



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ALINE GONZAGA CUNHA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DA ÁGUA DE COCO POR GC-MS, LC-MS E NMR**

**FORTALEZA**

**2019**

ALINE GONZAGA CUNHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DA ÁGUA DE COCO POR GC-MS, LC-MS E NMR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda  
Co-orientador: Dr. Edy Sousa de Brito.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C977a Cunha, Aline Gonzaga.  
Avaliação do efeito do processamento térmico na composição química da água de coco por GC-MS, LC-MS e NMR / Aline Gonzaga Cunha. – 2019.  
61 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda.  
Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.
1. Cocos nucifera. 2. esterelização. 3. quimiometria. 4. metabólitos. I. Título.

CDD 572

---

ALINE GONZAGA CUNHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DA ÁGUA DE COCO POR GC-MS, LC-MS E NMR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Edy Sousa de Brito (Co-orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

---

Prof. Dr. Elenilson de Godoy Alves Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Hélio Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Ao meu marido, Edson Correia Lima Neto.

A minha filha, Eloá Gonzaga Lima.

Aos meus pais, Aguinézio Raimundo da  
Cunha e Maria Gonzaga Cunha.

A minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força, determinação e discernimento para a realização deste trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Raquel Alcântara de Miranda por ter me orientado durante toda a pesquisa com seus ensinamentos e principalmente pela confiança depositada para realização deste trabalho, e por fim, pela oportunidade de tê-la como minha orientadora.

À CAPES, CNPQ e ao INCT-Frutos Tropicais pelo suporte financeiro.

À SEDUC, por disponibilizar meu afastamento para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará - UFC, pela minha formação desde a graduação, em particular ao Departamento Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado.

A Embrapa Agroindústria Tropical, na pessoa do chefe geral Lucas Antônio de Sousa Leite, por ter permitido o desenvolvimento dos meus estudos e por disponibilizar a infraestrutura do laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais para a realização deste experimento.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão, em especial aos meus pais, Maria Gonzaga Cunha e Aguinézio Raimundo da Cunha, e ao meu marido, Edson Correia Lima Neto, que participaram do meu processo de formação sempre me indicando os melhores caminhos, transmitindo-me confiança, coragem e fé em suas palavras.

Aos meus irmãos, Arisson Gonzaga Cunha, Amanda Gonzaga Cunha, Alana Gonzaga Cunha e minha cunhada Tereza Lima por me ajudarem a cuidar da minha filha na minha ausência.

Ao pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical Dr. Edy Sousa de Brito por tê-lo como meu co-orientador e por seu entusiasmo e profissionalismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Senhores participantes da banca examinadora por terem contribuído com suas valiosas considerações.

A equipe LABFRUTOS- Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos, pela harmoniosa convivência, disponibilidade e troca de conhecimentos e experiências, em especial, as minhas colegas Débora Samara e Amanda Germano.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho meu muito obrigada.

## RESUMO

A água de coco verde é uma bebida refrescante e bastante consumida, não apenas por suas qualidades sensoriais, mas também pelas suas funções nutricionais e terapêuticas. Sua composição rica em açúcares e sais minerais a torna um produto perecível, sujeito a contaminações microbianas e alterações bioquímicas durante a extração e envase do líquido. O aumento da escala produtiva do produto envasado estimula o desenvolvimento de processos que permitam aumentar sua vida de prateleira, minimizando as perdas sensoriais e nutricionais. Porém, o processamento industrial e/ou armazenamento da água de coco por um tempo prolongado podem resultar no desenvolvimento de uma coloração rosada impactando negativamente o seu valor comercial. Dessa forma, as análises de NMR, GC-MS e LC-MS aliadas a quimiometria foram aplicadas para entender as variações na composição química da água de coco fresca (controle) e processada termicamente. A água foi extraída de cocos da variedade anã e cultivar verde no estágio de maturação entre 6 e 7 meses. Dois tratamentos foram aplicados à água de coco e analisados: amostra controle e amostra processada termicamente por esterilização UHT a 110 °C por 8 s. A amostra processada apresentou cor rosa sob armazenamento. De acordo com a quimiometria, dímero do tipo-A e trímero de procianidinas, ácido palmítico, ácido esteárico, sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, frutose, etanol, valina, ácidos acético, málico e lático e outros seis compostos desconhecidos foram responsáveis pelas diferenças observadas entre os tratamentos. Esses compostos podem ser os responsáveis pelo desenvolvimento da cor rosa após o processamento e armazenamento da água de coco. Futuros isolamentos com a elucidação estrutural dos compostos que absorvem a 520nm e o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos na formação da cor irão esclarecer este problema encontrado no processamento da água de coco.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*. Processamento térmico. Quimiometria. Metabólitos.

## ABSTRACT

Green coconut water is a refreshing beverage that is consumed not only by its sensory qualities but also by its nutritional and therapeutic properties. Its composition rich in sugars and minerals becomes a perishable product, subject to microbiological contaminations and biochemical changes during the extraction and filling of the liquid. The increase in the productive scale of the product stimulates the development of processes that increase its shelf life, minimizing the sensorial and nutritional losses. However, industrial processing and / or prolonged storage of the coconut water can result in the development of a pink coloration adversely impacting its commercial value. Thus, NMR, GC-MS and UPLC-HRMS coupled to chemometrics were applied to understand variations in the chemical composition of fresh (control) and thermally processed coconut water. The water was extracted from the coconuts dwarf variety and green cultivar in the maturation stage between 6 and 7 months. Two samples were analyzed: one control and one sample thermally processed by UHT sterilization at 110°C for 8s. Samples processed presented pink color under storage. According to chemometrics, procyanidin A-type dimer and trimer, palmitic acid, stearic acid, sucrose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose, fructose, ethanol, valine, acetic, malic and lactic acids and six other unknown compounds were responsible for the differences observed between treatments. These compounds may be responsible for the pink color development after processing and storage of coconut water. Future isolations with the structural elucidation of the 520nm absorbing compounds and the understanding of the mechanisms action involved in color formation will clarify this problem found in processed coconut water

**Keywords:** *Cocos nucifera*. Sterilization. Chemometrics. Metabolites.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes do fruto do coqueiro .....	17
Figura 2 – Fluxograma de diferentes métodos de processamento da água de coco verde.	22
Figura 3 – Two-dimensional space plot for PC1 × PC2 scores coordinate system of the coconut water under negative ionization mode; b) relevant loading plotted in lines form .....	48
Figura 4 – Two-dimensional space plot for PC2 × PC3 scores coordinate system of the coconut water under positive ionization mode; b) loading plotted in lines form .....	50
Figura 5 – Two-dimensional space plot for PC1 × PC2 scores coordinate system of the coconut water; b) relevant loading plotted in lines form .....	53
Figura 6 – a) The classification results from the aliphatic region between the chemical shifts $\delta$ 0.8 and 3.0 illustrated by scores; b) relevant loadings; c) those from the carbinolic region between $\delta$ 3.0 and 5.5 by scores; d) loadings .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção e área colhida dos principais produtores de coco, em 2016 .....	16
Tabela 2 – Composição química da água do coco verde no 6º mês de desenvolvimento do fruto .....	19
Tabela 3 – Tentative peak (#) assignment identified by UPLC-HRMS in negative ion mode tentative of organic compounds from secondary metabolism of fresh and processed coconut water .....	49
Tabela 4 – Tentative peak (#) assignment identified by UPLC-HRMS in positive ion mode of the organic compounds from secondary metabolism of fresh and processed coconut water .....	51
Tabela 5 – Relevant volatile organic compounds detected in coconut water under different processing condition, with respective retention times (RT), experimental and reference retention index (RI), major $m/z$ peak, and percentage (%) of match .....	54
Tabela 6 – Primary metabolites identified by $^1\text{H}$ NMR of control and processed coconut water .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos Finais da Glicação Avançada
ALEs	Produtos Finais da Lipoxidação Avançada
Arg-p	Argipirimidina
CEL	N- $\epsilon$ -(carboxietil) lisina
CML	N- $\epsilon$ -(carboximetil) lisina
D <sub>2</sub> O	Deuterated water
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EI	Electron Ionization
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
ESI	Electrospray Ionization
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Free Induction Decay
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
gCOSY	Gradient Correlation Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHSQC	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjos Diodos
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kU	Quilograma unidades
LRI	Linear Retention Indexes
LV	latent variable
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MS <sup>E</sup>	Modo de baixa e alta energia de colisão
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis

Pento-s	Pentosidina
PFO	Polifenoxidase
PLS-DA	Partial Least Squares - Discriminant Analysis
POD	Peroxidase
PPO	Polyphenolxidase
PRESAT	Presaturation
Pyr	Pirralina
RI	Retencion Index
Rpm	Rotações por minuto
RT	Retention Time
SPE	Solid phase extraction
TMSP-d <sub>4</sub>	Sodium-3-trimethylsilylpropionate
TOF	Time of Flight
UHT	Ultra High Temperature
UPLC-HRMS	Ultra Performance Liquid Chromatography - Hight Resolution Mass Spectrometer
VOC	Volatile Organic Compounds
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<b>A cultura do coco</b> .....	16
2.1.1	<i>A água de coco</i> .....	18
3	<b>PRESERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DA ÁGUA DE COCO</b> .....	20
4	<b>DESENVOLVIMENTO DE COR EM PRODUTOS AGRÍCOLAS INDUSTRIALIZADOS</b> .....	24
5	<b>CAPÍTULO II: CHEMICAL COMPOSITION OF THERMALLY PROCESSED COCONUT WATER EVALUATED BY GC-MS, UPLC-HRMS, AND NMR</b> .....	35
6	<b>INTRODUCTION</b> .....	36
7	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	38
7.1	<b>Sampling</b> .....	38
7.1.1	<i>Thermal treatment</i> .....	38
8	<b>UPLC-HRMS ANALYSIS</b> .....	39
8.1	<b>Extraction procedure</b> .....	39
8.1.1	<i>Analysis</i> .....	39
8.1.2.1	<i>Chemometric analysis of the UPLC-HRMS dataset</i> .....	40
9	<b>GC-MS ANALYSIS</b> .....	41
9.1	<b>Extraction and derivatization</b> .....	41
9.1.1	<i>Analysis</i> .....	42
9.1.2.1	<i>Chemometric analysis of the GC-MS dataset</i> .....	42
10	<b>NMR ANALYSIS</b> .....	43
10.1	<b>Chemometric analysis of the NMR dataset</b> .....	44
11	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	45
11.1	<b>Metabolites assayed by UPLC-HRMS</b> .....	45
11.1.1	<i>Evaluation by GC-MS</i> .....	52
11.1.2.1	<i>Evaluation by NMR</i> .....	55
12	<b>CONCLUSIONS</b> .....	58
	<b>REFERENCES</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A água de coco é uma bebida tropical, natural e bastante consumida devido às suas propriedades benéficas à saúde. Oriunda de frutos imaturos de difícil comercialização, a água de coco após extraída do fruto é mais fácil de manusear, porém sensível a modificações biológicas e químicas (FROEHLICH, 2015). Dessa forma, os tratamentos pós-colheita permitem prolongar o tempo de vida útil da bebida, sendo um deles o processamento térmico por esterilização UHT (do inglês, “*Ultra High Temperature*”) eficaz no controle microbiológico e enzimático, mas capaz de promover alterações nas propriedades organolépticas como sabor, aroma e cor do líquido (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

A mudança de coloração que ocorre após o processamento e/ou armazenamento da água de coco tem sido atribuída a reações enzimáticas após a abertura do fruto, mas trabalhos relatam que as inativações das enzimas PFO (Polifenol oxidase) e POD (Peroxidase) apenas atrasam a ocorrência da mudança de cor, sendo um grande problema encontrado pelos envasadores e exportadores de água de coco, permanecendo não elucidados os compostos responsáveis por essa alteração (DONSINGHA; ASSATARAKUL, 2018; PRADES *et al.* 2012b).

O processamento térmico produz um classe de compostos conhecidos por AGEs (do inglês “*Advanced Glycation End-Products*”), produtos finais da glicação avançada, que são compostos complexos produzidos por uma série de reações, durante a reação de Maillard (LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSHI, 2010). A formação dessas substâncias nos alimentos está relacionada com a composição química (açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, etc), métodos de armazenamento e processamento, porém as complexas composições alimentares e as complicadas reações químicas de formação desses compostos dificultam a detecção de AGEs em alimentos (ASSAR *et al.* 2009; ZHANG *et al.* 2011).

Outra classe de compostos que podem ser responsáveis pela mudança de cor são as quinonas. O contato com o ar atmosférico durante o processamento da água de coco faz com que os fenólicos sejam oxidados a quinonas por reações enzimáticas ou não. Esses produtos são altamente reativos e podem estar produzindo compostos com coloração rosada (MURATA *et al.* 2002).

Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar os compostos possivelmente associados à mudança de coloração para um tom rosado da água de coco processada termicamente por meio de análises químicas associadas a quimiometria.

## 2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do Coco

*Cocos nucifera* (L.) é uma espécie pertencente à família das Arecaceae e trata-se de uma planta não endêmica do Brasil, todavia encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste do país (LEITMAN *et al.* 2015). Originária de ilhas do Sudeste Asiático (Malásia, Indonésia e Filipinas) entre os oceanos Índico e Pacífico, acredita-se que o fruto do coqueiro tenha sido levado para a Índia e, em seguida, para a África Oriental. Após a descoberta do Cabo da Boa Esperança, esta planta foi introduzida na África Ocidental, dispersando-se para o continente americano e outras regiões tropicais do globo (FOALE; HARRIES, 2009).

