of anhydrous Na_2SO_4 . The extract was concentrated, dried and stored at -36°C until analysis by UV/vis and HPLC.

2.4.2. Determination of total carotenoid content by UV/Vis spectrophotometry

Dried carotenoid extract was solubilized in petroleum ether and to obtain a clear solution it was further centrifuged at 29,220g for 10 min at 4°C and filtered through Millipore membranes of 0.22 μ m. Absorbance was measured in a diode array spectrophotometer (Agilent model 8453, Palo Alto, CA, USA). The total carotenoid content was calculated by using the specific extinction

coefficient of (all-*E*)- β -cryptoxanthin ($E_{1cm}^{1\%} = 2386$, in petroleum ether), the major carotenoid in cajá.

2.4.3. HPLC-DAD-MS/MS

Immediately before HPLC-DAD-MS/MS, the dried carotenoid extracts from pulp and beverages were dissolved in 5 ml of MeOH/MTBE (50:50, v/v), and those from the micellar fraction were dissolved in 0.3 ml of the same solvent mixture.

The carotenoids were analyzed in a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC equipped with quaternary pumps (model LC-20AD), a DGU-20A5 online degasser and a Rheodyne (Rheodyne LCC, Robert Park, CA, USA) injection valve with a 20 μ l loop, connected in series to a DAD (Shimadzu, model SPD20A) and to a mass spectrometer with an ion trap analyzer with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source, both from Bruker Daltonics (Amazon speed ETD model, Bremen, Germany). The UV/vis spectra were recorded between 200 and 600 nm and chromatograms were processed at 450 nm. The MS parameters were set in the same conditions as those previously used for carotenoids in the laboratory (Chisté and Mercadante, 2012; Petry and Mercadante, 2016; Rodrigues et al., 2016b).

Separation was carried out on a C₃₀ YMC column (5 μ m, 250 mm x 4.6 mm) (Waters, Wilmington, DE, USA) kept at 35 °C, using as mobile phase MeOH/MTBE/H₂O (81:15:4) (A) and MeOH/MTBE/H₂O (16:80.4:3.6) (B) in a linear gradient from 99:1 to 44:56 A:B in 39 min, then to 0:100 A:B in 6 min and keeping this proportion during 5 min, returning to the initial conditions (99:1 A:B) in 5 min, and maintaining this condition for 5 min, as described by Rodrigues et al. (2016b). Flow rate was set at 1.0 ml/min.

Carotenoids were identified by interpretation of the following combined information obtained by HPLC-DAD-MS/MS: elution order on C₃₀ column, UV/vis spectrum features (maximum absorption wavelengths (λ_{max}), spectral fine structure (%III/II), *cis*-peak intensity (% A_B/A_{II})) and MS characteristics (protonated molecule ([M+H]⁺), in-source and MS/MS ion fragments). In addition, data was compared with those available in the literature (Breithaupt and Bamedi, 2001; De Rosso and Mercadante, 2007; Petry and Mercadante, 2016; Rodrigues et al., 2016b; Mercadante et al., 2017).

The carotenoids were quantified by HPLC, using external five-point analytical curves (in triplicate) for (all-*E*)-lutein (1.6–33.2 μ g/

ml), (all-*E*)- β -cryptoxanthin (1.9–33.4 μ g/ml) and (all-*E*)- β -carotene (2.2–33.5 μ g/ml). For all the analytical curves, a linear regression was adjusted with $r^2 = 0.99$, and the following equations were obtained: $y = 367392x - 131275$ for (all-*E*)-lutein, $y = 382850x - 214650$ for (all-*E*)- β -cryptoxanthin and $y = 445008x - 293554$ for (all-*E*)- β -carotene, where y means peak area and x is carotenoid concentration. The limit of detection was 0.1 μ g/ml and the limit of quantification was 0.2 μ g/ml for (all-*E*)-lutein and 0.3 μ g/ml for (all-*E*)- β -cryptoxanthin and (all-*E*)- β -carotene, all calculated through the calibration curves mentioned above (Ribani et al., 2004).

The NAS-IOM (2001) conversion factor was used to calculate the vitamin A value, with 12 μ g of dietary (all-*E*)- β -carotene and 24 μ g of other dietary provitamin A carotenoids corresponding to 1 μ g of retinol activity equivalent (RAE). The contribution of Z isomers of provitamin A carotenoids were calculated as other dietary provitamin A carotenoids.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by the Statistica 7.0 software. Means were compared by one way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). Regression analyses of the analytical curves were conducted using the Origin 8.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Carotenoids in cajá frozen pulp

The spectroscopic data characteristics described in Table 1 were used to identify free carotenoids and their esters in cajá frozen pulp, while the profile obtained under the chromatographic conditions used on C₃₀ column can be visualized in Fig. 1.

As expected, the free xanthophylls (all-*E*)-lutein (peak 1), (all-*E*)-zeaxanthin (peak 2), (all-*E*)-zeinoxanthin (peak 3) and (all-*E*)- β -cryptoxanthin (peak 4) eluted earlier than the carotenes, (all-*E*)- α -carotene (peak 5) and (all-*E*)- β -carotene (peak 7). As the identification of (all-*E*)-lutein, (all-*E*)-zeaxanthin, (all-*E*)- β -cryptoxanthin and of the carotenes were previously detailed reported (De Rosso and Mercadante, 2007; Petry and Mercadante, 2016;

Table 1
Chromatographic, UV/Vis and mass spectrometry characteristics, obtained by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids from cajá frozen pulp.

Peak number ^a	carotenoid	t_R^b (min)	λ_{max}^c (nm)	%III/II	%A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragment ions (m/z)
1	(all- <i>E</i>)-lutein	9.9	420,445,472	56	0	569.4	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺
2	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	11.4	425,450,477	13	0	569.5	551.4 [M+H-18] ⁺ , 533.4 [M+H-18-18] ⁺ , 447.4 [M+H-92] ⁺
3	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	16.4	420,445,473	60	0	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺ , 460.4 [M+H-92] ⁺
4	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin	18.8	425,451,478	27	0	553.4	535.4 [M+H-18] ⁺ , 461.4 [M+H-92] ⁺
5	(all- <i>E</i>)- α -carotene	25.7	420,446,474	56	0	537.4	481.3 [M+H-56] ⁺ , 444.2 [M+H-92] ⁺
6	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-myristate	27.3	420,445,473	60	0	not detected	551.4 [M+H-228]⁺ → 533.4 [M+H-18-228]⁺, 495.4 [M+H-228-56]⁺, 459.4 [M+H-228-92]⁺, 411.2
7	(all- <i>E</i>)- β -carotene	28.7	425,451,477	17	0	537.4	445.4 [M-92] ⁺
8	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin myristate	39.7	425,451,479	31	0	763.7	671.6 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-228] ⁺ , 443.3 [M+H-228-92] ⁺
9	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin palmitate	43.0	425,451,477	29	0	791.7	699.6 [M+H-92] ⁺ , 535.4 [M+H-256] ⁺ , 443.4 [M+H-256-92] ⁺
10	(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	44.2	426,446,474	60	0	nd ^d	761.7 [M+H-228] ⁺ , 533.4 [M+H-228-228] ⁺ , 441.3 [M+H-228-228-56] ⁺ , 411.3 [M+H-18] ⁺
11	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	45.3	420,448,475	44	0	819.7	802.6 [M+H-18] ⁺ , 535.4 [M+H-284] ⁺ , 443.3 [M+H-284-92] ⁺

Bold face indicates MS in-source fragment ions.

^a Numbered according to the chromatogram shown in Fig. 1.

^b Retention time on the C₃₀ column.

^c Gradient of methanol, MTBE and water.

Please cite this article in press as: G.A. da Costa, A.Z. Mercadante, *In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages, J. Food Compos. Anal. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.012>

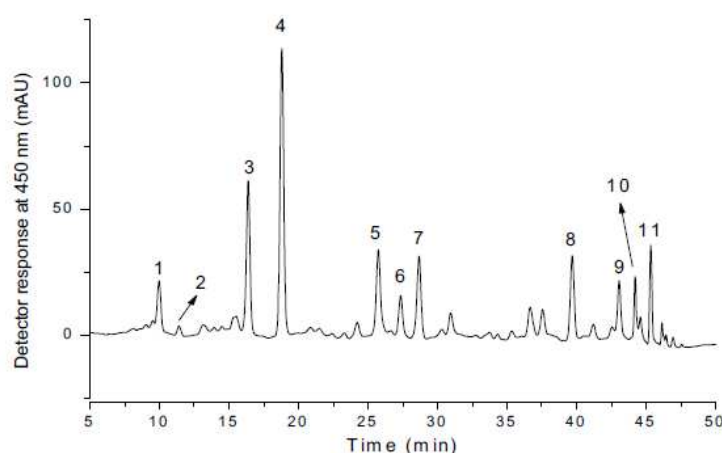


Fig. 1. Chromatogram obtained by HPLC-PDA of carotenoids from non-saponified extract of frozen pulp of cajá (*Spondias mombin* L.). See text for chromatographic conditions. Peak identification and characterization are given in Table 1.

Rodrigues et al., 2016b), only the identification of peak 3 is discussed in the present study.

The UV/vis spectrum of peak 3, equal to those of lutein and α -carotene, indicated a chromophore corresponding to the presence of 10 conjugated double bonds with one β - and one ϵ -ring as end-groups. However, considering peak 3 elution and UV/vis features, there are two possibilities that fulfill these characteristics: (all-*E*)- α -cryptoxanthin and (all-*E*)-zeinoxanthin as their difference relies on the position of the hydroxyl group, either attached to the ϵ -ring and thus allylic to the double bond, as in α -cryptoxanthin, or attached to the β -ring as in zeinoxanthin. Differentiation of both carotenoids can be easily obtained by in-source MS spectrum, as the protonated molecule of (all-*E*)-zeinoxanthin shows higher intensity compared to the water elimination fragment, and the opposite is observed in the MS of (all-*E*)- α -cryptoxanthin. So, as the intensity of $[M+H]^+$ at m/z 553.4 was higher than that at m/z 535.4 ($[M+H-18]^+$), peak 3 was identified as (all-*E*)-zeinoxanthin. This same behavior was also described by De Rosso and Mercadante (2007). Identification of (all-*E*)-zeinoxanthin, confirmed by MS in the present study,

corroborates a previous report of (all-*E*)-zeinoxanthin in cajá pulp, identified only by elution order on C_{18} column, UV/vis and negative response to methylation reaction (Hamano and Mercadante, 2001). The correct identification of this monohydroxy xanthophyll is important as zeinoxanthin does not show vitamin A activity while α -cryptoxanthin does.

The esters of mono-hydroxy xanthophylls eluted after the carotenes, as (all-*E*)- β -cryptoxanthin myristate (peak 8), (all-*E*)- β -cryptoxanthin palmitate (peak 9) and (all-*E*)-zeinoxanthin stearate (peak 11), with increasing retention as fatty acid molecular weight increased. Their spectroscopic characteristics were the same as those previously described for similar esters in oranges and mandarin (Petry and Mercadante, 2016). However, it is not possible to differentiate between esters of (all-*E*)- β -cryptoxanthin and (all-*E*)-zeinoxanthin by MS, thus peaks 8, 9 and 11 were assigned considering their elution order, λ_{max} and spectral fine structure.

The monoester of lutein eluted between free xanthophylls and carotenes on the C_{30} column, while its diester eluted after the carotenes. Peak 6 was identified as (all-*E*)-lutein-3'-*O*-myristate

Table 2
Carotenoid contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) in cajá frozen pulp and in its pulp based beverages.

Peak number	carotenoid	frozen pulp	BW	BWS	BSM	BSMS	BWM	BWMS
1	(all- <i>E</i>)-lutein	1.2 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1
2	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
3	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	3.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1
4	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin	6.5 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.1
5	(all- <i>E</i>)- α -carotene	2.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.1
6	(all- <i>E</i>)-lutein-3'- <i>O</i> -myristate	1.3 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1
7	(all- <i>E</i>)- β -carotene	2.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
8	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin myristate	2.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
9	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin palmitate	1.4 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0
10	(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	1.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0
11	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	1.8 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0
	Total carotenoid by HPLC	23.9 $\pm$ 1.2	13.4 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.4	12.1 $\pm$ 0.9	11.9 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.7
	Total carotenoid by UV/Vis	28.4 $\pm$ 0.8	16.1 $\pm$ 0.1	13.4 $\pm$ 0.1	16.1 $\pm$ 2.6	14.3 $\pm$ 0.2	16.2 $\pm$ 0.7	16.6 $\pm$ 1.1
	Provitamin A Value ($\mu\text{g RAE}/100\text{g}$)	67.3 $\pm$ 3.7	38.4 $\pm$ 1.4	34.9 $\pm$ 1.6	35.3 $\pm$ 2.7	34.6 $\pm$ 1.2	33.8 $\pm$ 1.2	36.2 $\pm$ 2.3

Values are average and standard deviation of triplicates.

BW: beverage with water, BWS: beverage with water and sugar, BSM: beverage with skimmed milk, BSMS: beverage with skimmed milk and sugar, BWM: beverage with whole milk, BWMS: beverage with whole milk and sugar.

and peak 10 as (all-*E*)-lutein dimyristate, with UV/vis, [M + H]⁺ and MS/MS fragments compatible to those already reported by Rodrigues et al. (2016b) for the same carotenoids in murici fruit.

This is the first time that esters of lutein and of zeinoxanthin are reported in cajá, as β -cryptoxanthin acylated with myristic and palmitic acids were previously found in fresh cajá (Giuffrida et al., 2015).