Hoje, apesar de cultivado em mais de 90 países, a produção mundial do coco está concentrada na Ásia e região do Pacífico, Filipinas, Indonésia, Índia, Sri Lanka, Tailândia, Malásia e Papua-Nova Guiné, os quais juntos perfazem 80% da área total plantada (PHAM, 2016; SURIYA, 2016). A Indonésia é destacada como o maior produtor mundial de coco, seguido por Filipinas e Índia, apesar da Filipinas possuir uma maior área (**Tabela 1**) (FAO, 2018).

Tabela 1 – Produção e área colhida dos principais produtores de coco, em 2016.

País	Área colhida (ha)	Produção (t)
<b>1º</b> Indonésia	3.105.259	17.722.429
<b>2º</b> Filipinas	3.565.059	13.825.080
<b>3º</b> Índia	2.155.749	11.127.898
<b>4º</b> Brasil	234.012	2.649.246
Sri Lanka	408.918	2.520.095
Tailândia	177.063	815.406
México	183.637	1.157.481
Vietnã	146.835	1.469.960
Papua Nova Guiné	207.679	1.191.438
Malásia	84.609	504.773
Outros	1.899.984	6.026.829
Mundo	12.168.804	59.010.635

Fonte: FAO (2018).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2018), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco com uma produção aproximada de 2,7 milhões de toneladas, em uma área colhida de 234 mil ha de coqueiros. Mesmo sendo pequena em



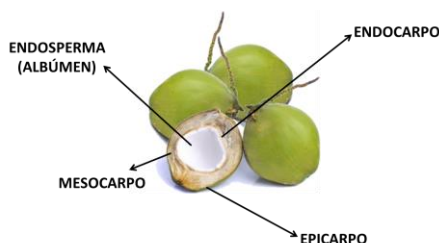
relação aos países asiáticos, a produção brasileira do fruto predomina na região litorânea nordestina e é de fundamental importância na vida e na economia das populações nordestinas, principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Sendo o estado da Bahia (542 mil frutos), seguido de Sergipe (231 mil frutos) e Ceará (262 mil frutos) os maiores produtores nacionais (IBGE, 2016).

O produtor brasileiro procurando sobreviver perante essa concorrência buscou encontrar uma alternativa viável, como o uso do coqueiro-anão como matéria-prima para a extração de água de coco. A partir de então, ocorreu um forte crescimento da cultura do coqueiro-anão visando suprir um mercado crescente de bebidas naturais (CABRAL; PENHA; MATTA, 2005).

O coqueiro-anão trata-se de uma variedade precoce que inicia o florescimento em torno de três anos de idade e seu pequeno porte facilita a colheita do fruto. Produz, em média, de 130 a 150 frutos/planta/ano e embora, produza mais cedo que os gigantes e tenha boa produção, a polpa é mais macia e de qualidade inferior à dos coqueiros gigantes, e portanto, é empregado exclusivamente para a produção de água de coco. Essa variedade anã é composta pelas cultivares amarela, verde e vermelha, sendo a anã verde a mais empregada para consumo de água seja *in natura* ou industrializada (ROSA; ABREU, 2000).

Botanicamente o coqueiro tem como fruto o coco, uma drupa que compreende um epicarpo, formado por uma camada mais externa da casca, um mesocarpo fibroso e um endocarpo lenhoso. Este último suporta o endosperma, porção comestível do coco, composto pelo albúmen sólido e branco de espessura variada, dependendo da idade do fruto, e pelo albúmen líquido, chamado de água de coco (**Figura 1**) (LEBER; FARIA, 2003).

Figura 1 – Componentes do fruto do coqueiro.



Fonte: Istock photo

### 2.1.1 A água de coco

A água do coco verde é uma bebida refrescante, doce e levemente adstringente, apresentando um valor de pH na faixa de 4,6 a 5,6, que depende, principalmente, da variedade e do grau de maturação do coco. O produto sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto e além do grau de maturação e variedade, outros fatores como região e época do ano também influenciam as características físico-químicas da água (YONG *et al.* 2009).

Rica em nutrientes de fácil assimilação, a água do coco verde representa 25% do peso do fruto com volume médio de 400 mL e é composta de água, carboidratos, vitaminas, sais minerais, enzimas, aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos e fitormônios, conforme a **Tabela 2** (MAGALHÃES *et al.* 2005; ARAGÃO, 2000; YONG *et al.* 2009; LIMA *et al.* 2015).

Dentre os componentes mais importantes da água de coco estão os açúcares que, no início da maturação, apresentam-se na forma de redutores (glicose e frutose) com concentrações que alcançam níveis máximos de 5% entre o 6º e 7º mês de desenvolvimento, período em que a quantidade de água também é maior e com melhor aceitação de sabor. Normalmente, o líquido começa a se formar em torno do 2º mês após a abertura da inflorescência, atingindo volume máximo por volta do 5º ao 7º mês, sendo este o período recomendado para a colheita. Com a maturação, a concentração de açúcares redutores diminui para até 1%, com a formação de açúcares não-redutores (sacarose) e de modo que, ao final da maturação, o teor de açúcares totais é aproximadamente 2% (JAYALEKSHMY *et al.* 1984; CAMPOS *et al.* 1996a; ROSA; ABREU, 2000).

O conteúdo balanceado de açúcares e a composição mineral isotônica torna a água de coco uma alternativa para a reidratação do organismo humano (PRADES *et al.* 2012a). Estudos comprovam que não só a água de coco, mas outras partes do fruto podem conter moléculas com importantes atividades biológicas e farmacológicas tais como; anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-osteoporose, anti-diabética, anti-neoplásica, anti-helmíntica, bactericida, leishmanicida, antifúngica, antiviral, analgésica, vasodilatadora e protetora dos rins, coração, fígado e estômago (AKINPELU *et al.* 2015; RINALDI *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2013; JOSÉ; SHARMA; SHANTARAM, 2011; JOSÉ *et al.* 2014).

Apesar das inúmeras funções atribuídas à água de coco, contaminações microbianas e alterações bioquímicas podem ocorrer durante a extração e envase do líquido dificultando sua conservação após a abertura do fruto. No interior desses frutos, a água de

coco encontra-se estéril e estável e torna-se instável quando extraída, podendo ser armazenada por apenas poucos dias à temperatura de 4°C (AWUA; DOE; AGYARE, 2011; ROSA; ABREU, 2000)

Tabela 2 – Composição química da água do coco verde no 6º mês de desenvolvimento do fruto.

<b>CARBOIDRATOS</b>	Sacarose	(g/100g)	0,06	<b>AMINOÁCIDOS</b>	Alanina	(mg/g)	1,13	
	Glicose		2,61		Arginina		0,13	
	Frutose		2,55		Ácido aspártico		1,6	
<b>SAIS MINERAIS</b>		(mg/100g)	Ca		27,35	Ácido glutâmico		3,44
			Fe		0,02	Glicina		0,43
			Mg		6,4	Histidina		0,39
			P		4,66	Isoleucina		0,26
			K		203,7	Leucina		0,66
			Na		1,75	Lisina		4,72
			Zn		0,07	Metionina		0,22
			Cu		0,01	Fenilalanina		0,26
			Mn	0,12	Prolina		0,52	
			S	0,58	Serina		0,64	
			Al	0,07	Treonina		0,2	
			B	0,05	Valina		0,91	
<b>VITAMINAS</b>		(mg/100dm <sup>3</sup> )	C	7,41	<b>ÁCIDOS ORGÂNICOS</b>	Tartárico	(mg/100DM)**	1,6
			B1	-		Málico		317
			B2	0,01				
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>	<b>SATURADOS</b>		Cáprico	(g/100g)	0,0007	<b>ENZIMAS*</b>	Fosfatase ácida Catalase Desidrogenase Díastase RNA polimerase Peroxidase Polifenol oxidase	
			Láurico		0,002			
			Mirístico		0,0023			
			Palmítico		0,0219			
			Margárico		0,0009			
			Esteárico		0,0039			
Araquídico		0,0016						
<b>MONOINSATURADOS</b>			Palmitoléico		0,0011			
			Elaídico		0,0194			
<b>POLINSATURADOS</b>			Linoléico		0,0114			
			Araquidônico		0,0014			
<b>FITORMÔNIOS</b>	<b>AUXINA</b>		Ácido indol-3-acético	(nM)	150,6			
	<b>CITOCININAS</b>			N <sup>6</sup> -isopenteniladenina		0,26		
				dihidrozeatina		0,14		
				trans-zeatina		0,09		
				cinetina		0,31		
				O-topolin		3,29		
				dihidrozeatina O-glucosídeo		46,6		
				trans-zeatina O-glucosídeo		48,7		
				trans-zeatina ribosídeo		76,2		
				cinetina ribosídeo		0,33		
trans-zeatina ribosídeo- 5'-monofosfato		10,2						
<b>GIBERELINAS</b>			Giberelina 1		16,7			
			Giberelina 3		37,8			
<b>ÁCIDO ABCÍSIKO</b>					65,5			

Fonte: SANTOSO *et al.* (1996), ARDITTI (2008), YONG *et al.* (2009) e LIMA *et al.* (2015).

\* Dados não quantificados. \*\* massa seca.

### 3 PRESERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DA ÁGUA DE COCO

O mercado da água de coco aumenta ao longo dos anos e essa demanda pressiona as indústrias para converter a matéria-prima perecível em um produto de prateleira estável e seguro. Porém, para competir no mercado internacional de bebidas, ela precisa ser cuidadosamente processada, embalada, transportada e armazenada, observando-se a manutenção, o quanto possível, das características sensoriais originais e de sua composição bioquímica (ALAVE, 2011).

Tradicionalmente a água de coco é comercializada dentro do próprio fruto, porém essa prática envolve diversos problemas relativos ao transporte, armazenamento e perecibilidade do produto. Isso justificou o desenvolvimento de técnicas de processamento que permitem o envase da água de coco verde, viabilizando a sua comercialização para locais distantes de sua origem, com melhor conservação e menor exigência de espaço para o transporte (MAGALHÃES *et al.* 2005). No Brasil e na Ásia, estão disponíveis para venda água de coco enlatada, engarrafada e em embalagem Tetra Pak<sup>®</sup>, todavia os consumidores que têm experimentado estes produtos estão cientes que eles diferem da água de coco *in natura*. Portanto, prolongar a vida de prateleira da água de coco, sem modificar o seu sabor e as propriedades nutritivas permanece um desafio (PRADES *et al.* 2012b).

Dentre as tecnologias desenvolvidas, destacam-se os tratamentos térmicos e não térmicos, combinados ou não à aditivos químicos. Dentre os tratamentos térmicos, o resfriamento e congelamento são os processos atualmente mais utilizados pela indústria. Quando estes são realizados sem tratamentos auxiliares, a vida de prateleira da água de coco refrigerada a 6 °C é de aproximadamente três dias, dependendo das condições de higiene utilizadas no processamento, do tempo decorrido entre a abertura do coco e o envase e do grau de maturação dos frutos utilizados como matéria-prima (CABRAL; PENHA; MATTA, 2005).

A manipulação inadequada torna-a um veículo transmissor de doenças por alimentos, como observado por Soares *et al.* (2017) que avaliou a qualidade das águas de coco *in natura*, resfriadas, extraídas artesanalmente por ambulantes da localidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, verificando elevada contaminação por micro-organismos deteriorantes, além de 58% das amostras estarem contaminadas com micro-organismos patogênicos.

Uma outra tecnologia, emprega a pasteurização da água de coco, tem como finalidade reduzir os níveis de contaminação microbiana. A temperatura do processo deve situar-se na faixa de 75 a 90°C e tanto a temperatura quanto o tempo de pasteurização devem

ser otimizados, considerando os atributos sensoriais do produto e o tipo de equipamento utilizado (ROSA; ABREU, 2000).

Já no processo de esterilização por UHT, a água de coco é submetida à temperatura de 140 °C por poucos segundos. Apesar deste curto tempo, esse processo térmico tem como desvantagem alterações indesejadas no conteúdo nutricional e no sabor, limitando a sua comercialização (ROSA; ABREU, 2002; AGRICULTURA 21, 2003).

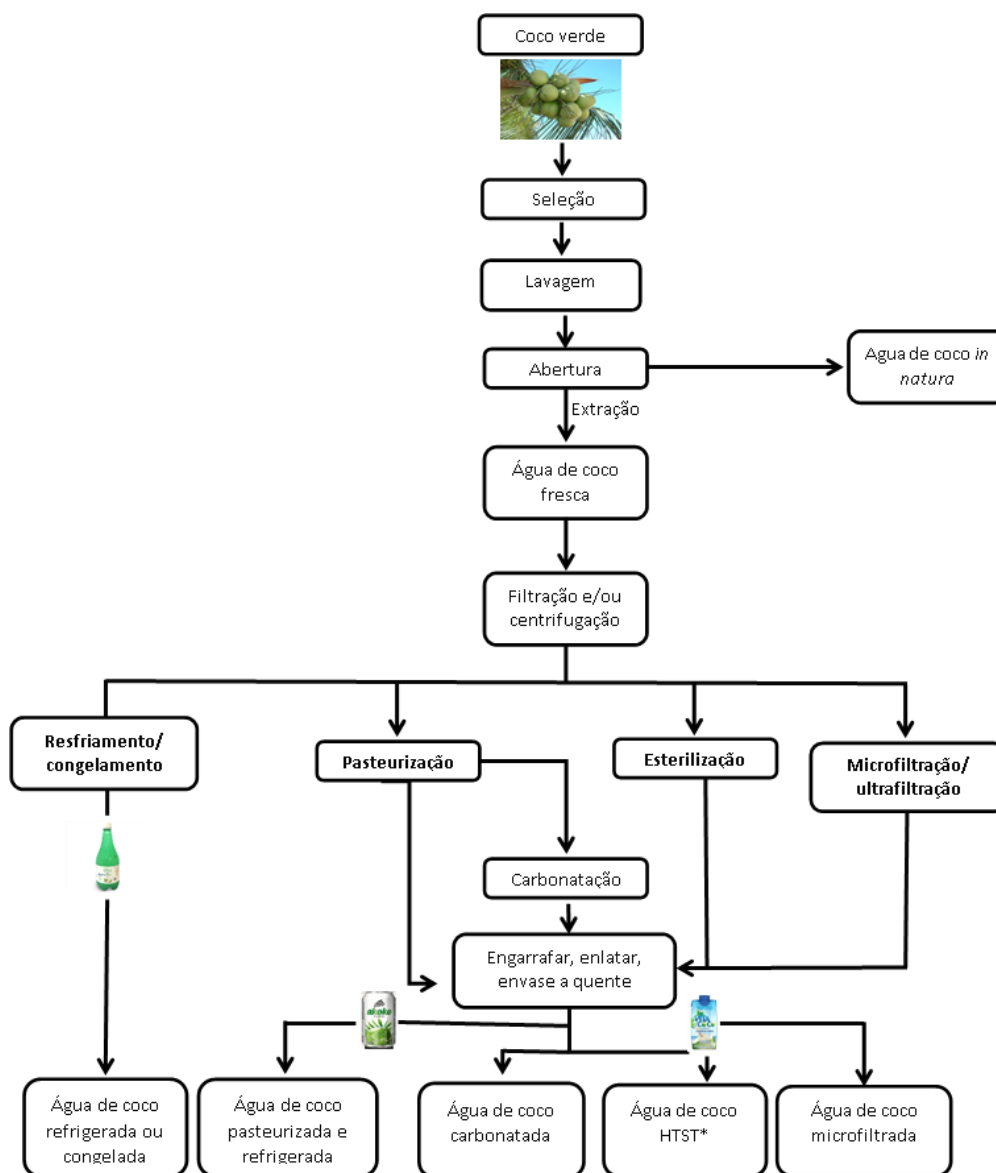
O uso em conjunto das formulações com os tratamentos térmicos minimiza as alterações indesejáveis geradas pelo aquecimento, com correção de parâmetros como °Brix e acidez utilizando para isso frutose e o acidulante orgânico ácido cítrico, respectivamente. Já o uso de aditivos como o conservador metabissulfito de sódio e o antioxidante ácido ascórbico também são comumente utilizados comercialmente e têm a finalidade de prolongar a vida de prateleira da água de coco, uma vez que esses tratamentos auxiliares permitem estender a vida de prateleira do produto para até seis meses. Porém o uso do metabissulfito de sódio acarreta perda sensorial e nutricional do produto, além de indícios de que pode causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis aos sulfitos (ROSA; ABREU, 2002; ABREU; FARIA, 2007; SAPERS, 1993).

O grande problema encontrado pelos envasadores e exportadores de água de coco é que os tratamentos térmicos intensos aceleram as reações de alteração de cor que já são naturais da água de coco, resultando em uma coloração rosada que é comum em águas de coco *in natura*, ou quando armazenadas por alguns dias sob refrigeração. Essas alterações na cor da água de coco para amarelo, marrom ou rosa têm sido relacionadas na literatura com a atividade das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), sendo difícil controlar os fatores (temperatura, pH e concentração de oxigênio) que alteram o nível de atividade dessas enzimas após a abertura do coco. Embora essas enzimas sejam termoestáveis, é possível inativá-las por tratamentos térmicos, uma vez que pequenas exposições a 70-90°C são suficientes para desnaturação e consequente perda da sua função catalítica (WEEMAES *et al.* 1998; PRADES *et al.* 2012b). O trabalho de Campos *et al.* (1996b) mostraram a inativação total à 90°C para PFO após 550s e para POD após 310s de tratamento e Abreu e Faria (2007) evidenciaram a inativação da PFO nas temperaturas de 138 e 144°C após 10s de tratamento, conferindo uma coloração rosada à água de coco imediatamente após a aplicação do tratamento térmico.

A micro e a ultra-filtração são tratamentos não térmicos de filtração em membranas que surgem como alternativas para estabilizar o aroma natural da água de coco, uma vez que esteriliza o produto à temperatura ambiente, enquanto preserva suas

características aromáticas. Além disso, a ultra-filtração é capaz de separar enzimas como POD e PFO, cujas massas moleculares são 49,2 e 73,8 kDa, respectivamente (DUARTE; COELHO; LEITE, 2002). Logo, há diversos métodos de conservação da água de coco verde e o fluxograma da **Figura 2** apresenta as diferentes vias de processamento.

Figura 2- Fluxograma de diferentes métodos de processamento da água de coco verde.



Fonte: PRADES *et al.* (2012b). \*Pasteurização rápida em condições de alta temperatura e curto intervalo de tempo.

Em qualquer um dos métodos citados, deve-se otimizar o tempo de processo e minimizar a exposição ao ar, a fim de solucionar problemas sensoriais relacionados às mudanças no aroma, sabor e coloração da água de coco. Portanto, com a finalidade de minimizar as alterações indesejáveis que acarretam no desenvolvimento da cor rósea em água

de coco, várias tecnologias foram empregadas como as que almejavam a inativação das enzimas POD e PFO por tratamentos térmicos convencionais como a pasteurização (Murasaki-Aliberti *et al.* 2009), uso de microondas (Matsui *et al.* 2007) e esterilização (Awua *et al.* 2011) e os métodos não-convencionais de ultra-filtração (Jayanti *et al.* 2010), homogeneização a alta pressão (Dosualdo, 2007), CO<sub>2</sub> em fase densa (Damar; Balaban; Sims, 2009) e  $\gamma$ -irradiação (Awua *et al.* 2011).

O estudo realizado por Augusto *et al.* (2015) evidenciou que através da aplicação da radiação ultravioleta (UV) em água de coco houve redução na atividade de enzimas como POD e PFO responsáveis pela oxidação de fenólicos e sua subsequente interação com proteínas. Os resultados mostraram que as enzimas foram continuamente inativadas, de modo que a atividade da POD foi reduzida para 1% após 30 min, já a atividade da PPO decresceu para 2% após 30 min. Entretanto, a radiação UV apenas atrasou a ocorrência da mudança de cor. De fato, Donsingha e Assatarakul (2018) observaram que a água de coco tratada com UV nas doses de 4,8, 3,2 e 1,6 J / mL mostraram 100% de descoloração rosa (escala visual) nos dias 8, 10 e 18, respectivamente, de armazenamento a 4°C.

Embora essas tecnologias possam ser utilizadas pela indústria de alimentos, o surgimento de uma coloração rosada durante a estocagem é um grande problema encontrado pelos envasadores e exportadores de água de coco, permanecendo não elucidados os compostos responsáveis por essa alteração (PRADES *et al.* 2012b).

## 4 DESENVOLVIMENTO DE COR EM PRODUTOS AGRÍCOLAS INDUSTRIALIZADOS

O aumento do consumo de produtos industrializados que sofreram processamento térmico aumentou nas últimas décadas. Todavia, o processamento pode interferir na formação de compostos voláteis como cetonas e aldeídos, que conferem o aroma característico aos produtos, além de substâncias responsáveis pela cor e sabor dos alimentos, e assim prejudicar ou contribuir para a melhoria dos atributos de qualidade (BOURVELLEC, 2013).

O aparecimento da cor rosa em produtos industrializados é um problema comum que ocorre no processamento. Essa mudança de cor é dependente de vários fatores utilizados no processamento, tais como pH, temperatura, tempo de tratamento e armazenamento, sendo a temperatura o principal fator que conduz a um aumento no aparecimento da cor rosa. Esse fenômeno é pouco conhecido e afeta o valor comercial de frutos como peras, marmelos, maçãs, bananas, groselhas, goiabas, pêssegos e lichias (BOURVELLEC *et al.* 2013; WU; FANG, 1993).

Em peras enlatadas, essa mudança de cor para um tom rosado que ocorre no processamento térmico está associada à despolimerização de taninos condensados e sua conversão em antocianidinas. Já em suco de cebola o mecanismo da descoloração rosa foi explicado pela reação de compostos voláteis com a enzima alinase e aminoácidos (BOURVELLEC *et al.* 2013; LEE; YOO; PATIL, 2010).

Compostos denominados de produtos finais da glicação avançada (do inglês *advanced glycation end-products*-AGEs) são gerados em alimentos processados termicamente e/ou armazenados por um tempo prolongado por meio da reação de Maillard, que é uma reação de escurecimento não enzimático. Essa reação ocorre entre produtos da degradação de proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e açúcares e podem também ser formados da peroxidação lipídica, recebendo o nome de produtos finais da lipoxidação avançada (do inglês *advanced lipoxidation end-products* -ALEs) (MIYATA *et al.* 2000; BAYNES, 2002; CHUYEN, 2006; SHIBAO; BASTOS, 2011).

Didaticamente, a reação de Maillard é dividida em três fases, conforme esquema inicialmente proposto por Hodge (1953) e citado por Nursten (2005). Na fase inicial, pode ocorrer a condensação da carboníla de um açúcar redutor com um grupamento amina proveniente de aminoácidos livres ou de proteínas, levando à formação de glicosil/frutosilaminas *N*-substituídas. Esse primeiro produto estável da reação é chamado de produto de Amadori e não possui cor, fluorescência ou absorção na região UV. Na etapa



seguinte, prolongando-se o aquecimento ou armazenamento, os produtos de Amadori dão origem a uma série de reações (desidratação, enolização e retroaldolização), resultando em compostos dicarbonílicos (gloxal, metilgloxal e 3-deoxiglucosona), redutonas, derivados do furfural ou em produtos da degradação de Strecker (produtos de degradação de aminoácidos). Nesta fase, é observada a formação de produtos fluorescentes e de substâncias capazes de absorver radiação na região do UV. No último estágio da reação de Maillard, os compostos dicarbonílicos altamente reativos podem reagir com resíduos de lisina ou arginina em proteínas, formando os compostos conhecidos por AGEs, estes apresentando cor.

Diferentes AGEs têm sido identificados em alimentos como: N- $\epsilon$ -(carboximetil) lisina (do inglês *N- $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine-CML*), N- $\epsilon$ -(carboxietil) lisina (do inglês *N- $\epsilon$ -(carboxylethyl)lysine-CEL*) e pirralina (do inglês *pyrraline-Pyr*), todos resultantes da glicação do aminoácido lisina com os respectivos açúcares redutores gloxal, metilgloxal e 3-deoxiglucosona. O AGE argipirimidina (do inglês *argpyrimidine-Arg-p*) é derivado da reação entre o aminoácido arginina e o metilgloxal, enquanto que a pentosidina (do inglês *pentosidine-Pento-s*) é formada por uma pentose e os resíduos de lisina e arginina. Outros AGEs citados na literatura são metilfurfural, vesperlisina A, dímero de gloxal-lisina, dímero metilgloxal-lisina e glicosepana (HULL *et al.* 2012).

Dentre estes, o CML é um dos produtos finais mais estudados e frequentemente, é utilizado como marcador de AGE/ALE em alimentos, pois a lisina é cerca de duas a três vezes mais reativa que os outros aminoácidos devido à presença de grupamentos  $\alpha$  e  $\epsilon$ -amino (RABBANI; THORNALLEY, 2012; HULL *et al.* 2012; NGUYEN, 2006; KWAK; LIM, 2004). Outro AGE conhecido por pirralina tem sido obtido experimentalmente por reação entre o monossacarídeo glicose e o aminoácido lisina e essa preparação tem adquirido a coloração rosa quando armazenada a temperatura ambiente ou sob refrigeração, além de apresentar absorção na faixa de 500 nm (NAGARAJ; OTIN; MONNIER, 1996).

A quantificação de AGEs em alimentos ou amostras biológicas é feita pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA*) e por análise instrumental, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD), cromatografia gasosa por espectrômetro de massas (GC-MS) e por cromatografia líquida de ultra eficiência em série com espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS) (AMES, 2008; RUFÍÁN-HENARES; GUERRA-HERNÁNDEZ; GARCÍA-VILLANOVA, 2004; VAN DE MERBEL *et al.* 2004; PETROVIC *et al.* 2005; HULL *et al.* 2012).

A quantidade de AGEs em cada alimento depende de vários fatores como o tipo, a composição química, o preparo ou o método utilizado no processamento dos alimentos. Alimentos ricos em lipídios, proteínas e açúcares geralmente possuem quantidades elevadas de AGEs e são mais susceptíveis a uma formação complementar durante tratamentos térmicos (ZHANG *et al.* 2011). Porém, os AGEs estão presentes em alimentos submetidos a qualquer tipo de tratamento térmico, sejam fritos, assados, cozidos ou levados ao forno micro-ondas, sendo a temperatura o parâmetro crítico que diferencia essa reação (SHIBAO; BASTOS, 2011).

Os alimentos cozidos geram um menor conteúdo de AGEs em kU (quilograma unidades) de CML/100 g de alimento, por exemplo a carne bovina cozida tem 2.687 kU/100 g, já a carne bovina grelhada 7.479 kU/100 g, a carne de frango cozida 1.210 kU/100 g e a carne frango grelhada 6.639 kU/100 g. Os estudos também mostram que alimentos presentes no grupo dos lipídios apresentam conteúdos maiores de AGEs, como por exemplo; manteiga (26.480 kU/100 g), margarina (17.520 kU/100 g), óleo de oliva (11.900 kU/100 g), devido ao favorecimento de reações entre as aminas e os produtos da oxidação lipídica. Já os alimentos do grupo das proteínas, como atum enlatado com óleo (5.113 kU/100 g) e peixe frito (3.083 kU/100 g), apresentam quantidades intermediárias. Os alimentos do grupo dos carboidratos como pães (133 kU/100 g), flocos de milho (233 kU/100 g) e macarrão (242 kU/100 g) apresentam conteúdos menores (CHARISSOU; AIT-AMEUR; BIRLOUEZ-ARAGON, 2007).