The contents of identified carotenoids in frozen pulp of cajá are shown in Table 2. The total carotenoid content of cajá pulp found in the present study was $23.9 \pm 1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (fw), with free (all-*E*)- β -cryptoxanthin as the most abundant one, accounting for 27% of the total, followed by 15% of β -cryptoxanthin esters and 15% of (all-*E*)-zeinoxanthin. Similar contents of total carotenoids, 18.0 – $22.9 \mu\text{g g}^{-1}$ fw, were reported in three brands of frozen pulp of cajá (Hamano and Mercadante, 2001), while $35.4 \mu\text{g g}^{-1}$ fw was reported in frozen pulp, both from Brazil (Tiburski et al., 2011). It is important to highlight that HPLC was used in both studies, but as the extract was saponified, only free β -cryptoxanthin was detected, accounting respectively, for 32–36% and 48% of the total carotenoid content, while 42% was found in the present study for the sum of free and acylated β -cryptoxanthin. On the other side, almost double of total carotenoid content determined by UV/vis, $45.8 \mu\text{g g}^{-1}$ fw, was found in fresh pulp of cajá from Panamá, with free (all-*E*)- β -cryptoxanthin accounting for 25% and its esters by 3.3% (Giuffrida et al., 2015). This variation was expected as fruits were grown in different areas and in different years.

Among the 11 carotenoids separated in cajá, those contributing to the provitamin A value of cajá are β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene. The provitamin A value of cajá frozen pulp of $67 \mu\text{g RAE}/100\text{g}$ obtained in the present study is in the range to those previously reported for cajá frozen pulp from Brazil, 45 – $111 \mu\text{g RAE}/100\text{g}$ (Hamano and Mercadante, 2001; Tiburski et al., 2011). Although cajá pulp has lower provitamin A value than those reported for six fruits from Amazonia (302 – $3640 \mu\text{g RAE}/100\text{g}$) (De Rosso and Mercadante, 2007), it is higher than $10.4 \mu\text{g}$ from pulp of cashew-apple (Assunção and Mercadante, 2003). The provitamin A values of cajá beverages were higher as compared to 5.9 – $6.2 \mu\text{g RAE}/100\text{g}$ of orange juice-milk beverages (Zulueta et al., 2010).

3.2. Carotenoid bioaccessibility in pulp based beverages

Beverages with frozen pulp were prepared as usually done at home, with water (BW), with water and sugar (BWS), with skimmed milk (BSM), with skimmed milk and sugar (BSMS), with

whole milk (BWM) and with whole milk and sugar (BWMS). The different basis used to prepare the beverages did not influence the carotenoid extractability and consequently their composition, as shown in Table 2.

Considering all the beverages, Table 3 shows that all free xanthophylls were more bioaccessible than carotenes and xanthophyll esters in cajá frozen pulp based beverages. The most bioaccessible carotenoid was (all-*E*)-lutein, ranging from 11.8 to 34.6%, followed by (all-*E*)-zeaxanthin from 7.4 to 15.2%, (all-*E*)-zeinoxanthin from 5.2 to 19.5% and (all-*E*)- β -cryptoxanthin ranging from 5.2 to 19.5% (Table 3). The bioaccessibility of xanthophyll esters were in the range of 2.9–8.9%. In addition, (all-*E*)- β -carotene and (all-*E*)- α -carotene also presented bioaccessibility on the same average, 4.1 – 8.3% and 4.3 – 7.8% , respectively. A similar trend, with free xanthophylls showing the highest bioaccessibility was also reported for murici dry fruit, with 29% for (all-*E*)-lutein and 22% for (all-*E*)-zeaxanthin (Rodrigues et al., 2016a). As carotenes are located inside the micelles core and xanthophylls reside near the surface, the transfer of free xanthophylls into micelles is facilitated and likely explains this difference between free xanthophylls and carotenes (Garrett et al., 1999).

On the other hand, the bioaccessibility of (all-*E*)-lutein dimyristate was much higher in murici (18%) than in the cajá based beverages (4.7 – 6.1%). Different results were also reported for goji dry fruit, the liberation of free zeaxanthin (8.0%) was lower than that of zeaxanthin dipalmitate (26.6%) (Hempel et al., 2017). In addition, the bioaccessibility of β -cryptoxanthin (0.0 – 9.8%) was higher than that of β -carotene (0.1 – 9.1%) in fresh homogenized peach, red pepper and watermelon, while the opposite was observed in loquat, mandarin, orange and persimmon (Estévez-Santiago et al., 2016). In frozen homogenized foods, the bioaccessibility of β -carotene was about 0.7% in carrot and 29% in gac fruit (Müller-Maatsch et al., 2017).

Although the INFOGEST method (Minekus et al., 2014) was used in all above mentioned studies, these results indicate that the extent of *in vitro* digestion ranges from 0 to 35%, depending on the interaction between structure/characteristics and composition of both carotenoids and matrix.

Sugar addition improved overall bioaccessibility in both water and milk based beverages, but at different extents (Table 3). The overall bioaccessibility increased by 27% when water based beverages were compared, 22% in skimmed-milk and 15% in whole milk based beverages. When 7% of sucrose was added, the

Table 3
Bioaccessibility (%) of cajá frozen pulp based beverages.

carotenoid	BW	BWS	BSM	BSMS	BWM	BWMS
(all- <i>E</i>)-lutein	11.8 ± 1.1 d	19.5 ± 2.4 cd	25.3 ± 2.1 bc	30.8 ± 4.9 ab	31.4 ± 3.5 ab	34.6 ± 2.6 a
(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	7.4 ± 0.3 c	8.9 ± 0.5 c	11.8 ± 0.6 b	13.1 ± 0.7 b	12.9 ± 0.9 ab	15.2 ± 1.3 a
(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	5.2 ± 0.2 d	6.4 ± 0.2 cd	9.8 ± 1.3 bc	12.5 ± 0.9 b	17.4 ± 2.6 a	19.5 ± 1.1 a
(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin	5.2 ± 0.4 d	6.8 ± 0.2 cd	9.8 ± 1.3 bc	13.1 ± 0.9 b	19.5 ± 3.1 a	21.9 ± 1.2 a
(all- <i>E</i>)- α -carotene	4.3 ± 0.1 d	5.3 ± 0.2 c	5.5 ± 0.4 c	6.3 ± 0.4 b	6.6 ± 0.1 b	7.8 ± 0.1 a
(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-myristate	2.9 ± 0.1 d	4.7 ± 0.3 c	5.2 ± 0.4 c	6.3 ± 0.3 b	6.8 ± 0.4 b	8.9 ± 0.4 a
(all- <i>E</i>)- β -carotene	4.1 ± 0.0 d	5.2 ± 0.3 cd	5.2 ± 0.3 c	6.5 ± 0.1 b	7.0 ± 0.8 b	8.3 ± 0.3 a
(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin myristate	4.0 ± 0.2 b	5.1 ± 0.4 a	5.1 ± 0.4 a	5.7 ± 0.1 a	5.5 ± 0.1 a	5.6 ± 0.5 a
(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin palmitate	4.5 ± 0.3 c	4.8 ± 0.3 c	5.1 ± 0.3 cb	5.6 ± 0.1 ba	5.5 ± 0.1 ba	5.9 ± 0.1 a
(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	4.7 ± 0.2 c	5.2 ± 0.3 b	5.3 ± 0.1 b	5.9 ± 0.1 a	6.0 ± 0.1 a	6.1 ± 0.1 a
(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	4.6 ± 0.2 c	5.1 ± 0.1 b	5.3 ± 0.1 b	5.9 ± 0.3 a	6.2 ± 0.0 a	6.1 ± 0.2 a
Overall	5.2 ± 0.3 e	6.6 ± 0.0 de	8.3 ± 0.1 cd	10.1 ± 0.3 cb	11.9 ± 0.1 ab	13.7 ± 0.3 a

Overall bioaccessibility reflects the percentual ratio between the total concentration of carotenoids in beverages micellar fraction and total concentration of carotenoids in beverages. The (%) bioaccessibility of carotenoids are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). Different lowercase letters on the same line indicate significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

BW: beverage with water, BWS: beverage with water and sugar, BSM: beverage with skimmed milk, BSMS: beverage with skimmed milk and sugar, BWM: beverage with whole milk, BWMS: beverage with whole milk and sugar.

Table 4

Carotenoid contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ fw) in the micellar fractions obtained after *in vitro* digestion of cajá frozen pulp based beverages.

Peak number	Carotenoid	Carotenoid content in micellar fraction					
		BW	BWS	BSM	BSMS	BWM	BWMS
1	(all- <i>E</i>)-lutein	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.01
2	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01
3	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.27 ± 0.04	0.20 ± 0.02
4	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.46 ± 0.07	0.56 ± 0.03
5	(all- <i>E</i>)- α -carotene	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.10 ± 0.00
6	(all- <i>E</i>)-lutein-3'-O-myristate	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00
7	(all- <i>E</i>)- β -carotene	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.00
8	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin myristate	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.01
9	(all- <i>E</i>)- β -cryptoxanthin palmitate	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
10	(all- <i>E</i>)-lutein dimyristate	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
11	(all- <i>E</i>)-zeinoxanthin stearate	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00
	Total content	0.68 ± 0.06	0.77 ± 0.01	0.96 ± 0.07	1.19 ± 0.06	1.41 ± 0.14	1.55 ± 0.08
	Provitamin A Value ($\mu\text{g RAE}/100\text{g}$)	1.73 ± 0.08	1.95 ± 0.09	2.31 ± 0.22	2.83 ± 0.12	3.45 ± 0.40	4.20 ± 0.20

Values are average and standard deviation of triplicates in $\mu\text{g g}^{-1}$ fw.

BW: beverage with water, BWS: beverage with water and sugar, BSM: beverage with skimmed milk, BSMS: beverage with skimmed milk and sugar, BWM: beverage with whole milk, BWMS: beverage with whole milk and sugar.

values of soluble solids in the beverages increased by *ca.* 6 °Brix, which probably did not affect beverage viscosity but somehow may have affected the digestion process, micelle formation or separation of supernatant. The basis for this positive influence is unknown. In another complete different scenario, an adverse effect of boiling pumpkin in water and 60% sucrose on micellization of provitamin A carotenoids in pumpkin was attributed to increased chyme viscosity by sucrose penetration in the pulp during boiling, such that access of digestive enzymes decreased and resulted in reduced release of carotenoids (Ribeiro et al., 2015).

In our study, the increase in overall bioaccessibility accompanied the increase in the amount of fat in the milk used in beverages, as the average percentage of fat in UHT skimmed milk is 0.1% and in UHT whole milk is 3.0–3.3% in Brazil (Domareski et al., 2010; Vesconsi et al., 2012).

Addition of whole milk and 7% sugar increased 2.6 times overall bioaccessibility when compared to water based beverage, with variation in the increased percentage of 193% for lutein, 321% for β -cryptoxanthin, 102% for β -carotene and 30–40% for the carotenoid esters, except of 207% for lutein-3'-O-myristate. In line to these results, the increased percentage in the β -carotene bioaccessibility of fruit pulp in the presence of whole milk and sugar compared to fruit pulp alone ranged from 12 to 56%, depending on the mango cultivar (Veda et al., 2007). Results demonstrated that the bioaccessibility of total carotenoids improved by 37% in beverages containing 75% of mixed fruit juice, 17.5% of whole milk and 7.5% of sugar compared to the fruit juice alone (Rodríguez-Roque et al., 2014). In fact, the increase in the bioaccessibility varied depending on the carotenoid, 89% for β -carotene, 35% for β -cryptoxanthin and 22% for lutein (Rodríguez-Roque et al., 2014). As carotenoid absorption not only depends on their release from the food matrix but also on their incorporation into micelles, most likely the fat content of whole milk increased the solubilization of carotenoids into mixed micelles and thus, increased their bioaccessibility (Fernández-García et al., 2012).

This trend was also followed in our study, when skimmed milk and the same amount of sugar were used instead of water, with an increase of 1.6 times in overall bioaccessibility and individual percentage increases of 161% for lutein, 151% for β -cryptoxanthin, 58% for β -carotene and 24–42% for the carotenoid esters, except of 117% for lutein-3'-O-myristate. Similar behavior was also previously reported when skimmed milk was added to blended fruit juices, with an increase in the bioaccessibility of 57% for lutein, 83%

for β -cryptoxanthin and 32% for β -carotene (Granado-Lorencio et al., 2009).

The contents of calcium in milk are most likely not responsible for the increase in carotenoid bioaccessibility in all milk based beverages in the present study, as presence of calcium chloride decreased carotenoid bioaccessibility in a significant concentration-dependent way (Corte-Real et al., 2016).

Thus, the enhancement of carotenoid bioaccessibility in all milk based beverages may probably be attributed to milk protein as the fat content in skimmed milk is very low. In fact, the most abundant milk proteins show different proteolysis under *in vitro* digestion; intact β -lactoglobulin was present after the gastric phase while α -lactalbumin was completely hydrolyzed and caseins were mostly hydrolyzed (Egger et al., 2016). Moreover, about 60% of proteolysis occurred in milk proteins when the INFOGEST *in vitro* protocol was used and generation of free amino acids occurred mainly during the intestinal phase (Egger et al., 2016). These facts indicate that most probably milk-derived phosphopeptides are able to act as the amphiphilic milk proteins which rapidly adsorb at the surface of the formed micelles, reducing the interfacial tension and forming thick layers which prevent micelles from coalescence or flocculation via steric and electrostatic stabilization mechanisms at the pH of gastric or intestinal phases (Dickinson, 2009; Raikos, 2010).

It is very interesting to highlight that milk addition had four times higher positive influence on the bioaccessibility of carotenoids with free hydroxy group (free xanthophylls and lutein-3'-O-myristate) compared to those of non polar carotenoids and totally esterified xanthophylls.

As the bioaccessibility of provitamin A carotenoids were in the range of 4.1–21.9%, the contents of those carotenoids after digestion were low, and therefore the vitamin A value of all the beverages after digestion were only 1.7–4.2 $\mu\text{g RAE}/100\text{g}$ (Table 4).