A maioria dos estudos sobre os AGEs compara o nível de CML em alimentos submetidos a diferentes técnicas culinárias, tais como cozido versus assado, empanado versus não empanado e adição ou não de temperos antes do cozimento (CHEN; SMITH, 2015; HULL *et al.* 2012; CHAO; HSU; YIN, 2009). Há poucos estudos sobre a formação de AGEs em alimentos submetidos a esterilização ou pasteurização (SUN *et al.* 2016; SUN *et al.* 2015; ZHANG *et al.* 2011; AHMED *et al.* 2005), assim como não há publicações científicas sobre a formação de AGEs na água de coco.

Embora não esteja claro o papel desses compostos na dieta e nos efeitos deletérios à saúde decorrentes da ingestão, estudos realizados mostram a participação dessas moléculas em processos patológicos, uma vez que os AGEs podem promover o estresse oxidativo e inflamação, alterar a regulação dos níveis plasmáticos de glicose, aumentar o risco de doenças cardiovasculares e do câncer no pâncreas (CAI *et al.* 2002; AMES, 2007; SEBEKOVÁ; SOMOZA, 2007; JIAO *et al.* 2015), além de estarem relacionados ao envelhecimento, a

doença de Alzheimer e aterosclerose (NASS *et al.* 2007; SASAKI *et al.* 1998; XANTHIS *et al.* 2007).

O ácido clorogênico (ácido 3-cafeoil-D-quinico) é um composto químico da classe dos ésteres formado pela reação entre o ácido caféico e o ácido quinico. Trata-se de um importante polifenol encontrado em muitos frutos, agindo como antioxidante, pois possui a capacidade de se complexar com íons Fe, inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) pela reação de Fenton (KONO *et al.* 1998).

O contato com o ar atmosférico durante o processamento da água de coco faz com que os fenólicos sejam oxidados a quinonas por reações enzimáticas ou não. As reações enzimáticas são catalisadas pelas enzimas polifenol oxidase e peroxidase que podem utilizar fenólicos como o ácido clorogênico como substrato da reação e produzir uma quinona de ácido clorogênico. Esses produtos são altamente reativos, por serem deficientes em elétrons, e podem reagir com grupos amino e tiol de aminoácidos presentes na água de coco, produzindo compostos com coloração rosada (MURATA *et al.* 2002). Essas reações são evidenciadas por Namiki *et al.* (2001) e Yabuta *et al.* (2001) que relataram, após a oxidação do ácido clorogênico, a formação de dímeros de quinonas de ácido clorogênico que reagem com aminoácidos.

Embora quinonas e aminoácidos estejam em compartimentos separados dentro da célula, eles podem interagir mediante condições de injúria, corte ou esmagamento de tecidos vegetais e ruptura celular. Esses procedimentos físicos ou fisiológicos podem acarretar em escurecimento enzimático de alimentos, descoloração de material vegetal durante o processamento, alteração nas propriedades antioxidantes de fenólicos, alteração da solubilidade de compostos e mudanças na cor, sabor e aroma de produtos agrícolas (BITTNER, 2006).

Vários trabalhos associam essa mudança de cor, sabor e aroma a reações entre quinonas de ácido clorogênico e aminoácidos: em folhas de tabaco (YUNOSHEV, 1957; YUNOSHEV, 1958), suco de batata (NARVÁEZ-CUENCA; VINCKEN; GRUPPEN, 2013), café (MELO; AMORIM, 1975) e suco de maçã (SCHILLING *et al.* 2008), mas nenhum estudo relata a presença desses compostos na água de coco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. F; FARIA, J. A. F. Influência da temperatura e do ácido ascórbico sobre a estabilidade físico-química e atividade enzimática da água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada assepticamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 226-232, 2007.

AGRICULTURA 21, 1998. **Enfoques: Nueva bebida para el deporte: agua de coco.** Revista da FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9810/spot3.htm>>. Acesso em: 25 mai. 2016.

AHMED, N; MIRSHEKAR-SYAHKAL, B; KENNISH, L; KARACHALIAS, N; BABAEI-JADIDI, R; THORNALLEY, P. J. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 49, p. 691–699, 2005.

AKINPELU, D. A; ALAYANDE, K. A; AIYEGORO, O. A; AKINPELU, O. F; OKOH, A.I. Probable mechanisms of biocidal action of *Cocos nucifera* Husk extract and fractions on bacteria isolates. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, n. 116, 2015.

ALAVE, K. L. 2011. **Coconut water exports jump 315%.** Philippine Daily Inquirer. Disponível em: <<http://business.inquirer.net/25199/coconut-water-exports-jump-315>>. Acesso em: 26 Ago. 2018.

AMES, J.M. Evidence against dietary advanced glycation endproducts being a risk to human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 51, p. 1085–1090, 2007.

AMES, J. M. Determination of N-(carboxymethyl) lysine in foods and related systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1126, p.20–24, 2008.

ARAGÃO, W. M. **O potencial do coqueiro híbrido para cocoicultura brasileira.** Disponível em: <<http://riomar.cpac.embrapa.br/index.php?idapagina=artigos&artigo=1130>>. Acesso em: 07/03/2004.

ARDITTI, J. *Micropropagation of Orchids*, 2nd ed.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2008; Volume II.

ASSAR, S. H; MOLONEY, C; LIMA, M; MAGEE, R; AMES, J. M. Determination of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids*, v. 36, p. 317-326, 2009.

AUGUSTO, P. E. D; IBARZ, R; GARVIN, A; IBARZ, A. Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) photo-inactivation in a coconut water model solution using ultraviolet (UV). *Food Research International*, v. 74, p. 151-159, 2015.

AWUA, A. K; DOE, E. D; AGYARE, R. Exploring the influence of sterilisation and storage on some physicochemical properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *BMC Research Notes*, v. 4, n. 451, p. 1-9, 2011.

AWUAH, G. B; RAMASWAMY, H. S; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6), 584–602, 2007.

BAYNES, J. W. The Maillard hypothesis on aging: Time to focus on DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 959, p. 360-367, 2002.

BITTNER, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids*, v. 30, p. 205–224, 2006.

BOURVELLEC, L. C; GOUBLE, B; BUREAU, S; LOONIS, M; PLÉ, Y; RENARD, C, M. Pink discoloration of canned pears: role of procyanidin chemical depolymerization and procyanidin/cell wall interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n.27, p. 6679-6692, 2013.

CABRAL, L. M. C; PENHA, E. M, MATTA, V. M. *Água de coco verde refrigerada*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 34p, 2005.

CAI, W; GAO, Q; ZHU, L; PEPPA, M; HE, C; VLASSARA, H. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Molecular Medicine*, v. 8, p. 337–346, 2002.

CAMPOS, C. F; SOUZA, P. E. A; COELHO, J. V; GLÓRIA, M. M. B. A. Green coconut water quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 20, p. 487-500, 1996a.

CAMPOS, C.F; SOUZA, P. E. A; COELHO, J. V; GLÓRIA, M. B. A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation of flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 20, n. 6, p. 487-500, 1996b.

CHAO, P. C; HSU, C. C; YIN, M. C. Analysis of glycative products in sauces and sauce-treated foods. *Food Chemistry*, v. 113, p. 262–266, 2009.

CHARISSOU, A; AIT-AMEUR, L; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Evaluation of gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography*, v. 1140, p. 189-94, 2007.

CHEN, G; SMITH, J. C. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. *Food Chemistry*, v. 168, p. 190–195, 2015.

CHUYEN, N. V. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 50, p. 1140–1149, 2006.

DAMAR, S; BALABAN, M. O; SIMS, C. A. Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of a coconut water beverage. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, n. 4, p. 666–673, 2009.

DONSINGHA, S; ASSATARAKUL, K. Kinetics model of microbial degradation by UV radiation and shelf life of coconut water. *Food Control*, v.92, p.162-168, 2018.

DOSUALDO, G. L. **Efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na redução da carga microbiana e da atividade enzimática da água de coco.** Master Tesis on Food Technology. University of Campinas (UNICAMP), 2007.

DUARTE, A. C. P; COELHO, M. A. Z; LEITE, S. G. F. Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v.3, p. 266–270, 2002.

FAO 2018. **World Production**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 17 Ago. 2018.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: ELEVITCH, C. R. (Ed.). *Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry*, Holualoa, Hawai'i: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2009. Disponível em: <<http://www.agroforestry.org/books/specialty-crops-for-pacific-islands>>. Acesso em: 17 Ago. 2018.

FROEHLICH, A. Água de coco: aspectos nutricionais, microbiológicos e de conservação. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, p. 175-182, 2015.

HODGE, J. E. Chemistry of browning reactions in models systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 1, n. 15, p.928-43, 1953.

HULL, G. L. J; WOODSIDE, J. V; AMES, J. M; CUSKELLY, G. J. N  $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chemistry*, v. 131, p. 170–174, 2012.

IBGE. **Produção Agrícola – Lavoura Permanente**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/>>. Acesso em: 17 Ago. 2018.

JAYALEKSHMY, A; ARUMAGHAN, C; NARAYANAN, S; MATHEW, A. G. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. *Journal of Food Science and Technology*, v.23, n. 4, p. 203-207, 1984.

JAYANTI, V. K; RAI, P; DASGUPTA, S; DE, S. Quantification of flux decline and design of ultrafiltration system for clarification of tender coconut water. *Journal of Food Process Engineering*, v. 33, n. 1, p. 128–143, 2010.

JOSE, M; CYRIAC, M. B; PAI, V; VARGHESE, I; SHANTARAM, M. Antimicrobial properties of *Cocos nucifera* (coconut) husk: An extrapolation to oral health. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, v. 5, p. 359–364, 2014.

JOSE, M; SHARMA, B. B; SHANTARAM, M. Ethnomedicinal herbs used in oral health and hygiene in coastal Dakshina Kannada. *Journal of Oral Health and Community Dentistry*, v. 5, p. 107–111, 2011.

JIAO, L; STOLZENBERG-SOLOMON, R; ZIMMERMAN, T. P; DUAN, Z; CHEN, L; KAHLE, L; RISCH, A; SUBAR, A. F; CROSS, A. J. HOLLEMBECK, A; VLASSRA, H; STRIKER, G; SINHA, R. Dietary consumption of advanced glycation end products and

pancreatic cancer in the prospective NIH-AARP diet and health study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 101, p. 126–134, 2015.

KONO, Y; KASHINE, S; YONEYAMA, T; SAKAMOTO, Y; MATSUI, Y; SHIBATA, H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, n. 1, p. 22-27, 1998.

KWAK, E. J; LIM, S. I. The effect of sugar, amino acid, metal íon and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids*, v. 27, p.85-90, 2004.

LEBER, A. S; FARIA, J. A. F. Coco verde: características e cuidados pós-colheita. *Revista Frutas & Legumes*, n.18, p. 36-38, 2003.

LEE, E. J; YOO, K. S; PATIL, B. S. Identification of candidate amino acids involved in the formation of pink-red pigments in onion (*Allium cepa* L.) juice and separation by HPLC. *Journal of Food Science*, v. 75, p. 684–689, 2010.

LEITMAN, P; SOARES, K; HENDERSON, A; NOBLICK, L; MARTINS, R.C. 2015. *Arecaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB80541>>. Acesso em: 17 Ago. 2018.

LIMA, E. B. C; SOUSA, C. N. S; MENESES, L. N; XIMENES, N. C; SANTOS JÚNIOR, M. A; VASCONCELOS, G. S; LIMA, N. B. C; PATROCÍNIO, M. C. A; MACEDO, D; VASCONCELOS, S. M. M. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 11, p. 953–964, 2015.

LUEVANO-CONTRERAS, C; CHAPMAN-NOVAKOFSHI, K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, v. 2, n. 12, p. 1247-1265, 2010.

MAGALHÃES, M. P; GOMES, F. S; MODESTA, R. C. D; MATTA, V. M; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p.72-77, 2005.

MATSUI, K. N., GRANADO, L. M., DE OLIVEIRA, P. V., & TADINI, C. C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT–Food Science and Technology*, v. 40, n. 5, p. 852–859, 2007.

MELO, M; AMORIM, H.V. Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage VI. The UV and visible spectral analysis and chlorogenic acids content in TCA soluble buffer extracts. *Turrialba*, v. 25, p. 243–248, 1975.

MIYATA, T; SAITO, A; KUROKAWA, K; VAN YPERSELE DE STRIHOU, C. Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, p. 1744-1752, 2000.

MURASAKI-ALIBERTI, N. C; SILVA, R. M. S; GUT, J. A. W; TADINI, C. C. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in green coconut (*Cocos nucifera*) water. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 2662–2668, 2009.

MURATA, M; SUGIURA, M; SONOKAWA, Y; SHIMAMURA, T; HOMMA, S. Properties of chlorogenic acid quinone: Relationship between browning and the formation of hydrogen peroxide from a quinone solution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 66, p. 2525–2530, 2002.

NAGARAJ, R. H; OTIN, M. P; MONNIER, V. M. Pyrraline Ether Crosslinks as a Basis for Protein Crosslinking by the Advanced Maillard Reaction in Aging and Diabetes. *Archives of biochemistry and Biophysics*, v. 325, n.2, p. 152–158, 1996.

NAMIKI, M; YABUTA, G; KOIZUMI, Y; YANO, M. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65: 2131, 2001.

NARVÁEZ-CUENCA, C. E; VINCKEN, J. P; GRUPPEN, H. Quantitative Fate of Chlorogenic Acid during Enzymatic Browning of Potato Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 1563–1572, 2013.

NASS, N; BARTLING, B; SANTOS, A. N; SCHEUBEL, R. J; BÖGERMANN, J; SILBER, R. E; SIMM, A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 40, p. 349–356, 2007.