4. Conclusions

When we compare the different beverages, addition of sugar enhanced bioaccessibility, apparently at similar extent to all carotenoids, although effect increased in the order water > skimmed milk > whole milk. As expected, the increase in carotenoid bioaccessibility accompanied the increase in the amount of fat in the milk used in beverages. Moreover, while milk calcium most likely did not affect carotenoid bioaccessibility, milk proteins were responsible for the increase in carotenoid bioaccessibility in all milk-based beverages. In fact, four times

higher positive influence on the bioaccessibility of carotenoids with free hydroxy group compared to those of carotenes and totally esterified xanthophylls was found in milk based beverages.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant 2013/07914-8) and A.Z. Mercadante thanks CNPq grant 308484/2014-2.

References

- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z., 2003. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *J. Food Compos. Anal.* 6, 647–657.
- BRASIL, Instrução Normativa, no. 1 de 7 de janeiro de 2000. Disponível em: www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989581629.03_enol_in_1.00_mapa.doc. (Accessed 18 January 2017).
- Breithaupt, D.E., Bamedi, A., 2001. Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on β -cryptoxanthin esters. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2064–2070.
- Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., 2012. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5884–5892.
- Corte-Real, J., Iddir, M., Soukoulis, C., Richling, E., Hoffmann, L., Bohn, T., 2016. Effect of divalent minerals on the bioaccessibility of pure carotenoids and on physical properties of gastro-intestinal fluids. *Food Chem.* 197, 546–553.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-PDA-MS/MS from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5062–5072.
- Dickinson, E., 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* 23, 1473–1482.
- Domareski, J.L., Bandiera, N.S., Sato, R.T., Casale, A.A.L., 2010. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Arch. Latinoam. Nutr.* 60, 261–269.
- Egger, L., Menard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodtkorb, A., Catteneo, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., García-Llatas, R., Lagarda, M.J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A.R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B.S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C.N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E.K., Vegarud, G.E., Vergères, G., Portmann, R., 2016. The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: from knowledge to action. *Food Res. Int.* 88, 217–225.
- Estévez-Santiago, R., Olmedilla-Alonso, B., Fernández-Jalao, I., 2016. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids from fruits: application of a standardised static *in vitro* digestion method. *Food Funct.* 7, 1354–1366.
- Fernández-García, E., Garvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A., 2009. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* 29, 751–760.
- Fernández-García, E., Garvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., Hornero-Méndez, D., 2012. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. *Food Res. Int.* 46, 438–450.
- Garrett, D.A., Failla, M.L., Sarama, R.J., 1999. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4301–4309.
- Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., Murillo, E., 2015. Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits* 70, 163–172.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., Olmedilla-Alonso, B., 2009. Bioavailability of carotenoids and α -tocopherol from fruit juices in the presence of absorption modifiers: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Br. J. Nutr.* 101, 576–582.
- Hamano, P.S., Mercadante, A.Z., 2001. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). *J. Food Compos. Anal.* 14, 335–343.
- Hempel, J., Schädle, C.N., Sprenger, J., Heller, A., Carle, R., Schweiggert, R.M., 2017. Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chem.* 218, 525–533.
- Müller-Maatsch, J., Sprenger, J., Hempel, J., Kreiser, F., Carle, R., Schweiggert, R.M., 2017. Carotenoids from gac fruit aril (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) are more bioaccessible than those from carrot root and tomato fruit. *Food Res. Int.* doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.053>.
- Mercadante, A.Z., Rodrigues, D.B., Petry, F.C., Mariutti, L.R.B., 2017. Carotenoid esters in foods—a review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Res. Int.* doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.018>.
- Minekus, M., Alvinger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodtkorb, A., 2014. Standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124.
- Mitchell, J.D., Daly, D.C., 2015. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the neotropics. *PhytoKeys* 55, 1–92.
- NAS-IOM, 2001. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academy Press, Washington, USA, pp. 92.
- Neiens, S.D., Geibltz, S.M., Steinhaus, M., 2016. Aroma-active compounds in *Spondias mombin* L. fruit pulp. *Eur. Food Res. Technol.* doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-016-2825-7>.
- Petry, F.C., Mercadante, A.Z., 2016. Composition by LC-MS/MS of new carotenoid esters in mango and Citrus. *J. Agric. Food Chem.* 64, 8207–8224.
- Raikos, V., 2010. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocoll.* 24, 259–265.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771–780.
- Ribeiro, E.M.G., Chitchumroonchokchai, C., de Carvalho, L.M.J., de Moura, F.F., de Carvalho, J.L.V., Failla, M.L., 2015. Effect of style of home cooking on retention and bioaccessibility of pro-vitamin A carotenoids in biofortified pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *Food Res. Int.* 77, 620–626.
- Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., 2014. *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. *Food Res. Int.* 62, 771–778.
- Rodrigues, D.B., Mariutti, L.R.B., Mercadante, A.Z., 2016a. *In vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food Funct.* 7, 4992–5001.
- Rodrigues, D.B., Mariutti, L.R.B., Mercadante, A.Z., 2016b. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1457, 116–124.
- Rufino, M.S., Alves, R.E., de Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121, 996–1002.
- Tiburski, J.H., Rosenthal, A., Deliza, R., Godoy, R.L.O., Pacheco, S., 2011. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Res. Int.* 44, 2326–2331.
- Veda, S., Platel, K., Srinivasan, K., 2007. Varietal differences in the bioaccessibility of β -carotene from mango (*Mangifera indica*) and papaya (*Carica papaya*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7931–7935.
- Vesconsi, C.N., Valduga, A.T., Cichoski, A.J., 2012. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. *Ciênc. Rural* 42, 730–736.
- Xavier, A.A.O., Mercadante, A.Z., Domingos, L.D., Viotto, W.H., 2012. Development and validation of a spectrophotometric method for determination of lutein colorant added to nonfat yogurt. *Quím. Nova* 35, 2057–2062.
- Zulueta, A., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A., 2010. Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice-milk beverage and behavior during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 525–534.

DISCUSSÃO GERAL

Os frutos do gênero *Spondias* apresentam grande importância para a região Nordeste brasileira, não só do ponto de vista da biodiversidade do cenário em que essas espécies estão inseridas, mas também da importância econômica e por consequência social para esta região. Vários estudos têm sido publicados envolvendo frutos deste gênero, como os teores totais de alguns compostos bioativos e a avaliação das características físico-químicas, químicas, físicas e biológicas; no entanto, a identidade e quantidade de compostos bioativos como carotenoides e compostos fenólicos ainda não foram estudadas pelas técnicas mais sofisticadas e modernas, como a cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).

Diante do exposto, foi então conduzido um trabalho de identificação e quantificação dos carotenoides livres e ésteres de carotenoides em frutas de cajá (*Spondias mombin* L.), umbu (*Spondias tuberosa*), umbu-cajá (*Spondias* spp.) e seriguela (*Spondias purpurea* L.) por LC-MS/MS. A identificação foi realizada com sucesso com base nas seguintes informações combinadas: ordem de eluição na coluna C30, características dos espectros UV-Visível (comprimento de onda máximo de absorção, estrutura fina espectral e intensidade do pico *cis*) e espectros de massas com fonte de ionização química à pressão atmosférica em modo positivo que permitiu a obtenção da molécula protonada e de fragmentos MS/MS diagnósticos. A quantificação dos carotenoides livres e ésteres de carotenoides foi feita com o uso de curvas analíticas de 5 pontos em triplicata para (all-*E*)-luteína (1,6 – 33,2 µg/ml), (all-*E*)-β-criptoxantina (1,9 – 33,4 µg/ml) e (all-*E*)-β-caroteno (2,2 – 33,5 µg/ml). O limite de detecção (LOD) foi 0,1 mg/mL e limite de quantificação (LOQ) foi 0,2 mg/mL para (all-*E*)-luteína, 0,3 mg/mL para (all-*E*)-β-criptoxantina e (all-*E*)-β-caroteno, todos calculados através de curvas de calibração.

O sistema cromatográfico utilizado permitiu a separação de 38 carotenoides divididos entre, 15 xantofilas livres, 3 carotenos, 12 monoésteres de carotenoides, 8 diésteres de carotenoides e 2 clorofilas. No cajá foram separados 21 picos, sendo 9 xantofilas livres, 2 carotenos, 5 monoésteres de carotenoides e 5 diésteres de carotenoides, com (all-*E*)-β-criptoxantina (22%), (all-*E*)-zeinoxantina (12%) e all-*E*-β-criptoxantina miristato (8%) como os majoritários nessa fruta. No umbu foram separados 20 picos, sendo 8 xantofilas livres, 2 carotenos, 5 monodiesteres de carotenoides e 5 diésteres de carotenoides, ainda foram identificados feofitina a e feofitina a'. Os carotenoides majoritários no umbu foram a (all-*E*)-luteína (26%) e

(all-*E*)- β -criptoxantina (19%). No umbu-cajá foram separados 24 picos sendo, 8 xantofilas livres, 2 carotenos, 8 monoésteres de carotenoides e 6 diésteres de carotenoides, (all-*E*)- β -caroteno (18%) e (all-*E*)- β -criptoxantina (15%) como os majoritários. Na seriguela foram separados 19 picos sendo, 7 xantofilas livres, 1 caroteno, 6 monoésteres de carotenoides e 5 diésteres de carotenoides, com (all-*E*)-luteína (19%) e (all-*E*)- β -caroteno (14%) como majoritários.

Os compostos fenólicos obtidos pela extração com metanol/água (80:20) foram determinados por HPLC-DAD-MS/MS. Neste caso foi usada a fonte de ionização electrospray (ESI) no modo negativo e positivo e o analisador de massa/carga *ion trap*. A dificuldade na identificação dos compostos fenólicos foi atribuída à complexidade das amostras de *Spondias* e disponibilidade pequena de padrões. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir de curva analítica externa de seis pontos (em triplicata) para ácido gálico (1,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$), rutina (1,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$) e quercetina (1,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$). Para todos os compostos, $r^2 \geq 0,997$, com limite de detecção de 1,4, 0,6 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$, e limite de quantificação de 4,2, 1,8 e 2,3 $\mu\text{g/mL}$, de ácido gálico, rutina e quercetina, respectivamente. Foram separados 26 compostos fenólicos, sendo 19 identificados e 7 não identificados nas quatro frutas estudadas do gênero *Spondias*. Foram separados 16 compostos fenólicos em cajá, sendo que 12 (11 ácidos fenólicos e 1 flavonol) puderam ser identificados por LC-MS/MS e 4 não foram identificados. Em cajá, os compostos fenólicos majoritários foram rutina representando 48% do total e o ácido (4 ou 5) 3-*O*-*p*-cumaroilquinico com o equivalente a 7% do valor total de compostos fenólicos. Em umbu-cajá foram separados 9 picos, sendo 4 não identificados, 4 pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos e 1 flavonol, e compostos fenólicos majoritários foram a rutina que contribuiu com 50% do total de compostos fenólicos e o pico não identificado 3 contribuindo com um total de 25% do total de compostos fenólicos. Em umbu foram separados apenas 4 picos, sendo 2 ácidos fenólicos, 1 flavonol e 1 não identificado, com rutina contribuindo com 76% e o pico não identificado 3 com 16% do teor total de compostos fenólicos. Em seriguela foram separados 10 picos, sendo 5 ácidos fenólicos, 2 flavonóis e 3 picos não identificados, os compostos majoritários foram galoil-HHDP-hexosideo 2 e rutina, contribuição com 39% e 15% do teor total de compostos fenólicos, respectivamente.

A bioacessibilidade de carotenoides foi avaliada em bebidas obtidas com polpa congelada de cajá, tendo em vista que, a polpa congelada de cajá é

amplamente comercializada em todo o território nacional e, dentre as espécies de frutos do gênero *Spondias* é a mais apreciada e difundida. As bebidas foram preparadas com 50% de polpa congelada de cajá e 50% de água Milli-Q (BW) ou 50% leite integral (BWM) ou 50% leite desnatado (BSM), acrescidas ou não de 7,0 g açúcar refinado/100 mL, obtendo a polpa de cajá com água e açúcar (BWS), a polpa de cajá com leite integral e açúcar (BWMS) e a polpa de cajá com leite desnatado e açúcar (BSMS). O protocolo de digestão *in vitro* não alterou o perfil dos carotenoides das bebidas preparadas com polpa congelada de cajá. Todas as xantofilas livres foram mais bioacessíveis do que os carotenos e os ésteres de xantofilas nas bebidas, e as xantofilas livres (all-*E*)-luteína e (all-*E*)-zeaxantina foram as que apresentaram os maiores percentuais de bioacessibilidade nas bebidas. A bioacessibilidade da (all-*E*)-luteína e (all-*E*)-zeaxantina foram, respectivamente, de 12 e 7% na BW, de 20 e 9% na BWS, de 25 e 12% na BSM, de 31 e 13% na BSMS, de 31 e 20% na BWM e de 35 e 22% na BWMS. O aumento da bioacessibilidade dos carotenoides presentes nas bebidas acompanhou o aumento da quantidade de lipídios existentes no leite, respeitando a ordem BW < BSM < BWM, provavelmente porque os lipídios contribuem para a formação de micelas no processo digestivo, que foram utilizados no final da digestão para mensurar o percentual de bioacessibilidade. A adição de açúcar às bebidas aumentou a bioacessibilidade de carotenoides de uma forma geral na seguinte ordem BWMS < BSMS < BWS. Quando comparamos as bebidas com mesma base de preparo apenas com as acrescidas de açúcar vemos que o percentual no aumento de bioacessibilidade é maior para aquelas que possuem açúcar e, apesar de não sabermos a causa da influência positiva do açúcar no processo de digestão, aparentemente ocorreu favorecimento na formação de micelas ou na separação do sobrenadante.