NGUYEN, C.V. Toxicity of the AGE generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGE and biological AGE. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 50, p. 1140–1149, 2006.

NURSTEN H. *The Maillard Reaction: Chemistry, biochemistry and Implications*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.

PETROVIC, R; FUTAS, J; CHANDOGA, J; JAKUS, V. Rapid and simple method for determination of N<sup>ε</sup>- (carboxymethyl) lysine and N<sup>ε</sup>- (carboxyethyl) lysine in urine using gas chromatography[mass spectrometry]. *Biomedical Chromatography*, v. 19, p. 649–654. 2005.

PHAM, L. J. Chapter 9- Coconut (*Cocos nucifera*). *Industrial Oil Crops*, p. 231–242, 2016.

PRADES, A; DORNIER, M; DIOP, N; PAIN, J. P. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, v. 67, n. 02, p. 87–107, 2012a.

PRADES, A; DORNIER, M; DIOP, N; PAIN, J. P. Coconut water preservation and processing: a review. *Fruits*, v. 67, n.3, p.157–170, 2012b.

RABBANI, N; THORNALLEY, P. J. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids*, v. 42, p. 1087–1096, 2012.

RINALDI, S; SILVA, D. O; BELLO, F; ALVIANO, C. S; ALVIANO, D. S; MATHEUS, M. E; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, n. 3 p. 541–546, 2009.



ROSA, M. F; ABREU, F. A. P. *Água-de-coco: métodos de conservação*. Fortaleza: Embrapa - CNPAT/ SEBRAE/CE, 2000.

ROSA, M. F; ABREU, F. A. P. *Processos convencionais de conservação de água de coco*. In: ARAGÃO, Wilson M. (Ed.). *Coco: pós-colheita*. Brasília: Embrapa Informação Tecnologia, 2002. p. 42-53. (Série Frutas do Brasil, 29).

RUFÍÁN-HENARES, J. À; GUERRA-HERNÁNDEZ, E; GARCÍA-VILLANOVA, B. Pyrroline content in enteral formula processing and storage and model systems. *European Food Research and Technology*, v. 219, p. 42–47, 2004.

SANTOSO, U; KUBO, K; OTA, T; TADOKORO, T; MAEKAWA, A. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chemistry*, v. 51, n. 2, p. 299-304, 1996.

SAPERS, G. M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technology*, v. 47, n. 10, p. 75-84, 1993.

SASAKI, N; FUKATSU, R; TSUZUKI, K; HAYASHI, Y; YOSHIDA, T; FUJII, N; KOIKE, T; WAKAYAMA, I; YANAGIHARA, R; GARRUTO, R; AMANO, N; MAKITA, Z. Advanced glycation end products in Alzheimer's diseases and other neurodegenerative diseases. *American Journal of Pathology*, v. 153, n. 4, p.1149-1155, 1998.

SCHILLING, S; SIGOLOTTO, C-I; CARLE, R; SCHIEBER, A. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry*, v. 22, p. 441–448, 2008.

SEBEKOVÁ, K; SOMOZA, V. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects\_PRO. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 51, p. 1079–1084, 2007.

SHIBAO, J; BASTOS, D. H. M. Maillard reaction products in foods: implications for human health. *Brazilian Journal of Nutrition*, v.24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SILVA, R. R; OLIVEIRA E SILVA; FONTES, H. R; ALVIANO, C. S; FERNANDES, P. D; ALVIANO, D. S. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. *BMC Complementary Alternative Medicine*, v. 13, n. 107, 2013.

SOARES, K; MORAIS, D; GÓIS, V; SILVA, J; COSTA, A; SILVA, L. Quality of unprocessed cooled fresh coconut water manually extracted by street vendors. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.84, p. 1-5, 2017

SUN, X; TANG, J; WANG, J; RASCO, B. A; LAI, K; HUANG, Y. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions. *Food Chemistry*, v. 172, p. 802–807, 2015.

SUN, X; TANG, J; WANG, J; RASCO, B. A; LAI, K; HUANG, Y. Formation of free and protein-bound carboxymethyllysine and carboxyethyllysine in meats during commercial sterilization. *Meat Science*, v. 116, p. 1-7, 2016.

SURIYA, A. C. N. P. Chapter 9- Coconut. *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production*, p. 201-216, 2016.

VAN DE MERBEL, N. C; MENTINK, C. J. A. L; HENDRIKS, G; WOLFFENBUTTEL, B. H. R. Liquid chromatographic method for the quantitative determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in human plasma proteins. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 163–168, 2004.

XANTHIS, A; HATZITOLIOS, A; KOLIAKOS, G; TATOLA, V. Advanced glycosylation end products and nutrition: a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 8 p. 125-129, 2007.

YABUTA G; KOIZUMI, Y; NAMIKI, K; HIDA, M; NAMIKI, M. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65: 2121, 2001.

YONG, J. W. H; GE, L; NG, Y. F, TAN, S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, v. 14, p. 5144–5164, 2009.

YUNOSHEV, V. K. Formation of compounds of the type quinone plus amino acid in tobacco. *Pishchevo Prom*, p 55–58, 1957.

YUNOSHEV, V.K. Changes of tobacco color and the content of polyphenolic substances. *Pishchevo Prom*, p. 23–39, 1958.

WEEMAES, C. A; LUDI KHUYSE, L. R; VAN DEN BROECK, I; HENDRICKX, M.E; TOBBACK, P.P. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Food Science and Technology*, v.31, p. 44–49, 1998.

WU, M. C; FANG, T. T. Prevention of pink discoloration in canned lychee fruit( *Litchi chinensis* Sonn). *Jornal of Chinese Agricultural Chemical Society*, v. 31, n. 5, p. 667-672, 1993.

ZHANG, G; HUANG, G; XIAO, L; MITCHELL, A. E. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 12037–12046, 2011.

## 5 CAPÍTULO II: CHEMICAL COMPOSITION OF THERMALLY PROCESSED COCONUT WATER EVALUATED BY GC-MS, UPLC-HRMS, AND NMR

### 5.1 Abstract

Analyses by NMR, UPLC-HRMS, GC-MS coupled to chemometrics were applied to understand the variations in chemical composition of coconut water submitted to thermal processing at 110 °C, which developed a pink color during storage in comparison to fresh water (control). According to chemometrics, processed water exhibited higher amounts of procyanidin trimer and dimer (type A), caffeoylshikimic acid, and unknown compounds. While, control water had higher amounts of trans-zeatin riboside, trans-zeatin derivative, procyanidin dimer, caffeoylshikimic acid and trihydroxy-octadecenoic acid. GC-MS analysis presented the decrease in lauric, myristic, and elaidic acids content, while processing increased palmitic and stearic acids content. NMR analysis presented reduction of the primary metabolites as sugars, short chain organic acids and ethanol by the processing. Procyanidin A-type dimer and trimer were identified solely in processed coconut water therefore, possibly are associated with pink color from processing and storage of coconut water.

*Keywords:* *Cocos nucifera*, sterilization, multivariate analysis, metabolites.

## 6 INTRODUCTION

Water extracted from green coconut is a natural drink widely consumed due to its health-associated nutrients as proteins, lipids, minerals, carbohydrates, and organic acids (Santoso, Kubo, Ota, Tadokoro, & Maekawa, 1996; Rolle, 2007; Debmandal & Mandal, 2011; Jirapong, Wongs-Aree, Noichinda, Uthairatanakij & Kanlayanarat, 2015). However, studies on coconut water chemical composition have been limited to constituents with nutritional relevance, although a greater diversity of compounds contribute to its special biological properties.

Coconut water is the liquid endosperm of immature coconuts and within a day of extraction from the nut and exposure to air, it undergoes chemical reactions and changes into a pink color (Prades, Dornier, Diop, & Pain, 2012). Discoloration have been associated with microbial or enzymatic browning activities (Murasaki-Aliberti, Silva, Gut & Tadini, 2009), however, this possibility was discarded as results showed that boiling of coconut water did not prevent pink color reaction (Damar, Balaban & Sims, 2009). In the food industry, thermal processing is the most common preservation method due to its effectiveness in microbiological and enzymatic control, thus enabling long-term commercialization (Awuah, Ramaswamy & Economides, 2007; Aguiar, Yamashita, & Gut, 2012). However, processing also induces discoloration reactions leading to decline in quality and acceptance of the final product (Jayanti, Rai, Dasgupta, & De, 2010).

Coconut water components have been analyzed by different techniques for various purposes as nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy with chemometrics to monitor quality variables (Sucupira, Alves-Filho, Silva, Brito, Wurlitzer & Sousa, 2017); gas chromatography (GC-MS) to characterize volatile (aroma) profile (Prades, Assa, Dornier, Pain & Boulanger, 2012) and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to

mass spectrometry (MS) to analyze different classes of phytohormones (Ma, Ge, Lee, Yong, Tan & Ong, 2008). The aim of this work was the evaluation of the chemical composition of coconut water subjected to ultra-high temperature (UHT) sterilization by using  $^1\text{H}$  NMR, UPLC-HRMS, GC-MS and chemometrics in order to identify chemical compounds that could be associated to changes from processing.

## 7 EXPERIMENTAL

### 7.1. Sampling

Immature green-colored coconuts (*Cocos nucifera* L.) with 6 to 7 months of development and harvested in Ceará state, Brazil, were initially rinsed in tap water and sanitized for 15 min in chlorinated water (100 mg.L<sup>-1</sup> of sodium hypochlorite). For fresh control sample, coconut water was extracted, filtered and frozen at  $-17 \pm 2$  °C until analysis.

#### 7.1.1 Thermal treatment

Processed samples were treated as reported by Sucupira, Alves Filho, Silva, Brito, Wurlitzer & Sousa (2017). After filtration, thermal treatment of samples was performed at 110 °C with retention time of 8 s using an tubular heat exchanger (Armfield model FT74™, Armfield Inc, USA), cooling with chiller Armfield FT63, filled under aseptic conditions in 210 mL glass bottles, closed with plastic screw cap. Previously, bottles were sterilized with 0.5% peracetic acid and rinsed with sterile water. Afterwards, processed coconut water kept at room temperature until color changed to pink (same time of storage for all processed samples) and then, was frozen at  $-17 \pm 2$  °C, until analyses. Thus, the experiment consisted of two samples, control fresh and processed coconut water with three biological repetitions, each.

## 8 UPLC-HRMS ANALYSIS

### 8.1 Extraction procedure

The solid phase extractions of control and processed coconut water samples were performed in octadecylsilane (C18; 500 mg, 6 mL) reverse phase cartridges (Supelco™, Supelclean ENVI™, 18.58  $\mu\text{m}$ , 58  $\text{\AA}$ ; Sigma, USA). Initially, the C18 cartridges were inserted into the manifold coupled to a vacuum pump and conditioned with 3 mL of HPLC grade methanol followed by addition of 3 mL of water. Subsequently, 25 mL of coconut water was added to each cartridge. Clean up was done applying 3 mL of water to eliminate sugars and amino acids from the extract. Finally, the compounds of interest were eluted by the addition of 5 mL of elution solvent 100% methanol HPLC grade. The removal of methanol was made on R-215 rotary evaporator (Buchi, Switzerland) at 40 °C and rotation of 20 rpm. The SPE was performed in triplicate for control and processed coconut water.

#### 8.1.1 Analysis

Ultra-Performance Liquid Chromatography- High Resolution- Mass Spectrometer (UPLC-HRMS) analysis was performed on an Acquity® UPLC system (Waters Co., USA) coupled with a Quadrupole/TOF system (Waters, USA). A Waters Acquity™ UPLC BEH column (150  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) was used with temperature set at 40 °C. Mobile phases were water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The gradient used consisted: (0-15) min, 2-95% B; (15.01-17.0) min, 100% B; (17.01–19.01) min, 2% B. The flow rate was 0.400 mL.min<sup>-1</sup>. The injection volume of sample was 5  $\mu\text{L}$ . Samples were dissolved in the water/methanol ratio (1:1) at 1 mg.mL<sup>-1</sup> concentration, and filtered

through Millipore™ Teflon membranes with 0.22  $\mu\text{m}$  pores. Analysis used electrospray ionization (ESI) interface in negative and positive ion modes acquired from 110 to 1180 Da. Source temperature was 120 °C, desolvation temperature was 350 °C and desolvation gas flow of 500 L.h<sup>-1</sup>. Leucine enkephaline was used as lock mass. The acquisition mode was MS<sup>E</sup> and the instrument controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Co., USA). Analyses were performed in triplicate.

#### *8.1.2.1. Chemometric analysis of UPLC-HRMS dataset*

Unsupervised chemometric analysis by Principal Component Analysis (PCA) was developed using both matrices acquired in negative and positive ionization modes, in triplicate. Program PLS Toolbox™ (version 8.6.2 Eigenvector Research Inc., USA) was used to handle the multivariate data and analyses were performed using chromatograms region between 0.7 and 7.5 min for negative ionization mode, and 2.0 and 7.8 min for positive ionization mode, resulting in two numerical matrices with dimensionalities of 12,438 (18 samples  $\times$  691 variables) and 11,664 (18 samples  $\times$  648 variables).

The PCA was performed to determine the relationship among the coconut water based on secondary metabolites, with 95% of confidence level. Pretreatment of variables was performed with baseline correction (linear fit algorithm) and normalization, and samples were mean-centered, once this pretreatment provided better differences between coconut water samples.



## 9 GC-MS ANALYSIS

### 9.1 Extraction and derivatization

Total lipids extracted from control and processed coconut water were analyzed as described by Bligh & Dyer (1959) with modifications. Water (300 mL) and 290 mL of chloroform were mixed in separating funnel, stirred vigorously and allowed to stand to liquid-liquid partition equilibrium. Chloroform, in the lower phase of separating funnel, was collected and the aqueous phase was re-used for further lipid extraction using the same volume of chloroform. The recovered chloroform was evaporated at 40 °C on rotary evaporator R-215 (Buchi, Switzerland).

The extraction procedure was performed in triplicate for each treatment. The derivatization of the fatty acids into volatile organic compounds (VOC) was performed according IAL (2008). In a screw-capped glass tube, 20 mg of lipids were solubilized with 3 mL of gas chromatography (GC)-grade hexane. Then, 4 mL of methanolic solution with 0.5 M NaOH were added to the tube, closed and kept in a water-bath (65-70 °C) for 4 min or until complete dissolution of the fat globules when solution remains transparent. After heating, the tube was cooled in running water and 5 mL of the esterifying solution (10 g of NH<sub>4</sub>Cl dissolved in 300 mL of methanol and 15 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was added. After closing tube, the mixture was vortexed for 30 s, kept in water bath at 65-70 °C for 5 min, then cooled under running water. Subsequently, 4 mL of aqueous solution of 36% NaCl were added and vortexed for 30 s, followed by addition of 3 mL of GC-grade hexane and vortexing. For recovery of esters, the mixture was placed in a separating funnel to separate the aqueous and organic phases, the organic phase containing the esters was removed with an automatic

micropipette and dried to remove hexane, then reconstituted with GC-grade hexane for the GC. Biological triplicates were performed for control and processed coconut water.

### ***9.1.1 Analysis***

Samples were analyzed in Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometer (GC-MS) (model 5977A Agilent Tech. Inc., USA) equipped with a HP-5MS (Agilent) fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 mm film thickness) connected to a quadrupole detector operating in the EI mode at 70 eV with a scan mass range of 35-500  $m/z$ . Helium was used as carrier gas at 1 mL.min<sup>-1</sup>. The injector and the interface temperatures were 250 and 280 °C, respectively, in split mode (1:30). The temperature ramp was: 35 °C, increased to 180 °C at 15 °C min<sup>-1</sup>, to 250 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. The final temperature (250 °C) was held for 10 min. Individual components were identified by comparing their linear retention indexes (LRI), with the obtained for a C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> n-alkanes series. For tentative identification, mass spectra were compared with the literature, with NIST mass spectral library as well as spectral data and Kovats index provided by Adams (2007).

#### ***9.1.2.1 Chemometric analysis of GC-MS dataset***

The same program and pretreatments applied for chemometric evaluation of UPLC-HRMS datasets were applied to GC-MS dataset. The region of the chromatograms between 10 and 18 min was used for the analysis, resulting in a numerical matrix with dimensionality of 8,976 (6 samples × 1,496 variables).

## 10 NMR ANALYSIS

Aliquot of coconut water (165  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 400  $\mu\text{L}$  of deuterated water ( $\text{D}_2\text{O}$ , 98%), 35  $\mu\text{L}$  of  $\text{D}_2\text{O}$  containing 1% of sodium-3-trimethylsilylpropionate (TMSP-2,2,3,3- $\text{d}_4$  98% purity) with 25 mM of EDTA, and transferred to 5 mm NMR (Nuclear Magnetic Resonance) tubes. EDTA was added to minimize the ionic strength effect on frequency shifts in the NMR spectra.

Analyses were performed on NMR spectrometer (600-MHz Agilent Tech. Inc., USA) equipped with a 5 mm ( $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$ / $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$ ) inverse detection One Probe™ with actively shielded z-gradient. The PRESAT pulse sequence was used to non-deuterated water suppression at chemical shift  $\delta$  4.85. The  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired under quantitative parameters, with 32 free induction decays (FID), 64k of time domain points with a spectral window of 20.0 ppm, acquisition time of 5.0 s, and a relaxation delay of 15.0 s, all after pulses calibration. Spectra were processed using zero filling to 64 k points, phased manually and referenced using TMSP- $\text{d}_4$  at  $\delta$  0.0 as internal reference, and temperature was controlled at 298 K.

Two-dimensional (2D) NMR analyses were performed using the standard spectrometer library pulse sequences.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY experiments were obtained with spectral width of 7,267.4 Hz in both dimensions;  $1\text{k} \times 200$  data matrix; 16 scans per  $t_1$  increment and relaxation delay of 1.0 s. One-bond  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHSQC experiments were acquired with an evolution delay of 3.425 ms for an average  $^1J(\text{C},\text{H})$  of 146 Hz;  $1\text{k} \times 200$  data matrix; 32 scans per  $t_1$  increment; spectral widths of 9,615.4 Hz in  $f_2$  and 30,165.9 Hz in  $f_1$  and relaxation delay of 1.0 s. Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHMBC experiments were recorded with an evolution delay of 62.5 ms for  $^{\text{LR}}J(\text{C},\text{H})$  of 8 Hz;  $1\text{k} \times 200$  data matrix; 64 scans per  $t_1$  increment; spectral width 9,615.4 Hz in  $f_2$  and 36,199.1 Hz in  $f_1$  and relaxation delay of 1.0 s.

### *10.1 Chemometric analysis of NMR dataset*

The same chemometric software and pretreatments applied to evaluate the UPLC-HRMS datasets were applied to  $^1\text{H}$  NMR dataset. The spectral region between  $\delta$  0.8 and 9.0 was selected, which resulted in a numerical matrix with dimensionality of 150,804 (18 samples  $\times$  8,378 variables into each spectrum). However, in order to enhance the chemical variability among the samples based on processing influence, the matrix was decomposed by Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) method using the Simplified PLS (SIMPLS) algorithm, and the samples were clustered as control or processed.

## 11 RESULTS AND DISCUSSION

Usually unsupervised multivariate analyses are applied to untargeted exploration of complex food matrices of data to observe variations and relationships between coconut water and its composition (Sucupira, Alves Filho, Silva, Brito, Wurlitzer & Sousa, 2017). Therefore, Principal Component Analysis (PCA) was developed to evaluate the coconut water variability under different processing conditions, using different analytical techniques.

### 11.1 Metabolites assayed by UPLC-HRMS

PCA was applied to reduce the dimensionality of the original data into two PCs and to assist the interpretation of the multivariate data. Figures 1 and 2 illustrate the PCA results from UPLC-HRMS datasets of the coconut water analyzed under negative and positive ionization modes, respectively, while Tables 1 and 2 describe the respective parameters for characterization of the relevant compounds as secondary metabolites, in chemometric evaluation ( $m/z$  values and fragmentation profiles).

According to negative ionization mode, PC1  $\times$  PC2 scores show a tendency of separation of samples with 53.61% of total variance (Fig. 1a). PC1 was the main axis related to coconut water separation based on processing. The loading (Fig. 1b) highlighted the greater amounts of compounds represented by numbers 2, 5 and 6 in processed water, while compounds 1, 3, 4, and 10 were more abundant in control water.

Table 1 shows that compound 1 is a cytokinin, a phytohormone involved with regulation of plant growth and development that was reportedly found in coconut milk by Kobayashi *et al.* (1995) and Van Staden & Drewes (1975). Compounds 2, 3 and 6 are a trimer (type B), dimer (type B) and dimer (type A) of procyanidin, respectively, detected in both

processed (2 and 6) and control (3) water. These compounds were found in inflorescence of *Cocos nucifera* L. and their monomers, (+)-catechin and (-)-epicatechin were quantified by LC–MS in coconut water (Padumadasa, Dharmadana & Abeysekera, 2016; Chang & Wu, 2011). Compound 6 is procyanidin dimer with A-type ether bond, C2-O-C7, besides the C4-C8 bond. While, compound 2 is B-type trimeric procyanidin composed of three subunits linked by C4-C8 bonds, thus both oligomeric procyanidins, constituted for flavan-3-ols units are precursors of anthocyanin pigments. It is possible that B-trimer and A-dimer procyanidin observed in processed coconut water are associated with development of pink color, once colorless procyanidin are known to enhance red color of anthocyanin solutions by preferentially interacting ( $\delta$ - stacking) with the planar chromophore of the flavylum form, thus increasing its concentration (Malien-Aubert, Dangles & Amiot, 2002; Reichel, Carle, Sruamsiri & Neidhart, 2011). These authors reported that increase in polymeric degree improves the color stability.

Compounds 4 e 5 represent caffeoylshikimic acid, which is derived from caffeic acid and an intermediate of the synthesis of polymeric phenolics in plant cells, found in fresh and processed coconut water, respectively. Caffeoylshikimic acid detected in young coconut mesocarp has been associated to plant defense due to antioxidant and antimicrobial properties (Chakraborty & Mitra, 2008). Moreover, compounds 4 (caffeoylshikimic acid) and 11 (dicaffeoyl quinic acid) present in control water, have a dioxygenated phenylpropanoid structure and can act as substrates of browning-associated enzyme polyphenoloxidase (PPO). Also abundant in control water, the compound 10 is an oxidized fatty acid trihydroxy-octadecenoic acid, which has been associated with wound signals that triggers phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity through jasmonic acid pathway, thus stimulating phenolic biosynthesis (García, García-Villalba, Gil, & Tomas-Barberan, 2017). Therefore, metabolites numbered 4, 10, and 11 could be involved as substrates and signals triggering color reactions

in coconut water. Recently, García, Gil & Tomas-Barberan (2018) confirmed the involvement of metabolites caffeoylquinic acid and trihydroxy-octadecenoic acid as biomarkers of pink-color development in fresh-cut lettuce. Although compounds 8, 9, 13 and 14 were not identified, they were found only in processed water, thus could be involved in color changes.

According to positive ionization mode, PC2 × PC3 scores show the tendency of separation of the samples with 18.75% of the total variance (Fig. 2a). Axes PC2 and PC3 were related to separation of coconut water based on processing, thus compounds represented by numbers 1 and 2 were higher in control samples, and compounds 3 and 4 were higher in processed water (Fig. 2b). Table 2 shows that compounds 1 and 2 are trans-zeatin derivative and trans-zeatin riboside (confirmed in negative mode), respectively, both naturally-occurring phytohormones previously identified in coconut (Kobayashi *et al.*, 1995; Ge, Yong, Tan, Yang & Ong, 2004). Compounds 3 and 4 are unknown in literature and found only in processed coconut water.

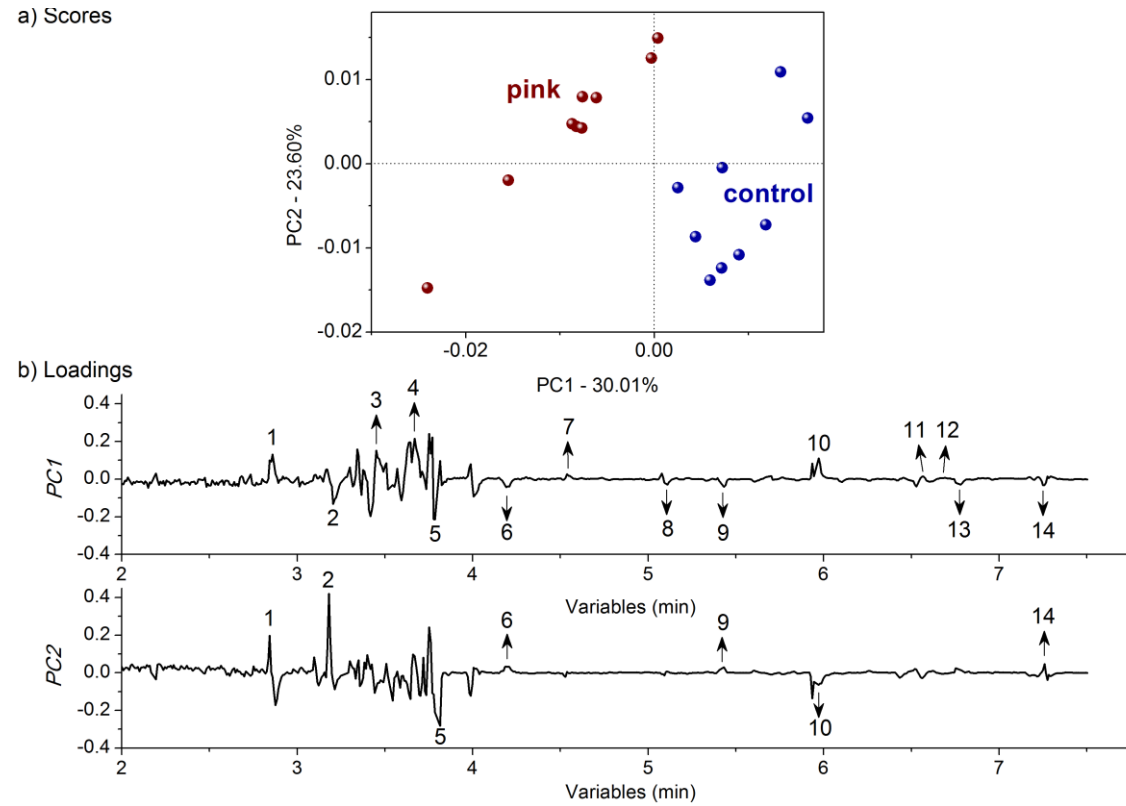


Figure 3. Two-dimensional space plot for PC1  $\times$  PC2 scores coordinate system of the coconut water under negative ionization mode (a) and relevant loading plotted in lines form (b).



Table 3. Tentative peak (#) assignment identified by UPLC-HRMS in negative ion mode tentative of organic compounds from secondary metabolism of fresh and processed coconut water.