CONCLUSÃO GERAL

Em todas as espécies estudadas, os carotenoides majoritários livres foram (all-*E*)-luteína, (all-*E*)- β -criptoxantina e (all-*E*)- β -caroteno, e os principais ésteres identificados foram (all-*E*)- β -criptoxantina miristato e (all-*E*)-zeinoxantina estearato. A contribuição dos ésteres de carotenoides em relação ao conteúdo total de carotenoides nas espécies de *Spondias* estudadas foi de 36 %, 23 %, 29 % e 37 % em cajá (*Spondias mombin* L.), umbu (*Spondias tuberosa*), umbu-cajá (*Spondias* spp.) e seriguela (*Spondias purpurea* L.), respectivamente.

Foram separados 26 compostos, e dos 19 compostos fenólicos identificados, 17 pertencem à classe dos ácidos fenólicos e 2 à classe dos flavonóis. Em amostras de cajá foram identificados 11 ácidos fenólicos e 1 flavonol, em umbu foram identificados 2 ácidos fenólicos e 1 flavonol, em umbu-cajá foram identificados 4 ácidos fenólicos e 1 pertencente à classe dos flavonóis, e em seriguela foram identificados 5 compostos fenólicos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos e 2 à dos flavonóis. A rutina foi o composto fenólico majoritário em cajá, umbu e umbu-cajá, e galoil-HHDP-hexosídeo 1 foi o composto fenólico majoritário em seriguela.

No estudo de bioacessibilidade, os carotenoides livres e ésteres de carotenoides foram mais bioacessíveis nas bebidas obtidas com polpa congelada de cajá e adicionadas de leite integral em relação às bebidas feitas com leite desnatado e água. O maior percentual de gordura no leite integral contribuiu para o aumento da bioacessibilidade de carotenoides. A adição de açúcar às bebidas reforçou o aumento da bioacessibilidade que seguiu o mesmo padrão quando comparada com as bebidas sem a adição de açúcar. Os valores de bioacessibilidade seguiram a seguinte tendência: xantofilas livres foram maiores que os dos ésteres de xantofilas e que os dos carotenos, independentemente da composição da bebida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adedeji, J., Hartman, T. G., Rosen, R. T., & Ho, C. T. (1991). Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombins* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1494-1497.

Agra, M. D. F., Freitas, P. F. D. & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 114-140.

Allegrone, G., & Barbeni, M. (1992). Identification of volatile components of caja fruit (*Spondias lutea* L.) and chiral analysis of 3-hydroxy aliphatic esters. *Flavour and Fragrance Journal*, 7, 337-342.

Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A. & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15.

Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A. & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155-2159.

Alves, R. E.; Brito, E. S.; Rufino, M. S. M. & Sampaio, C. G. (2008). Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. *Acta Horticulturae*, 773, 299-305.

Ambrósio, C. L. B., Campos, F. D. A. C. & Faro, Z. P. D., (2006). Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. *Revista de Nutrição*, 19, 233-243.

Angelo, P. M. & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impresso), 66, 1-9.

Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G. & Lamuela-Raventos, R. M. (2010). Phenolic compounds:

Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, 53-80.

Bachelier, J. B., & Endress, P. K. (2009). Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (*Sapindales*), with a special focus on gynoecium structure and evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159, 499–571.

Bailão, E. F. L. C., Devilla, I. A., da Conceição, E. C. & Borges, L. L. (2015). Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. *International journal of Molecular Sciences*, 16, 23760-23783.

Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 583-600.

Basu, S. (1980). Some structural studies on degraded *Spondias dulcis* gum. *Carbohydrate Research*, 81, 200-201.

Bauerfeind, J. C., (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogous in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 456-473.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101-110.

Berni, P. R. A., Chitchumroonchokchai, C., Brazaca, S. G. C., & Failla, M. L. (2014). Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato cooked according to home styles compared to highly processed baby foods. In: Bioavailability, Foz do Iguaçu. *Nutrire: Revista Sociedade Brasileira Alimentos e Nutrição*, 39,1-57.

Biehler, E., Kaulmann, A., Hoffmann, L., Krause, E., & Bohn, T. (2011). Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 125, 1328-1334.

Bystrom, L. M., Lewis, B. A., Brown, D. L., Rodriguez, E., & Obendorf, R. L. (2008). Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry*, 111, 1017-1024.

Borges, S. V., Maia, M. C. A., Gomes, R. C. M., & Cavalcanti, N. B. (2007). Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. *Quimica Nova*, 30, 49-52.

Braga R., (2001). Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fundação Guimarães Duque, *Coleção Mossoroense*, 1204.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Brown, E. M., McDougall, G. J., Stewart, D., Pereira-Caro, G., González-Barrio, R., Allsopp, P. & Gill, C. I. (2012). Persistence of anticancer activity in berry extracts after simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *PLOS ONE*, 7, e49740.

BRASIL, Instrução Normativa, nº 1 de 7 de janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2000.

Breithaupt, D. E., (2007). Modern application of xanthophylls in animal feeding—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 501-506.

Breithaupt, D. E., Wirt, U., & Bamedi, A., (2002). Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 66-70.

Breithaupt, D. E., & Bamedi, A. (2002b) Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): new insights into an ancient vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7175-7181.

Britton G., Liaaen-Jensen S., & Pfander H., (2009). Carotenoids; Vol. 5: *Nutrition and health*, Birkhauser: Verlag, Basel, Boston, Berl.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids – *Handbook*. Basel: Birkhauser.

Britton, G. (1995). Carotenoids, spectroscopy (v. 1B). in G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander (Eds), UV/visible spectroscopy. Basel: Birkhauser, p.13-62.

Bunea, A., Socaciu, C., & Pintea, A. (2014). Xanthophyll esters in fruits and vegetables. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 310.

Carvalho, J. M., Maia, G. A., da Fonseca, A. V. V., de Sousa, P. H. M., & Rodrigues, S. (2015). Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1182-1187.

Carvalho, R. S., Soares Filho, W. S., & Ritzinger, R. (2010). Umbu-cajá como repositório natural de parasitoide nativo de moscas-das-frutas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45, 1222-1225.

Carvalho, H. W. L., Leal, M. L. S., Santos, M. X., Cardoso, M. J., Monteiro, A. A. T., & Tabosa, J. N. (2000). Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho do Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 1115-1123.

Carvalho, P. C. L., Ritzinger, R., Filho, W. S. S., & Ledo, C. A. S. (2008). Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de populações de umbu-cajazeira do estado da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 140-147.

Cavalcanti, N. D. B., Resende, G. M., & Brito, L. D. L. (2002). Levantamento da produção de xilopódios e os efeitos de sua retirada sobre a frutificação e

persistência de plantas nativas de imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). *Ciência e Agrotecnologia*, 26, 927-942.

Cavalcanti, N. B., Resende, G. M., & Brito, L. T. L. (2001). Emergência e crescimento de plântulas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) em diferentes substratos. EMBRAPA–CPATSA (*Boletim de Pesquisa*), 58, 19.

Cavalcanti, N. B., Lima, J. B., Resende, G. M., & Brito, L. T. L. (2000). Ciclo reprodutivo do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) no semiárido do Nordeste brasileiro. *Revista Ceres*, 47, 421–439.

Cavalcanti, N. D. B., Resende, G. D., & Brito, L. D. L. (1999). Desenvolvimento do imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) na região semi-árida do Nordeste brasileiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 23, 212-213.

Ceva-Antunes, P. M. N., Bizzo, H. R., Alves, S. M., & Antunes, O. A. C. (2003). Analysis of volatile compounds of taperebá (*Spondias mombin* L.) and cajá (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and solid phase microextraction (SPME). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1387-1392.

Chappell, J. (1995). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*, 107, 1-6.

Chiste, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5884-5892.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.

Clydesdale, F. M., (1993). Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 83-101.

Coimbra, M. C., & Jorge, N. (2013). Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and fatty acids present in oils extracted from palm fruits. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 31, 309-320.

Colle, I. J., Van Buggenhout, S., Lemmens, L., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2012). The type and quantity of lipids present during digestion influence the in vitro bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Research International*, 45, 250-255.

Cole, M. M. (1960). Cerrado, caatinga and pantanal: the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. *The Geographical Journal*, 126, 168-179.

Correia, R. T., Borges, K. C., Medeiros, M. F., & Genovese, M. I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18, 539-547.

Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville. *American Society of Plant Physiologist*, 1250-1318.

Cunningham Jr, F. X. & E. Gantt. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49, 557-583.

da Silva, G. A., de Brito, N. J. N., dos Santos, E. C. G., Lópes, J. A., & das Graças Almeida, M. (2014). Gênero Spondias: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 10, 27-41.

da Silva, A. R. A., de Moraes, S. M., Mendes Marques, M. M., de Oliveira, D. F., Barros, C. C., De Almeida, R. R., Vieira, I. G. P. & Guedes, M. I. F. (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharmaceutical Biology*, 50, 740-746.

da Silva Junior, J. F., Bezerra, J. E. F., Lederman, I. E., Alves, M. A., & de Melo Neto, M. L. (2004). Collecting, ex situ conservation and characterization of “cajá-umbu” (*Spondias mombin* × *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 343-349.

de Barros Gomes, E., Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., de Miranda, R. D. C. M., Nigam, N., & Narain, N. (2013). A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3,1.

Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4303-4310.

Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2016). Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, 199, 165-175.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.

de Faria, A. F., Hasegawa, P. N., Chagas, E. A., Pio, R., Purgatto, E., & Mercadante, A. Z. (2009). Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 196-203.

de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 347-352.

de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007a). HPLC–PDA–MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9135-9141.

de Souza Almeida, C. C., De Lemos Carvalho, P. C., & Guerra, M. (2007). Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155, 541-547.

Dixon, R. A., & Harrison, M. J. (1990). Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, 28, 165-234.

Domareski, J. L., Bandiera, N. S., Sato, R. T., Aragon-Alegro, L. C., & Santana Elsa Helena, W. D. (2010). Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60, 26.

Dornas, W. C., Oliveira, T. T. D., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F. D., & Nagem, T. J. (2009). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28, 241-249.

Engels, C., Gräter, D., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, 46, 557-562.

Erdman, J. W., Bierer, T. L., & Gugger, E. T. (1993). Absorption and transport of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691, 76-85.

Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., & Ishida, B. K. (2008). *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *The Journal of Nutrition*, 138, 482-486.

Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., & Christou, P. (2010). Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science*, 179, 28-48.

Fernandez-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2013). Carotenoid profiling in tubers of different potato (*Solanum* sp) cultivars: Accumulation of carotenoids mediated by xanthophyll esterification. *Food Chemistry*, 141, 2864-2872.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.

Fernandes, T. K., Figueiredo, R. M., Queiroz, A. J. M., Melo, K. S. & Bezerra, M. C. T. (2008). Estudo do comportamento reológico da polpa de umbu-cajá em função da concentração de maltodextrina. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 10, 171-180.

Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS n. *Food Chemistry*, 127, 807-821.

Folegatti, M. I. S., Matsuura, F. C. A. U., Cardoso, R. L., Machado, S. S., Rocha, A. S., & Lima, R. R. (2003). Aproveitamento industrial do umbu: processamento de geleia e compota. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 1308-1314.

Fu, H., Xie, B., Fan, G., Ma, S., Zhu, X., & Pan, S. (2010). Effect of esterification with fatty acid of β -cryptoxanthin on its thermal stability and antioxidant activity by chemiluminescence method. *Food Chemistry*, 122, 602-609.

Gachet, M. S., Lecaro, J. S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Muñoz, R. A., Bauer, R. & Schühly, W. (2010). Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 184-197.

Gauthier-Jaques, A., Bortlik, K., Hau, J., & Fay, L. B. (2001). Improved method to track chlorophyll degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1117-1122.

Genovese, M. I., Pinto, M. S., Gonçalves, A. E. S. S., & Lajolo, F. M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14, 207-214.

Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., & Murillo, E. (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70, 163-172.

Giuffrida, D., Torre, G., Dugo, P., & Dugo, G. (2013). Determination of the carotenoid profile in peach fruits, juice and jam. *Fruits*, 68, 39-44.

Giuffrida, D., Pinteá, A., Dugo, P., Torre, G., Pop, R. M., & Mondello, L. (2012). Determination of Carotenoids and their Esters in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS. *Phytochemical Analysis*, 23, 267-273.

Gomes, E. B., Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., Miranda, R. C. M., Nigam, N., & Narain, N. (2013). A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 1-10.

Gomes, F. D. S. (2007). Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição*, 20, 537-548.

Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4666-4674.

Gondim, P. J., de M Silva, S., Pereira, W. E., Dantas, A. L., Chaves Neto, J. R., & dos Santos, L. F. (2013). Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17, 1217-1221.

Gouveia-Figueira, S. C., & Castilho, P. C. (2015). Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*, 73, 28-40.

Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B. & Jiménez-Colmenero, F., (2010). Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 120, 741-748.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344, 721-724.

Hamano, P. S., & Mercadante, A. Z. (2001). Composition of carotenoids from comercial products of cajá (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition Analysis*, 14, 335-343.

Harang, B. *U.S. Patent No. 6,110,478*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2000.

Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, 7, 907.

Hollander, D., & Ruble, P. E. (1978). Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 235, 686-691.

Hornero-Méndez, D., Gómez-Ladrón de Guevara, R., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3857-3864.

Huang, S. C., Hung, C. F., Wu, W. B., & Chen, B. H. (2008). Determination of chlorophylls and their derivatives in *Gynostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 105-112.

King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 213-218.

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.

Kozioł, M. J., & Macía, M. J. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). *Economic Botany*, 52, 373-380.

Lins Neto, E. M. D. F. L., Peroni, N., & de Albuquerque, U. P. (2010). Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi–arid region of Northeastern Brazil. *Economic Botany*, 64, 11-21.

Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S-520S.

Lipkie, T. E., De Moura, F. F., Zhao, Z. Y., Albertsen, M. C., Che, P., Glassman, K., & Ferruzzi, M. G. (2013). Bioaccessibility of carotenoids from transgenic provitamin A biofortified sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5764-5771.

Lira Júnior, J. S. D., Musser, R. D. S., Lederman, I. E., & Martins, L. S. (2008). Variabilidade entre genótipos de um banco de germoplasma de cajá-umbuzeiro (*Spondias* spp.) na Zona da Mata de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 3, 116-120.

Lira Júnior, J. S., dos Santos Musser, R., de Almeida Melo, E., Sucupira Maciel, M. I., Lederman, I. E., & dos Santos, V. F. (2005). Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias* spp.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 757-761.

Mariutti, L. R., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Mercadante, A. Z. (2014). The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. *Food Research International*, 64, 618-625.

Mariutti, L. R., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 155-160.

Martin, F. W., Campbell, C. W., & Ruberte, R. M. (1987). Perennial Edible Fruits of the Tropics: An Inventory. Agriculture Handbook No. 642. *United States Department of Agriculture*. Washington DC, USA, 252.

Matteo, V., & Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2, 95-107.

McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005) Anthocyanins from red wine their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.

Melo, E., A. & Andrade, R. A. M. S. (2010). Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. *Alimentos e Nutrição*, 21, 453-457.

Mendes, B. V. (1990). Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.): importante fruteira do semi-árido. Coleção Mossoroense. Serie C (Brasil), 564, 63.

Mercadante, A. Z. (2008). Food colorants: chemical and functional properties. In: C. Socaciu (Ed.) Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage, 213-240. New York: CRC Press.

Miller, A., & Schaal, B. (2005). Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12801-12806.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A., (2014). Standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Function*, 5, 1113–1124.

Minguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Mendez, D. (1994). Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 640-644.

Mitchell, J. D., & Daly, D. C., (2015). A Revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the neotropics. *PhytoKeys*, 55, 1–92.

Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., Vervoort, J., & Ric de Vos, C. H. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, 141, 1205-1218.

Moreira, A. C. C. G., Nascimento, J. D. A. M., de Sena Andrade, R. A. M., Maciel, M. I. S., & de Almeida Melo, E. (2012). Bioactive phytochemicals in fruits from genotypes of "caja-umbuzeiras"/Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de caja-umbuzeiras. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 23, 235-242.

Moura, C. L. A.; Pinto, G. A. S. & Figueiredo, R. W. (2011). Processamento e utilização da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 29, 237-252.

Murillo, E., Meléndez-Martínez, A. J., & Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chemistry*, 122, 167-172.

Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

NAS-IOM., (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *National Academy Press*, Washington, 92.

Narain, N., Almeida, J. N., Galvão, M. S., Madruga, M. S., & Brito, E. S. (2004). Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, 24, 212-216.

Ness, A. R., & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26, 1-13.

Nishino H., Tokuda H., Satomi, Y., Masuda M., Bu P., Onozuka M., Yamaguchi S., Okuda Y., Takayasu J., Tsuruta J., Okuda M., Ichiishi E., Murakoshi M., Kato T., Misawa N., Narisawa T., Takasuka N. & Yano M., (1999). Cancer prevention by carotenoids, *Pure and Applied Chemistry*, 12, 2273–2278.

Omena, C. M. B.; Valentim, I. B.; Guedes, G. S.; Rabelo, L. A.; Mano, C. M.; Bechara, E. J. H.; Sawava, A. C. H. F.; Trevisan, M. T. S.; Costa, J. G.; Ferreira, R. C. S.; Sant'Ana, A. E. G., & Goulart, M. O. F. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits: antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*, 49, 334-344.

Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34, 1051-1056.

Olson, J. A. (1994). Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1011-1016.

Olson, J. A. (1999). Bioavailability of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49, 26-33.

Pakoussi, T., Kodjo, M. K., Metowogo, K., Lawson-Evi, P., Mouzou, A. P., Aklikokou, A. K., & Gbeassor, M. (2016). Évaluation des propriétés hémostatiques et hypocholestérolémiantes des feuilles de *Spondias mombin* L (Anacardiaceae). *Phytothérapie*, 14, 349-354.

Palmero, P., Lemmens, L., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2014). Role of carotenoid type on the effect of thermal processing on bioaccessibility. *Food Chemistry*, 157, 275-282.

Parker R. S. (1996). Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB Journal*, 10, 542-551.

Petry, F. C., & Mercadante, A. Z. (2016). Composition by LC-MS/MS of New Carotenoid Esters in Mango and Citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8207-8224.

Pérez-Gálvez, A., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2002). Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569, 31-34.

Pinto, W. D. S., Dantas, A. C. V. L., Fonseca, A. A. O., Ledo, C. A. D. S., Jesus, S. C. D., Calafange, P. L. P., & Andrade, E. M. (2003). Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 1059-1066.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4, 89.

Popenoe, J. (1980). The genus *Spondias* in Florida. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 92, 277-279.

Prado, D. E. (2000). Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinburgh Journal of Botany*, 57, 437-461.

Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.

Ramalho, S. A., Gualberto, N. C., Neta, M. T. S. L., Batista, R. A., Araújo, S. M., da Silveira Moreira, J. D. J., & Narain, N. (2014). Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 449-457.

Rique, A. B. R., Soares, E. D. A., & Meirelles, C. D. M. (2002). Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 8, 244-54.

Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016a). Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1457, 116-124.

Rodrigues, D. B., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2016b). An *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food & Function*, 7, 4992-5001.

Rodrigues, N. P., Salva, T. D. J. G., & Bragagnolo, N. (2015). Influence of coffee genotype on bioactive compounds and the *in vitro* capacity to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4815-4826.

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2014). *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice-and milk-based beverages. *Food Research International*, 62, 771-778.

Rodrigues, E., Mariutti, L. R., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3022-3029.

Rodrigues, K. F., & Hesse, M. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, 40, 261-267.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, p. 53-60.

Rufino, M. S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., & Brito, E. S. (2009). Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, 114, 693-695.

Saheed, S., Olatunde Taofik, S., Oladipo, A. E., Tom, O., & Anofi, A. (2017). *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae) enhances detoxification of hepatic and macromolecular oxidants in acetaminophen-intoxicated rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 2109-2117.

Santos, C. A. F., & Oliveira, V. R. (2008). Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 731-735.

Satpathy, G., Tyagi, Y. K., & Gupta, R. K. (2011). Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K. an exotic fruit of India. *Food Research International*, 44, 2076-2087.

Schweiggert, R. M., Vargas, E., Conrad, J., Hempel, J., Gras, C. C., Ziegler, J. U., Mayer, A., Jimenez, V., Esquivel, P., & Carle, R. (2016). Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow, orange, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry*, 200, 274-282.

Schweiggert, R. M., Kopec, R. E., Villalobos-Gutierrez, M. G., Högel, J., Quesada, S., Esquivel, P., Schwartz, S. J., & Carle, R. (2014). Carotenoids are more bioavailable from papaya than from tomato and carrot in humans: a randomised cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 111, 490-498.

Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2006). Xanthophylls in commercial egg yolks: quantification and identification by HPLC and LC-(APCI) MS using a C30 phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2267-2273.

- Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2005). Cryptoxanthin structural isomers in oranges, orange juice, and other fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6355-6361.
- Sentandreu, E., Cerdán-Calero, M., Halket, J. M. & Navarro, J. L. (2015). Rapid screening of low-molecular-weight phenols from persimmon (*Diospyros kaki*) pulp using liquid chromatography/UV–visible/electrospray mass spectrometry analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1648-1654.
- Seeram, N. P., Lee, R., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 97, 1-11.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC press*.
- Silva, B. M., Rossi, A. A. B., Tiago, A. V., Schmitt, K. F. M., Dardengo, J. F. E., & Souza, S. A. M. (2017). Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 16.
- Silva, G. A., Brito, N. J. N., Santos, E. C. G., López, J. A., & Almeida, M. G., (2014). Gênero *Spondias*: Aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Revista de Biologia e Farmácia* 10, 1.
- Silva, A. R. A., Morais, S. M., Marques, M. M. M., Oliveira, D. F., Barros, C. C., Almeida, R. R., Vieira, I. G. P. & Guedes, M. I. F., (2012a). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharmaceutical Biology* 50, 740–746.
- Silva, Q. J., MOREIRA, A. C. C. G., Melo, E. A. & Lima, V. L. A. G. (2012b). Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de cirigueiras (*Spondia purpurea* L.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 23, 73-80.

Silva, A. R. A., Morais, S. M., Marques, M. M. M., Lima, D. M., Santos, S. C. C., Almeida, R. R., Vieira, I. G. P., & Guedes, M. I. F. (2011). Antiviral activities of extracts and phenolic components of two Spondias species dengue vírus. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 1678-9199.

Silva, N. A. D., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2009). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5072-5084.

Silva, C. M. M. S., Pires, I. E., & Silva, H. D. (1987). Caracterização dos frutos do umbuzeiro. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 34, 17.

Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 398-416.

Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S., & Pasakdee, S. (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114, 955-961.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Sousa, C. D. M., Silva, H. R. Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. D., Araújo, D. S., & Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.

Soares, E. B., Gomes, R. L. F., Carneiro, J. G. M., Nascimento, F. N. d., Silva, I. C. V., & Costa, J. C. L. D. (2006). Caracterização Física e Química de Frutos de Cajazeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28, 518-519.

Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15.1, 71-81.

Subagio, A., Wakaki, H., & Morita, N. (1999). Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63, 1784-1786, 1999.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.

Tao, B., Ye, F., Li, H., Hu, Q., Xue, S., & Zhao, G. (2014). Phenolic profile and in vitro antioxidant capacity of insoluble dietary fiber powders from citrus (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) pomace as affected by ultrafine grinding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7166-7173.

Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Deliza, R., de Oliveira Godoy, R. L., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, 44, 2326-2331.

van Breemen, R. B., Canjura, F. L., & Schwartz, S. J. (1991). Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 39, 1452-1456.

Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., & Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Food and Agriculture*, 80, 880-912.

Van Het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., & Hautvast, J. G. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 130, p. 503-506.

Van Het Hof, K. H., Brouwer, I. A., West, C. E., Haddeman, E., Steegers-Theunissen, R. P., van Dusseldorp, M., Weststrate, J. A., Eskes, T. K., & Hautvast, J. G. (1999)

Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. The *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 261-268.

Vannucchi, H., Cunha, D. F. D., Bernardes, M. M., & Unamuno, M. R. D. L. (1994). Avaliação dos níveis séricos das vitaminas A, E, C e B2, de carotenoides e zinco, em idosos hospitalizados. *Revista de Saúde Pública*, 28, 121-126.

Van Poppel, G. (1996). Epidemiological evidence for beta-carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 57-61.

Veda, S., Platel, K., & Srinivasan, K. (2007). Varietal differences in the bioaccessibility of β -carotene from mango (*Mangifera indica*) and papaya (*Carica papaya*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7931-7935.

Vermeris, W., & Nicholson, R. (2006). Isolation and identification of phenolic compounds. In *Phenolic Compound Biochemistry*, 151-196.

Vesconsi, C. N., Valduga, A. T., & Cichoski, A. J. (2012). Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. *Ciência Rural*, 42, 730-736.

Vieira, L. M., Sousa, M. S. B., Mancini-Filho, J., & Lima, A. D. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 888-897.

Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Domingos, L. D., & Viotto, W. H., (2012). Development and validation of a spectrophotometric method for determination of lutein colorant added to nonfat yogurt. *Química Nova*, 35, 2057-2062.

Zepka, L. Q., & Mercadante, A. Z. (2009). Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117, 28-34.

Zielinski, A. A. F., Ávila, S., Ito, V., Nogueira, A., Wosiacki, G., & Haminiuk, C. W. I. (2014). The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. *Journal of Food Science*, 79, C150-C516.