#	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> obs.	[M-H] <sup>-</sup> calc.	Prod. ion	Empirical formula	Ppm error	Compounds	Ref.
1	2.86	1100.3920	1100.3894	968.3441; 836.3017; 806.2991; 644.2291; 512.1919	C <sub>43</sub> H <sub>66</sub> N <sub>5</sub> O <sub>28</sub>	2.4	14-O-{3-O-[β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-D-galactopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinofuranosyl]-4-O-(α-L-arabinofuranosyl)-β-D-galactopyranosyl}-trans-zeatin riboside	Kobayashi <i>et al.</i> (1995)
2	3.19	865.1958	865.1980	739.1705; 695.1409; 577.1321; 425.0870; 287.0544	C <sub>45</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub>	-2.5	Procyanidin trimer (type B)	Hanhineva <i>et al.</i> (2008)
3	3.47	577.1336	577.1346	451.1045; 425.0854; 407.0735; 289.0669; 245.0786; 125.0212	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	-1.7	Procyanidin dimer (type B)	Hanhineva <i>et al.</i> (2008)
4	3.68	335.0708	335.0708	179.0325; 161.0212; 135.0418	C <sub>23</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	0.0	Caffeoylshikimic acid	Kang <i>et al.</i> (2016)
5	3.77	335.0718	335.0708	179.0276; 161.0210; 135.0404	C <sub>23</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	3.0	Caffeoylshikimic acid	Kang <i>et al.</i> (2016)
6	4.20	575.1179	575.1190	539.0944; 449.0854; 423.0820; 407.0853; 289.0759; 285.0396	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	-1.9	Procyanidin dimer (type A)	Zhang & Zhu (2015)
7	4.53	461.1075	461.1084	341.0847; 323.0992; 299.0511; 284.0263	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	-2.0	Chrysoeriol hexoside I	Kang <i>et al.</i> (2016)
8	5.07	343.1539	343.1545	255.1743	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub>	-1.7	Unknown	-
9	5.43	198.0784	198.0780	-	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	2.0	Unknown	-
10	5.97	329.2313	329.2328	311.2167; 293.2081; 229.1416; 211.1310; 171.0996	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	-4.6	Trihydroxy-octadecanoic acid	Llorent-Martínez <i>et al.</i> (2017)
11	6.52	515.2451	515.2492	353.2064; 209.1537; 125.0789	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O <sub>11</sub>	-8.0	Dicaffeoyl quinic acid	Farag <i>et al.</i> (2013).
12	6.62	503.3389	503.3373	217.1215	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>6</sub>	3.2	(+)-Arjungenin	Zhou <i>et al.</i> (2018).
13	6.77	515.2455	515.2434	426.9656; 406.9587; 341.1802; 315.0395; 241.0134; 199.1682	C <sub>32</sub> H <sub>35</sub> O <sub>6</sub>	4.1	Unknown	-
14	7.27	236.1015	236.1008	221.1506; 220.1449; 192.1133; 177.0881	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>9</sub> O	3.0	Unknown	-

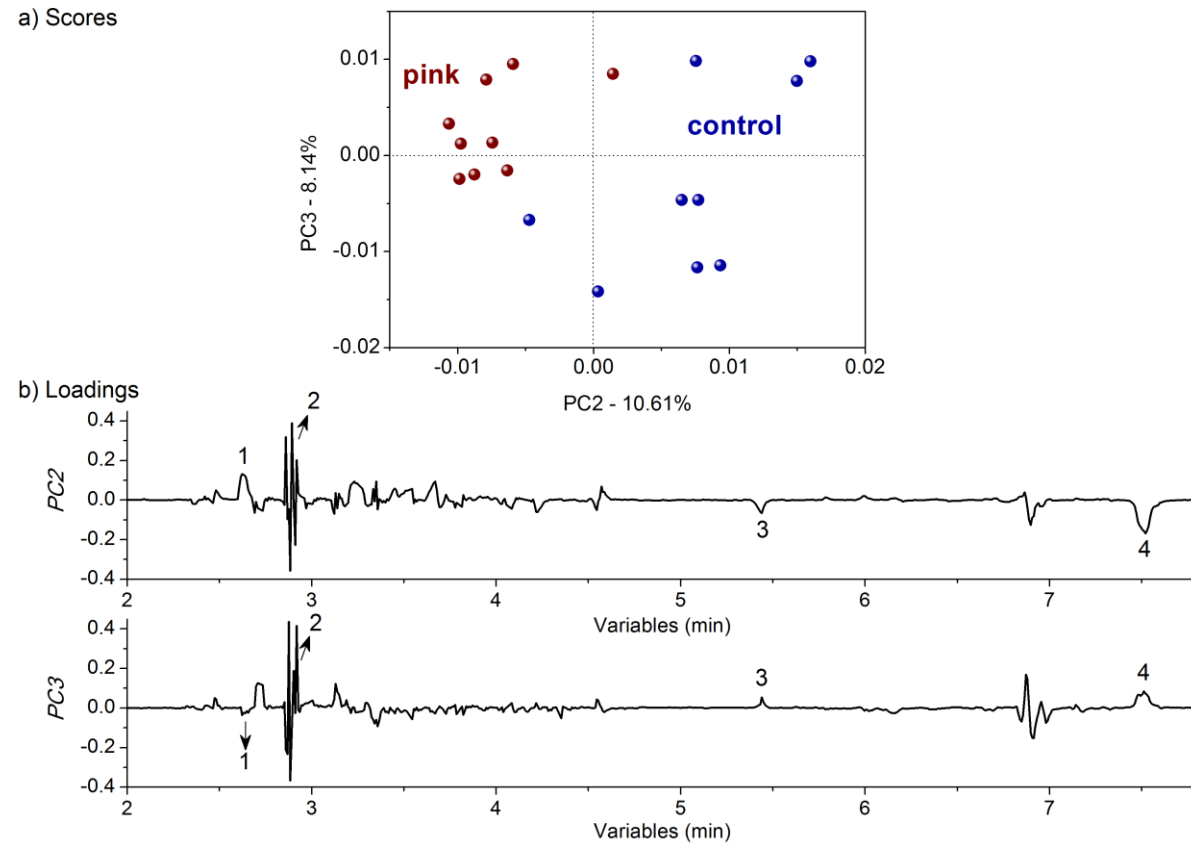


Figure 4. Two-dimensional space plot for  $PC2 \times PC3$  scores coordinate system of the coconut water under positive ionization mode

(a) and relevant loading plotted in lines form (b).

Table 4. Tentative peak (#) assignment identified by UPLC-HRMS in positive ion mode of the organic compounds from secondary metabolism of fresh and processed coconut water.

#	RT (min)	[M-H] <sup>+</sup> obs.	[M-H] <sup>+</sup> calc.	Prod. ion	Empirical formula	ppm error	Compounds	Ref.
1	2.63	970.5812	970.5811	838.4927; 808.5039; 646.4130; 514.3276; 220.1659	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> N <sub>5</sub> O <sub>18</sub>	0.1	trans-Zeatin derivative	Zhao <i>et al.</i> (2013)
2	2.90	1102.4089	1102.4051	970.5733; 808.4877; 646.3964; 514.3232; 352.2343; 220.1646	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> N <sub>5</sub> O <sub>28</sub>	3.4	14-O-{3-O-[β-D-galactopyranosyl- (1→2)-α-D-galactopyranosyl- (1→3)-α-L-arabinofuranosyl]- 4-O-(α-L-arabinofuranosyl)-β-D- galactopyranosyl}-trans-zeatin riboside	Kobayashi <i>et al.</i> (1995)
3	5.44	200.0932	200.0936	-	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub>	-2.0	Unknown	-
4	7.52	475.2904	475.2907	431.2616; 387.2361; 171.1388	C <sub>24</sub> H <sub>43</sub> O <sub>9</sub>	-0.6	Unknown	-

### 11.1.1 Evaluation by GC-MS

Figure 3 presents the scores (a) and relevant loadings (b) with fatty acids derivatized into volatile organic compounds (VOC) from processed coconut water. PC1 was the main axis related to coconut water separation based on processing and loadings showed that lauric (C12:0), myristic (C14:0), and elaidic (C18:1) acids were abundant in control, while palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids were higher in processed water. Table 3 describes these relevant VOC with the respective retention time (RT), retention index (RI), major  $m/z$  ratio, and percentage of match.

Loadings showed that lauric, myristic, and elaidic acids content declined with the processing, with the respective increase of palmitic and stearic acids. Previously, Fonseca *et al.* (2009) and Santoso, Kubo, Ota, Tadokoro, & Maekawa, (1996) reported the presence of long chain fatty acids such as palmitic, myristic, elaidic and stearic acids in water of green dwarf coconut. Moreover, the presence of saturated long chain fatty acids as palmitic (C16:0) and stearic acids (C18:0) in processed coconut water can be associated with resistance to oxidative reactions as observed in oil coconut (Yousefi, Nateghi, & Rezaee, 2013). As the coconut is open, there is an increase in production of free radicals as reactive oxygen species (ROS), which may cause oxidative damage to plant cell components, especially polyunsaturated fatty acids thus, these were not detected in processed coconut water, but only in control (Evans & Halliwell, 2001).

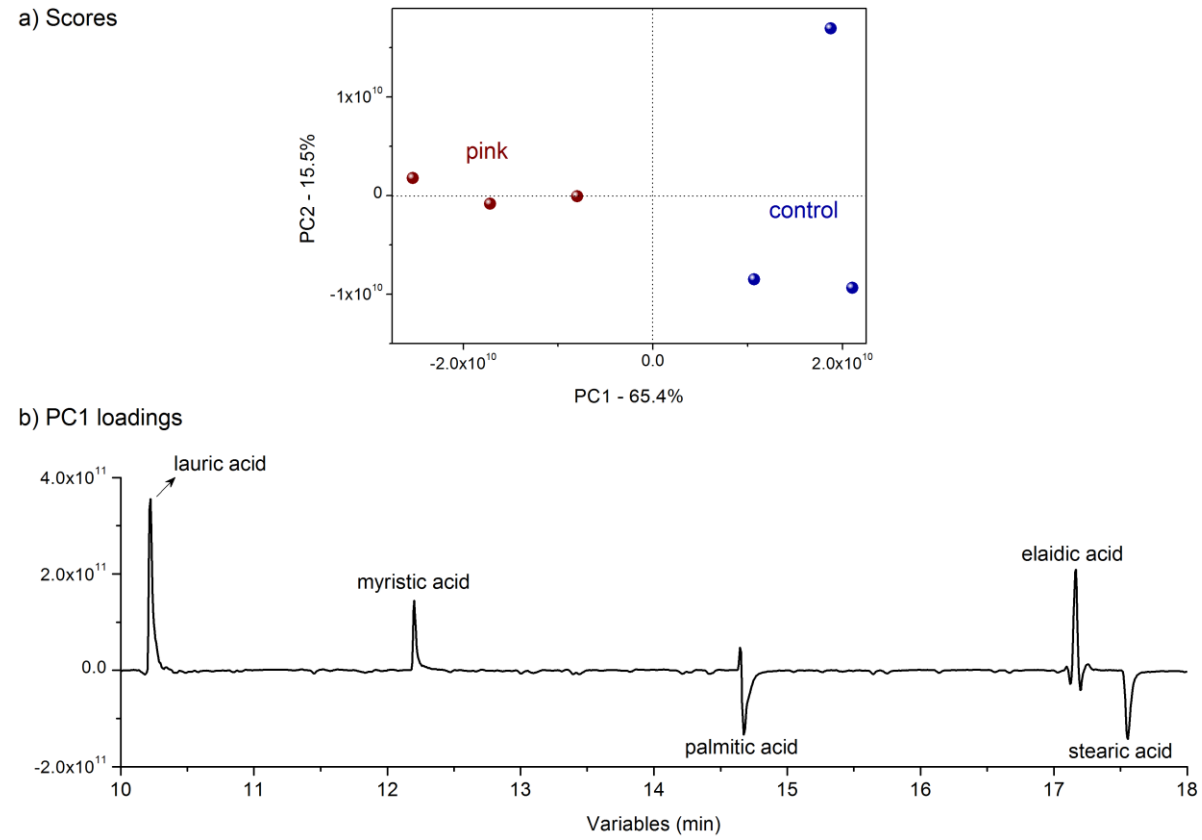


Figure 5. Two-dimensional space plot for PC1  $\times$  PC2 scores coordinate system of the coconut water (a) and relevant loading plotted in lines form (b).

Table 5. Relevant organic compounds detected in coconut water under different processing condition, with respective retention times (RT), experimental and reference retention index (RI), major  $m/z$  peak, and percentage (%) of match.

<b>RT (min)</b>	<b>Compounds</b>	<b>RI* refer.</b>	<b>RI exp.</b>	<b>Major <math>m/z</math></b>	<b>Match (%)</b>	<b>Ref.</b>
10.24	Lauric acid	1527	1532	74	94.5	Alissandrakis, Tarantilis, Harizanis & Polissiou (2007)
12.20	Myristic acid	1727	1731	74	94.9	Radulović, Blagojević & Palić (2010)
14.67	Palmitic acid	1928.1	1929	74	95.7	Zeng <i>et al.</i> (2007)
17.17	Elaidic acid	2109.8	2106	55	94.7	Tret'yakov (2007)
17.55	Stearic acid	2128	2130	74	93.2	Palmeira <i>et al.</i> (2004)

\* RI – Retention index: retention times using n-alkenes series (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>) converted in independent constants.

### 11.1.2.1 Evaluation by NMR

Due to the great amounts of identified compounds and the inherent similarity between the control and processed coconut water, two supervised chemometric approach by PLS-DA were developed in order to maximize the differences between the control and processed coconut waters, one for each relevant region into the  $^1\text{H}$  NMR spectra, separately. The classification results from the aliphatic region between the chemical shifts  $\delta$  0.8 and 3.0 are illustrated in Figures 4a (scores) and 4b (relevant loadings); and from the carbinolic region between  $\delta$  3.0 and 5.5 in Figures 4c (scores) and 4d (loadings). In both analyses, the control samples (coconut water before processing) were located at negative scores of PC1, while the processed samples at positive scores of the same PC. Based on the LV1 loadings, the most relevant compounds for discrimination of control and processed water were sucrose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose, fructose, ethanol, valine, lactic, acetic, and malic acids, which decreased by the processing.