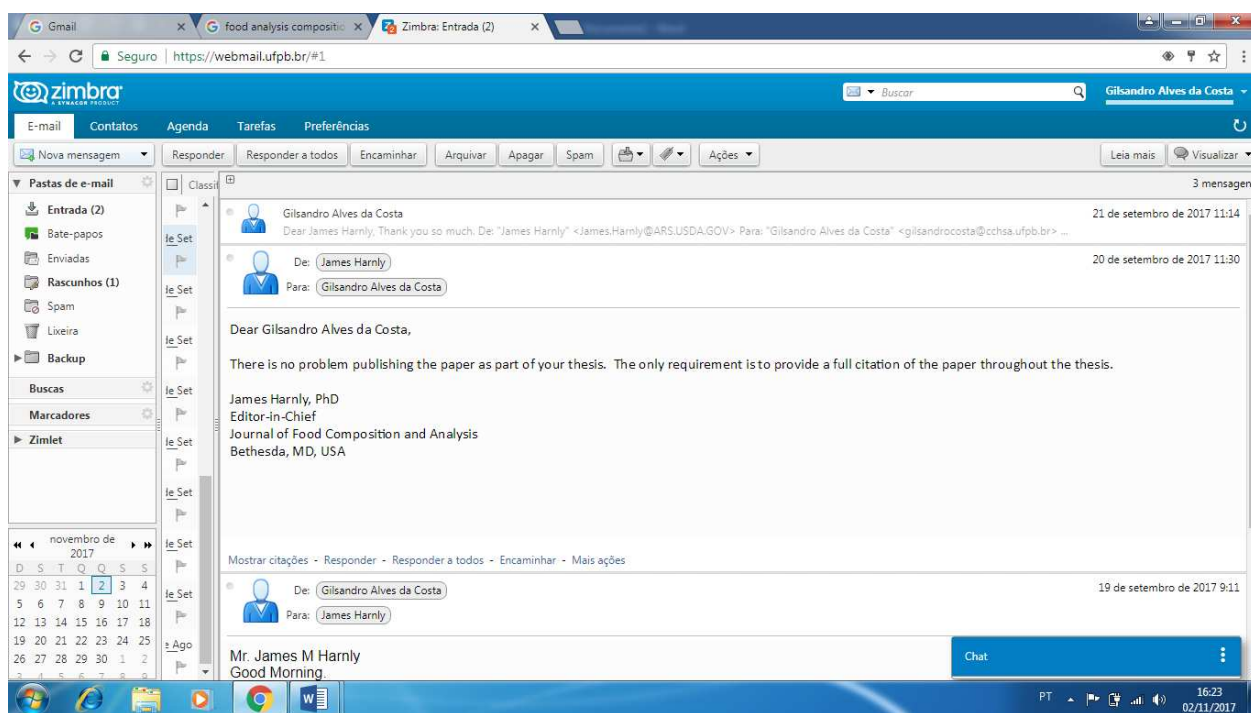
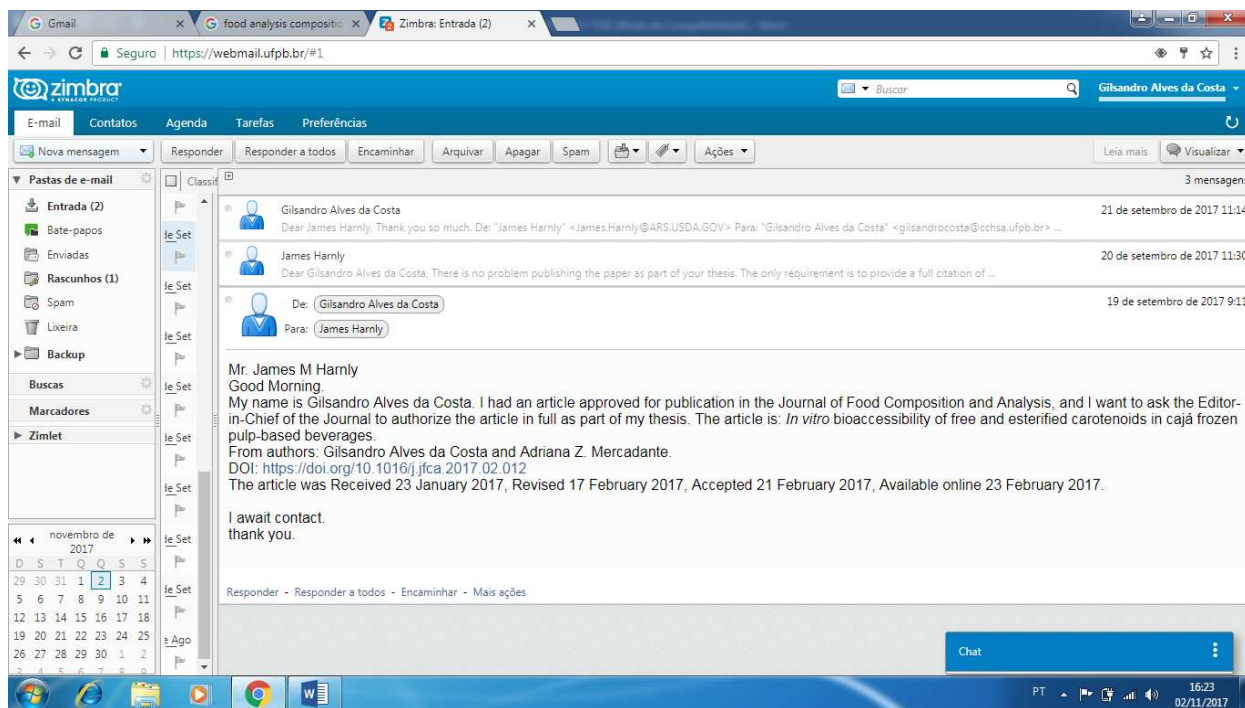
Walter, M. H. & Strack, D. (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28, 663-692.

Wannan, B. S. (2006). Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 51, 165-195.

Weisz, G. M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS n. *Food Chemistry*, 115, 758-765.

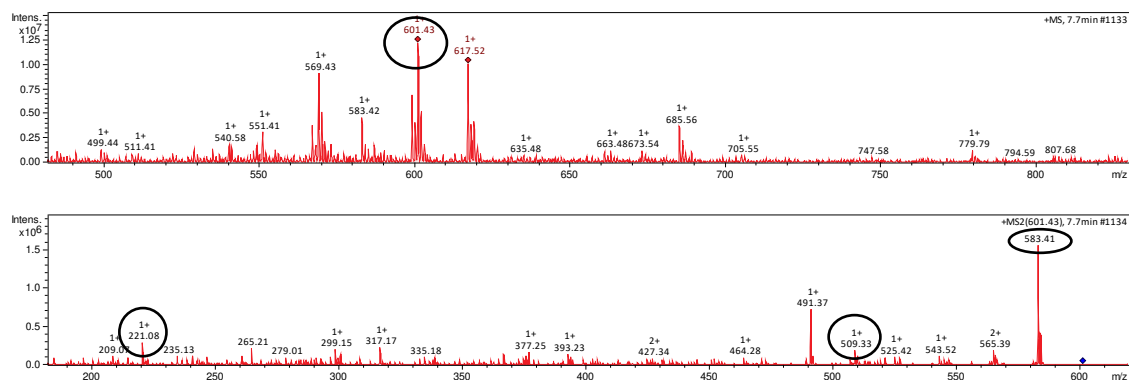
ANEXOS

Permissão para inclusão da versão final do artigo aceito para publicação

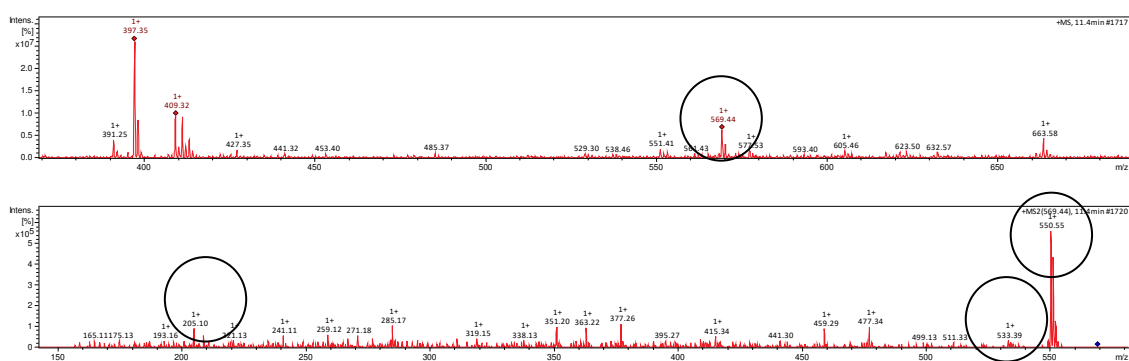


Espectro de massas de alguns carotenoides identificados no presente estudo

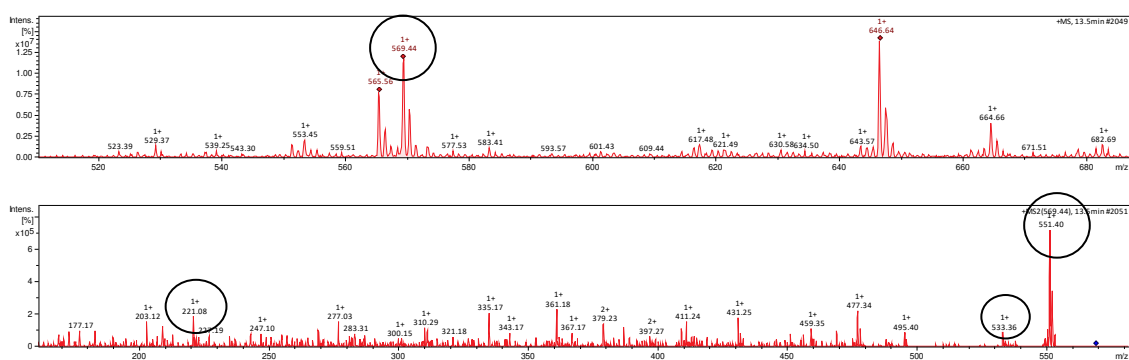
Auroxanthin or Neochrome



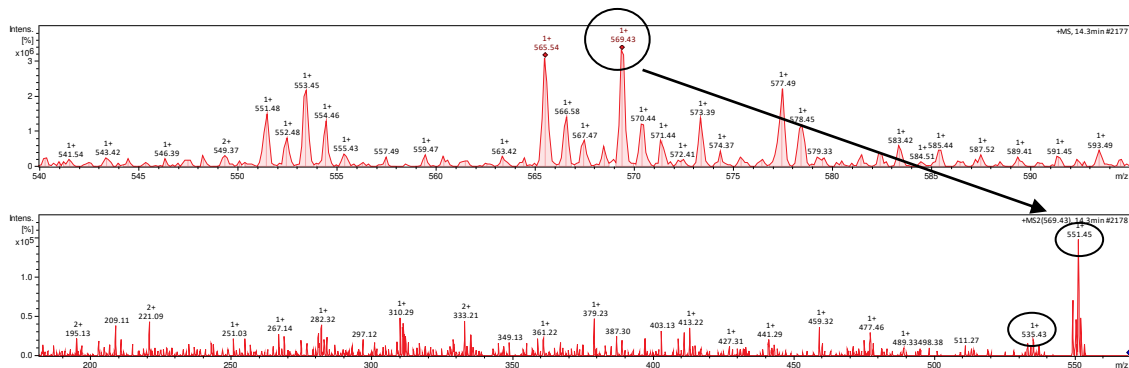
5',6'-ou 5',8'-epoxy- β -cryptoxanthin

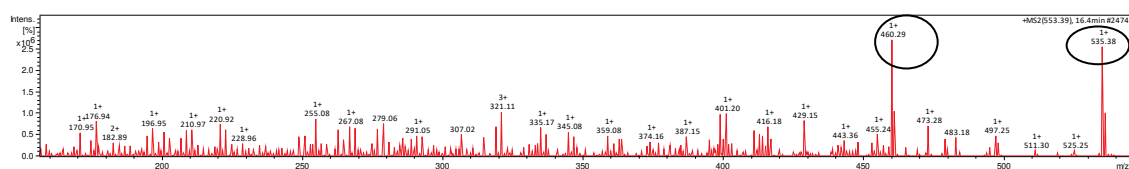
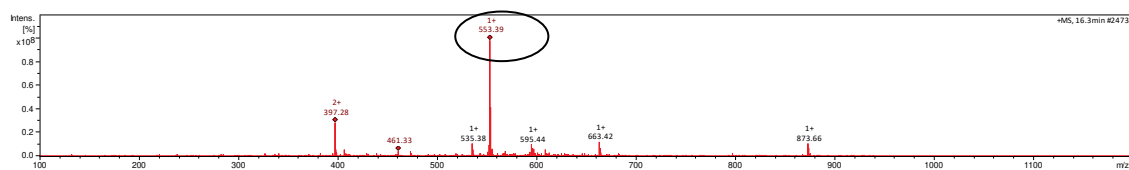
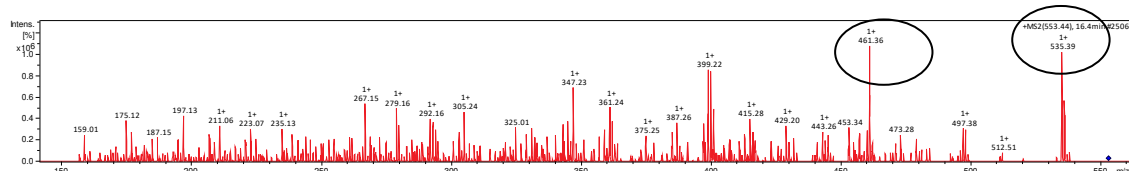
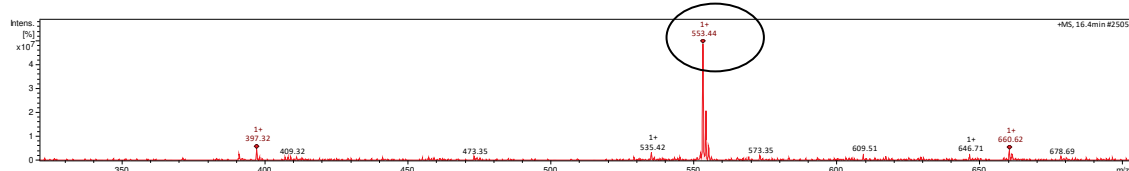
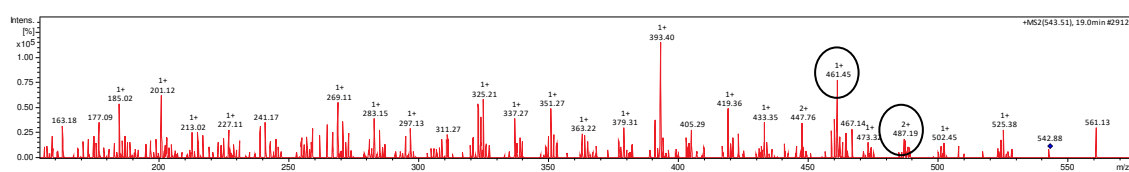
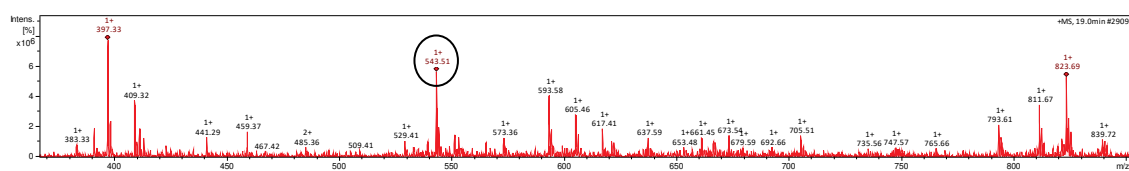
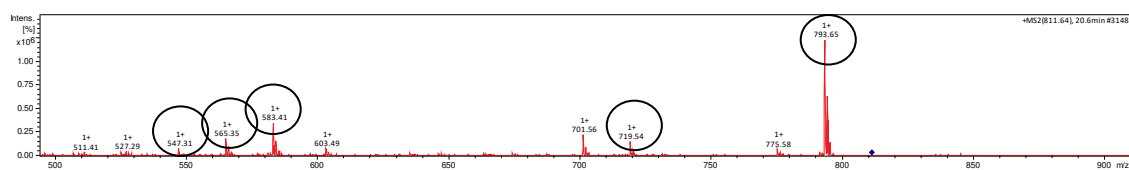
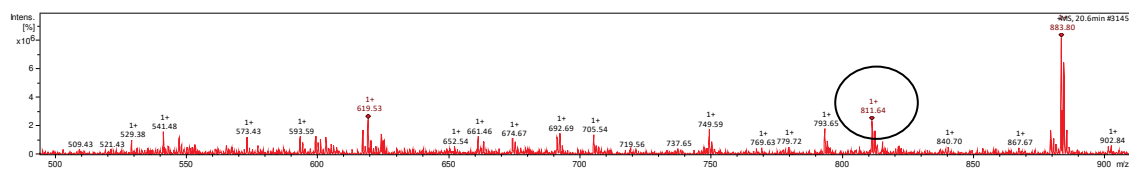


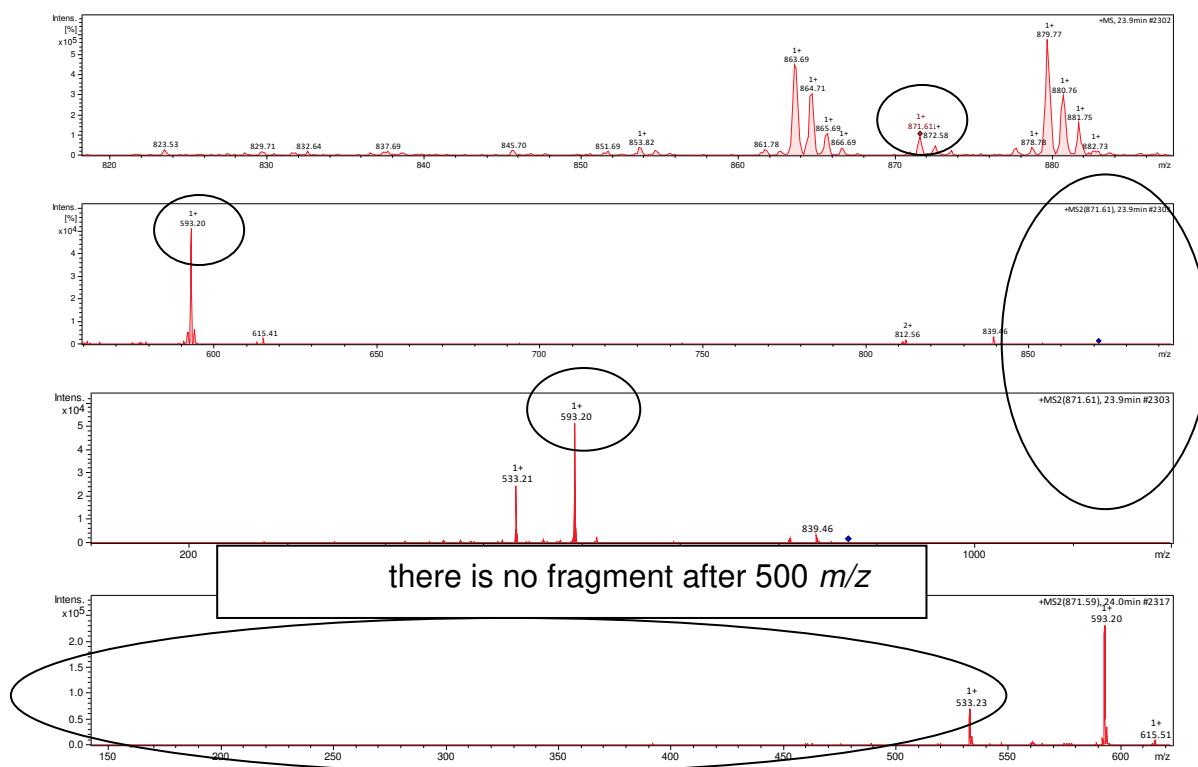
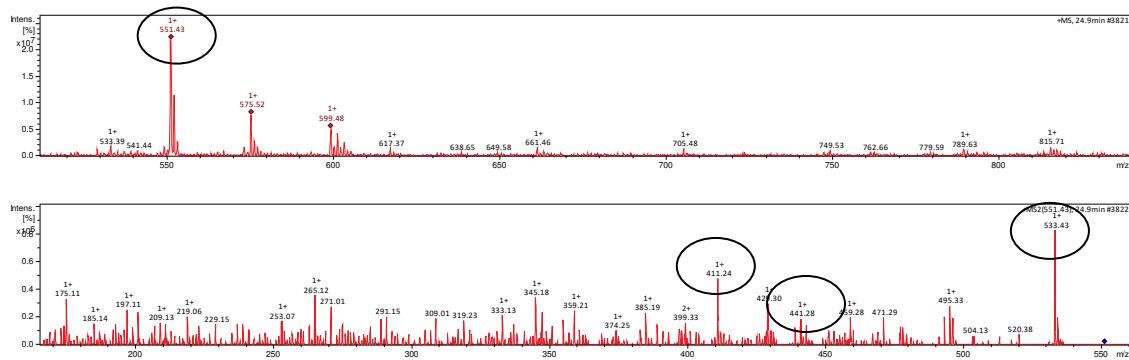
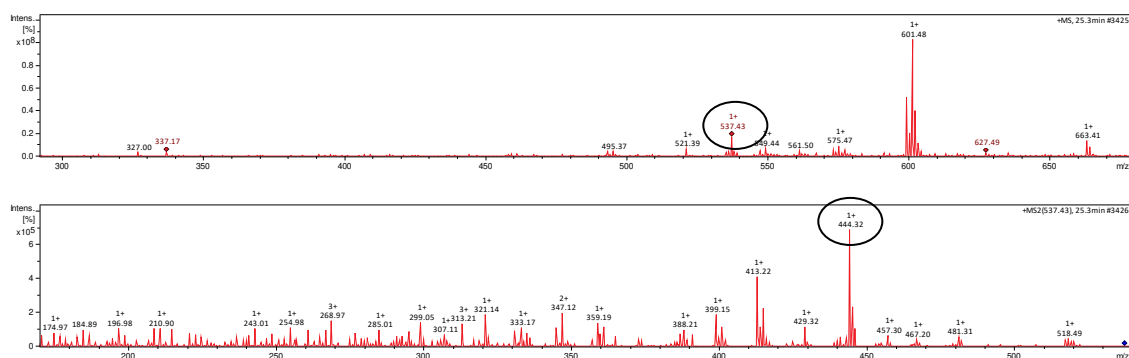
(Z)-5,8-epoxy- β -cryptoxanthin

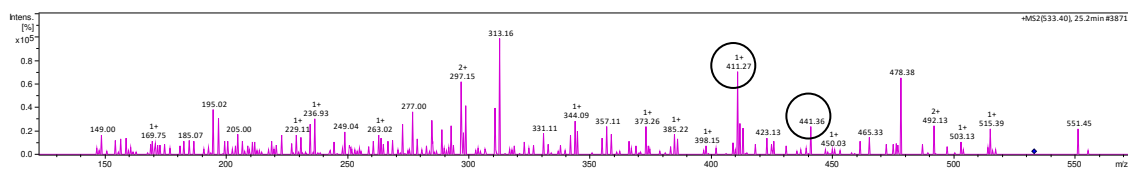
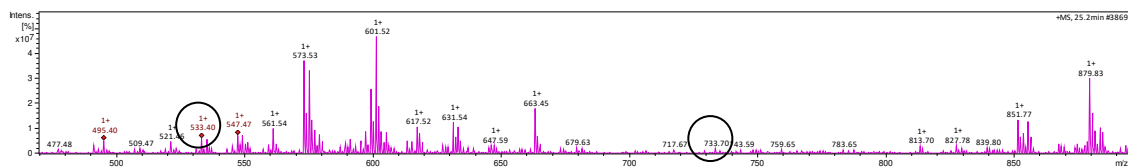
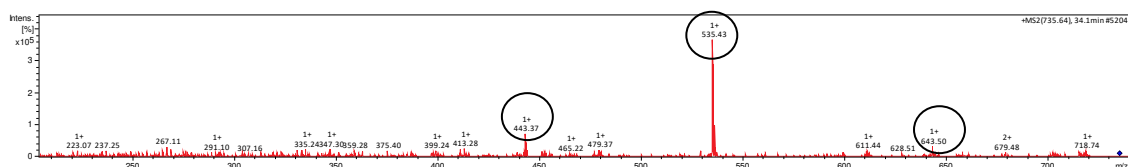
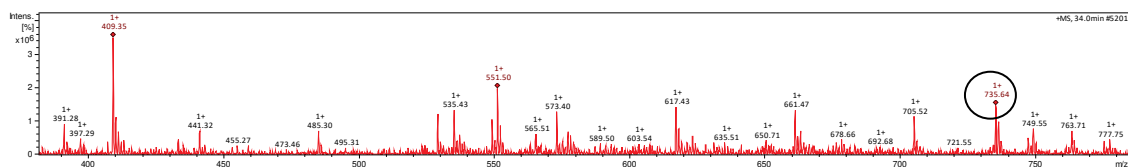
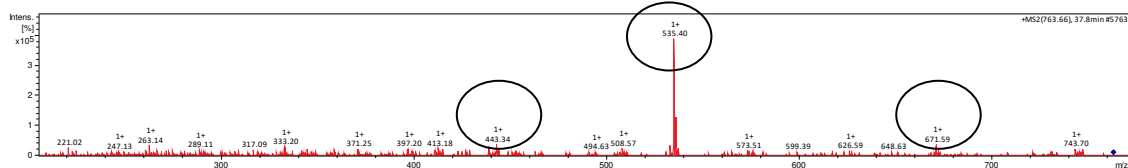
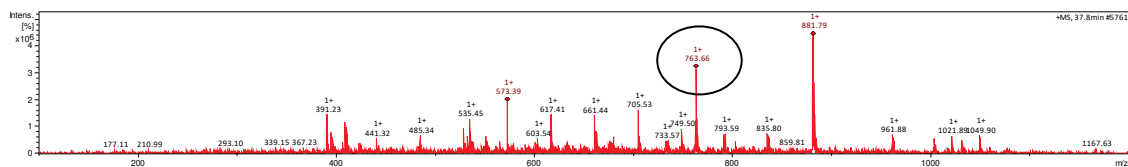
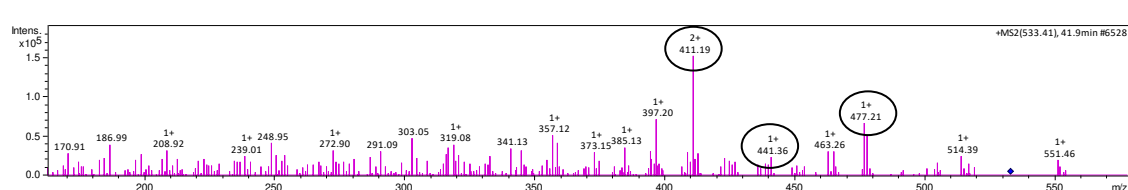
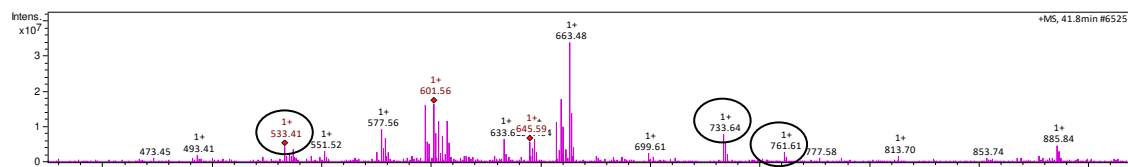


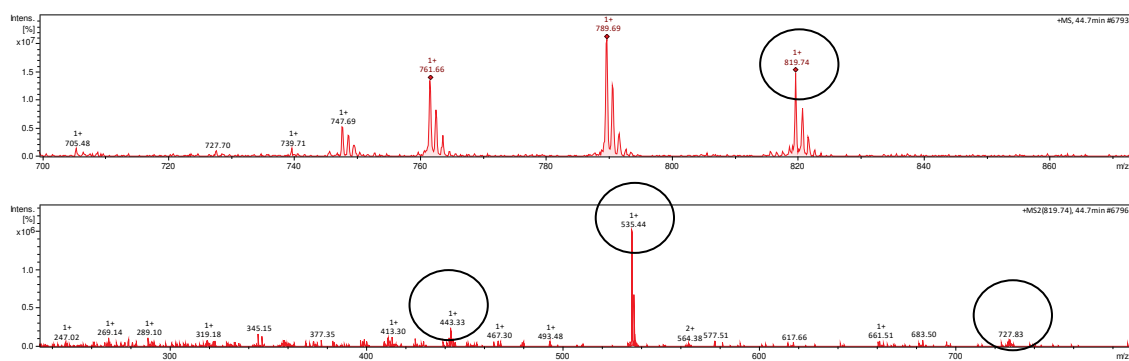
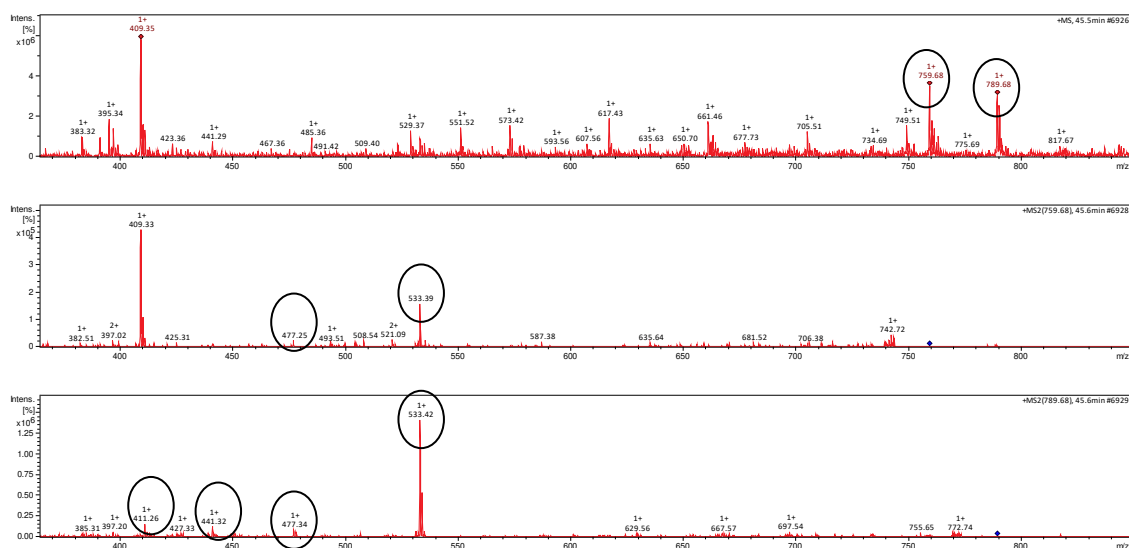
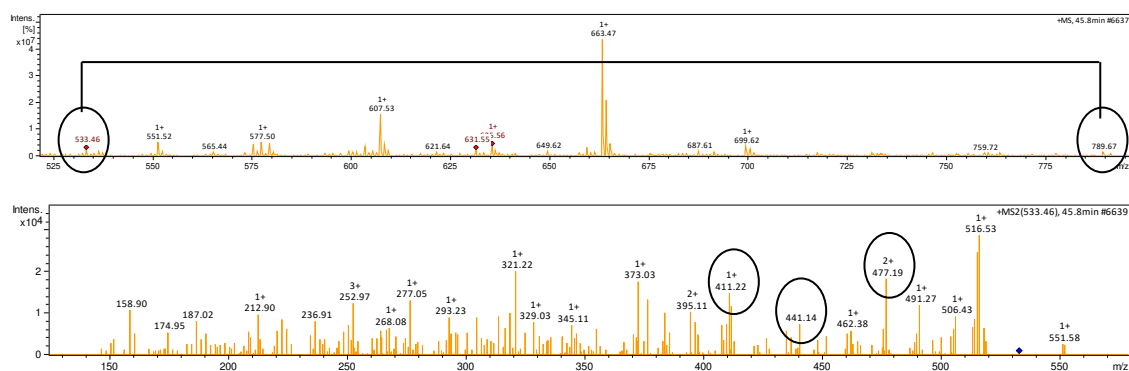
(all-E)-5,8-epoxy- β -cryptoxanthin

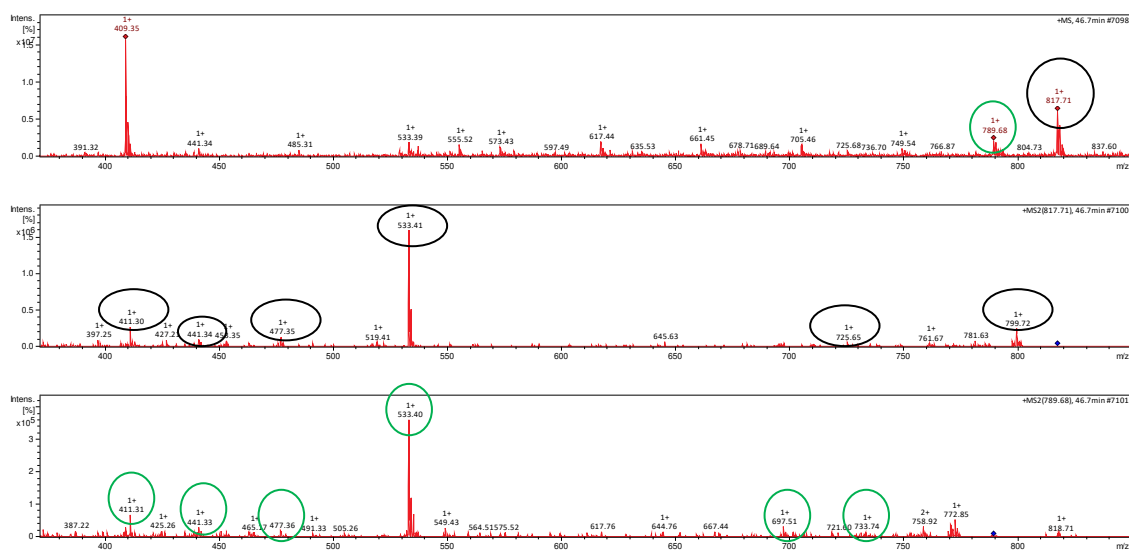


(all-E)-zeinoxanthin**(all-E)- β -cryptoxanthin****phytofluene****(all-E)-luteoxanthin myristate**

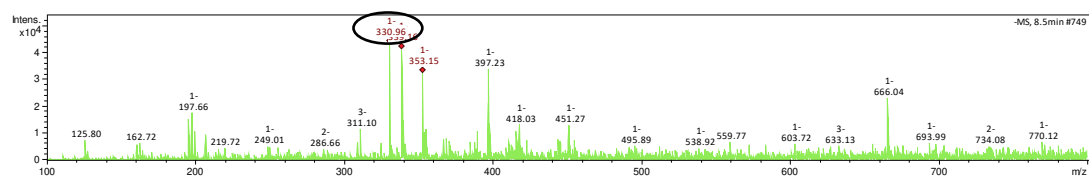
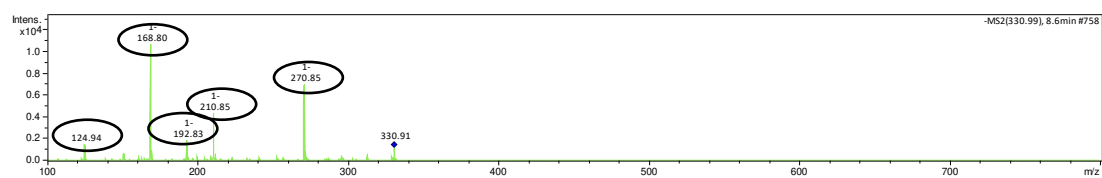
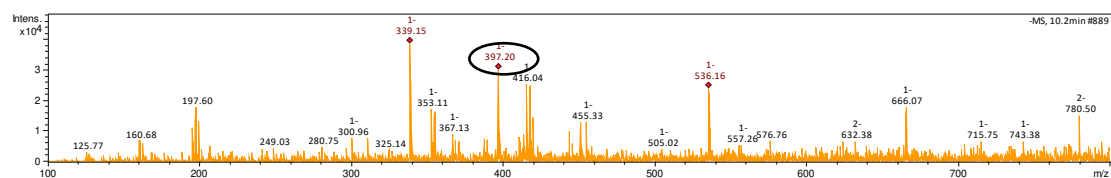
Pheophytin a**(all-E)-lutein-3'-O-laurate****(all-E)- α -carotene**

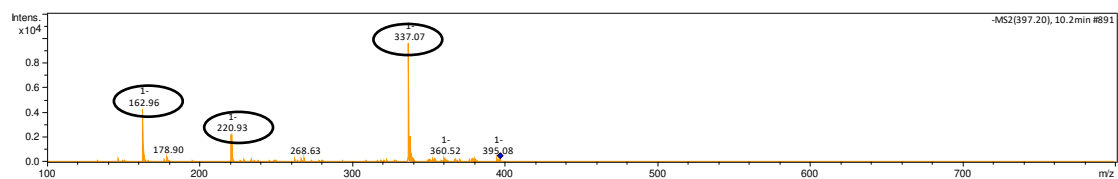
(all-E)-lutein-3-O-laurate**(all-E)-β-cryptoxanthin laurate****(all-E)-β-cryptoxanthin myristate****(all-E)-lutein-3-O-myristate-3'-O-laurate**

(all-E)-zeinoxanthin stearate**(all-E)-lutein-3-O- myristoleic-3'-O-palmitate****(all-E)-lutein dipalmitate**

(all-*E*)-lutein-3-*O*-stearate 3'-*O*-palmitate

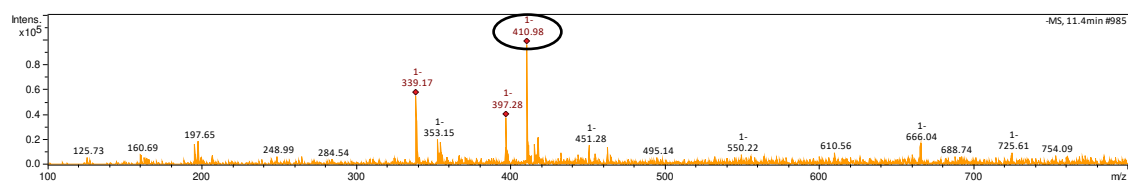
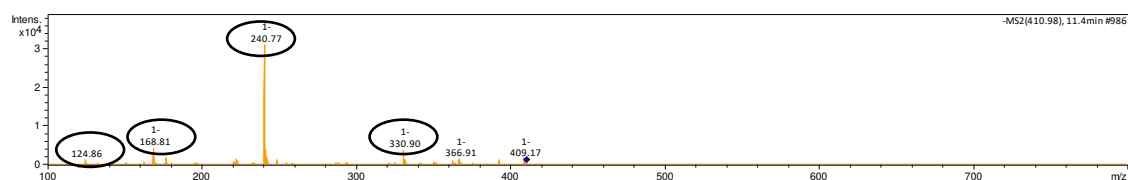
Espectro de massas de alguns compostos fenólicos detectados no presente estudo

Monogalol hexosídeo**MS****MS²****Derivado do ácido p-cumaroilquínico 2****MS**

MS^2 

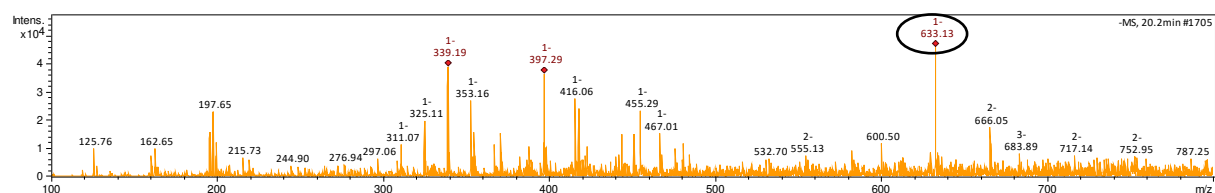
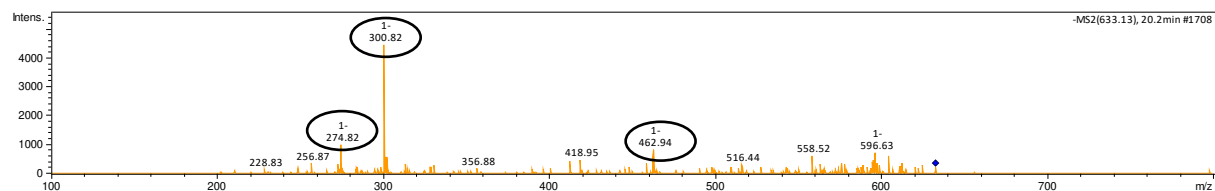
derivado do ácido gálico

MS

 MS^2 

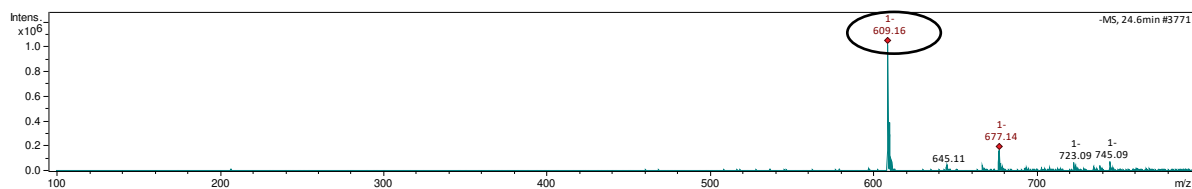
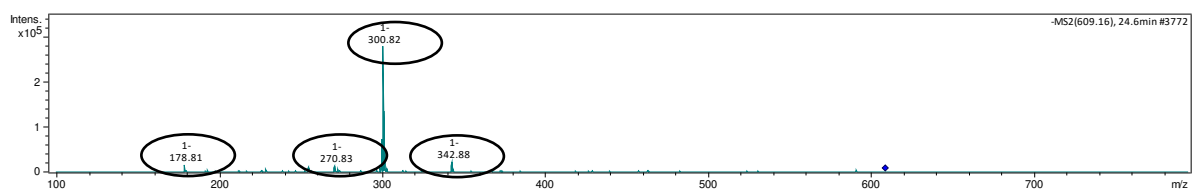
Galoi-HHDP-hexosídeo

MS

 MS^2 

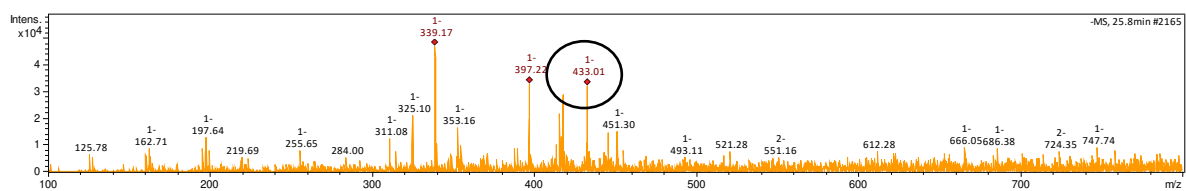
Rutina

MS

MS²

Ácido elágico pentosídeo

MS

MS²