Table 4 shows that  $^1\text{H}$  NMR spectra of control and processed coconut water presented compounds in three different regions with high levels of sugar and aliphatic structures, since the chemical shifts were found for  $\alpha$ -carbonylic/alkyl residue hydrogen ( $\delta$  1.0 to 3.0) and carbinolic hydrogen ( $\delta$  3.0 to 5.5) (Vigliar, Sdepanian, & Fagundes-Neto, 2006; Yong, Ge, Ng, & Tan, 2009; Sucupira, Alves Filho, Silva, Brito, Wurlitzer, & Sousa, 2017). Formic acid was the only compound identified in aldehydic and aromatic chemical shifts ( $\delta$  6.0 to 9.3), at  $\delta$  8.47. Ethanol is not a contaminant of processing once its presence also was verified in control coconut water.

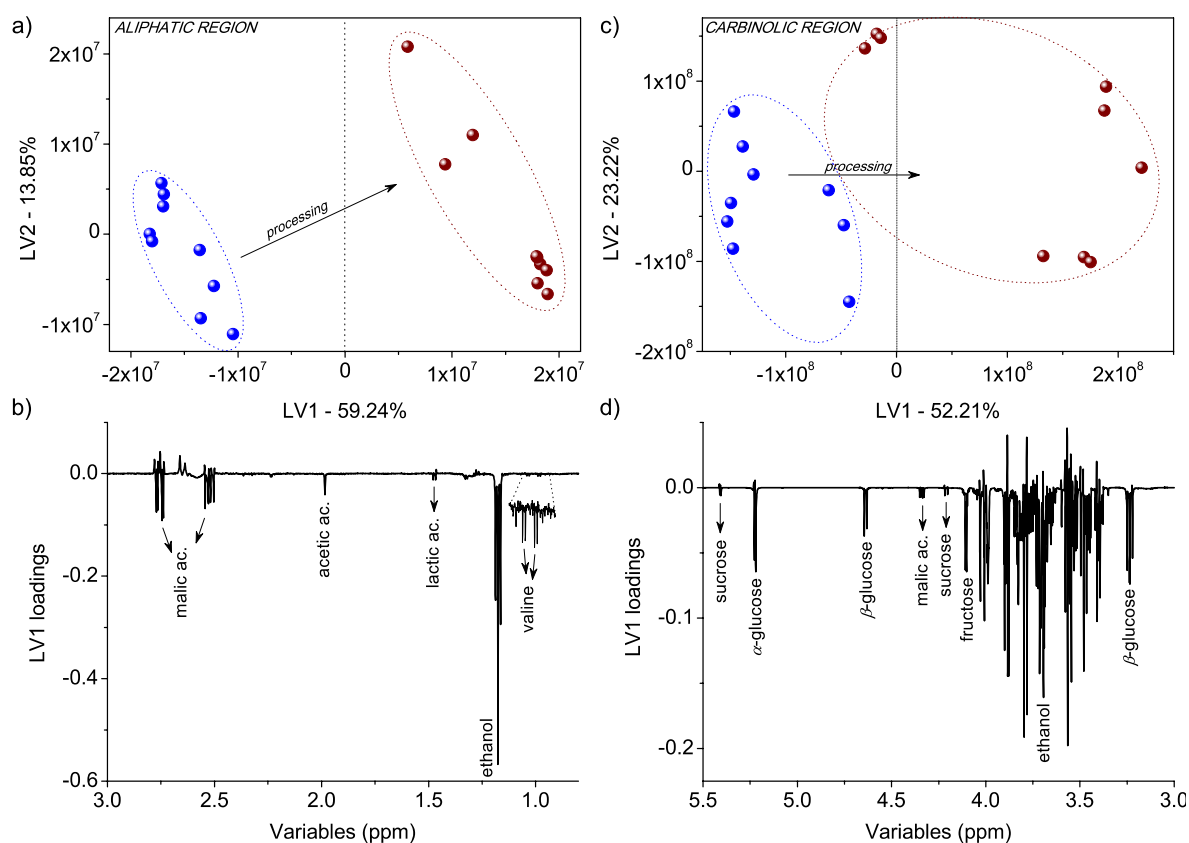
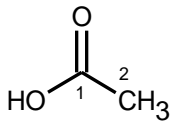
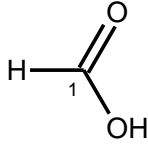
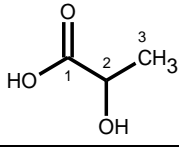
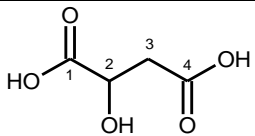
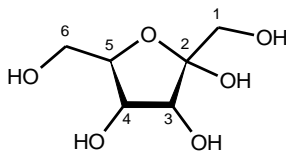
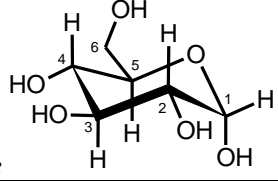
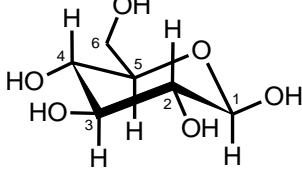
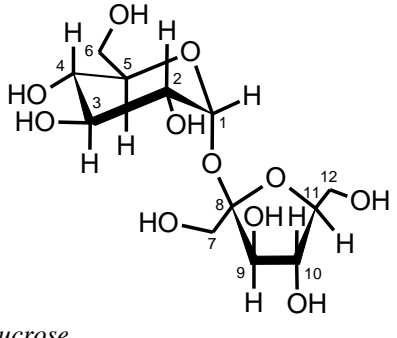
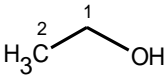


Figure 6. The classification results from the aliphatic region between the chemical shifts  $\delta$  0.8 and 3.0 illustrated by scores (a) and the relevant loadings (b); and those from the carbinolic region between  $\delta$  3.0 and 5.5 by scores (c) and loadings (d).



Table 6. Primary metabolites identified by  $^1\text{H}$  NMR of control and processed coconut water.

	Structure	$\delta$ $^1\text{H}$ (multip.* J in Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ ref.	$\delta$ $^{13}\text{C}$ ref.
ORGANIC ACIDS	 Acetic	1 - no 2 - 1.93 (s)	176.9 22.4	no 2.08 (s)	184.1 26.0
	 Formic	1 - 8.47 (s)	no	8.39 (s)	172.4
	 Lactic	3 - 1.33 (d 7.2) 2 - 4.12 (d 7.2)	23.0 71.4	1.37 (d 7.2) 4.42 (q 7.2)	22.9 71.4
	 Malic	3 - 2.51 (m) 3 - 2.77 (m) 2 - 4.33 (m)	48.5 48.5 74.9	2.68 (dd) 2.85 (dd) 4.28 (m)	45.5 45.5 73.2
SUGARS	 Fructose	1 - o 2 - 3 - 4.14 (m) 4 - o 5 - o 6 - 4.01 (m)	o 104.7 77.6 o o 64.1	- - 4.11 (m) 4.11 (m) - 4.01 (m)	65.5 104.2 77.4 72.5 72.1 66.1
	 $\alpha$ -glucose	1 - 5.25 (d 3.8) 2 - 3.48 (o) 3 - 3.79 (o) 4 - 3.52 (o) 5 - 3.70 (o) 6 - 3.88 (o)	95.0 72.5 75.1 74.3 64.4 74.5	5.25 (d 3.8) 3.89-3.36 (o) - - - -	95.4 72.2 76.0 72.8 64.2 74.5
	 $\beta$ -glucose	1 - 4.67 (d 7.90) 2 - 3.27 (m) 3 - 3.71 (m) 4 - 3.50 (m) 5 - 3.43 (m) 6 - 3.87 (m)	98.9 77.9 64.0 79.0 72.4 63.9	4.66 (d 8.1) 3.25 (t 8.4) - - - -	99.2 77.6 56.1 79.0 72.8 63.1
	 Sucrose	1 - 5.43 (d 3.7) 2 - 3.56 (o) 3 - 3.76 (o) 4 - 3.48 (o) 5 - 3.85 (o) 6 - 3.82 (o) 7 - 3.82 (o) 8 - no 9 - 4.22 (m) 10 - 4.05 (m) 11 - 3.89 (o) 12 - 3.68 (o)	95.2 74.5 75.7 72.1 75.8 62.9 65.4 104.7 79.3 77.0 84.1 64.8	5.44 (d 3.8) 3.89-3.57 (m) 3.74 (m) 3.47 (m) 3.83 (m) 3.81 (m) 3.66 (m) no 4.20 (t 8.4) 4.08 (d 9.0) 3.87 (m) 3.81 (m)	94.7 73.5 75.3 71.8 74.9 62.8 64.0 106.3 79.0 76.6 84.0 65.0
OTHER COMPOUNDS	 Ethanol	1 - 3.65 (o) 2 - 1.16 (t 7.20)	54.5 21.2	3.64 (q 7.08) 1.17 (t 7.08)	60.3 19.6

(s) simplet; (d) duplet; (t) triplet; (q) quadruplet; (quin) quintet; (dd) double duplet; (o) overlapping signal; (no) not observed, (-) no information, (m) multiplet.

## 12 CONCLUSIONS

Based on the analyses performed on fresh and processed pink-colored coconut water, NMR results for the primary metabolites did not differ between samples and fructose and  $\alpha$  and  $\beta$  glucoses were predominant. From GC-MS analyses, long chain saturated palmitic and stearic acids were identified in processed coconut water, possibly as result of oxidative reactions after nut opening. UPLC-HRMS analyses pointed out the greater differences between samples for secondary metabolites. The compounds identified solely in processed coconut water were procyanidin A-type dimer and trimer, in negative ionization mode. Moreover, other compounds were not identified (8, 9, 13 and 14) in negative ionization and positive ionization modes (3,4). Therefore, it could be inferred that these polymeric procyanidin could be associated with pink color development after processing and storage of coconut water once colorless procyanidin are known to enhance red color of anthocyanin solutions increasing its concentration.

In summary, this study suggests that the color appearance on processed and stored coconut water depends on a combination of factors, including accumulation of some metabolites in the endosperm. Future isolations with the structural elucidation of the 520 nm absorbing compounds and the understanding of the mechanisms action involved in color formation. This information may be useful for optimizing the formulation and processing conditions to create tastier and healthier coconut water.

### *Acknowledgements*

The authors thank the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais-INCT/CNPq, Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -

CAPES, Brazil - Finance Code 001, for financial support, and FUNCAP for the scholarships (314737/2018-9) and (DCR-0024-01686.01.00/15).

## REFERENCES

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. (4th ed.). Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGUIAR, H. de F., YAMASHITA, A. S., & GUT, J. A. W. Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **LWT - Food Science and Technology**, 47(1), 110–116, 2012.
- ALISSANDRAKIS, E., TARANTILIS, P. A., HARIZANIS, P. C., & POLISSIOU, M. (2007). Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(20), 2007.
- AWUAH, G. B., RAMASWAMY, H. S., & ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 46(6), 584–602, 2007.
- BLIGH, E. G., & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37(8), 911-917, 1959
- CHAKRABORTY, M., & MITRA, A. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. **Food Chemistry**, 107(3), 994–999, 2008.
- CHANG, C. L., & WU, R. T. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC-MS. **Food Chemistry**, 126(2), 710–717, 2011.
- Da FONSECA, A. M., BIZERRA, A. M. C., De SOUZA, J. S. N., MONTE, F. J. Q., De OLIVEIRA, M. D. C. F., De MATTOS, M. C., CORDELL, G. A., BRAZ-FILHO, R & LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Brazilian Journal of Pharmacology**, 19(1 B), 193–198, 2009.
- DAMAR, S., BALABAN, M. O., & SIMS, C. A. Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of a coconut water beverage. **Food Science & Technology**, 44, 666–673, 2009.
- DEBMANDAL, M., & MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L. : Areaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 4(3), 241–247, 2011.
- EVANS, P., & HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, 85, 2001.
- FARAG, M. A., WEIGEND, M., LUEBERT, F., BROKAMP, G., & WESSJOHANN, L. A. Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC-Q-TOF-MS metabolomic profiles. **Phytochemistry**, 96, 170–183, 2013.
- GARCÍA, C. J., GARCÍA-VILLALBA, R., GIL, M. I., & TOMAS-BARBERAN, F. A. LC-MS Untargeted Metabolomics to Explain the Signal Metabolites Inducing Browning in Fresh-Cut Lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65(22), 4526–4535, 2017.

GARCÍA, C. J., GIL, M. I., & TOMAS-BARBERAN, F. A. LC–MS untargeted metabolomics reveals early biomarkers to predict browning of fresh-cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, *146*, 9–17, 2018.

GE, L., YONG, J. W. H., TAN, S. N., YANG, X. H., & ONG, E. S. Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, *1048*(1), 119–126, 2004.

HANHINEVA, K., ROGACHEV, I., KOKKO, H., MINTZ-ORON, S., VENGER, I., KÄRENLAMPI, S., & AHARONI, A. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, *69*(13), 2463–2481, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. **Procedimentos e determinações gerais**. In: Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos. (4th ed.). São Paulo: IMESP, (Chapter IV, 55-134p.), 2008.

JAYANTI, V. K., RAI, P., DASGUPTA, S., & De, S. Quantification of flux decline and design of ultrafiltration system for clarification of tender coconut water. **Journal of Food Process Engineering**, *33*(1), 128–143, 2010.

JIRAPONG, C., WONGS-AREE, C., NOICHINDA, S., UTHAIRATANAKIJ, A., KANLAYANARAT, S. Assessment of volatile and non-volatile organic compounds in the liquid endosperm of young ‘Nam Hom’ coconut (*Cocos nucifera* L.) at two stages of maturity. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, *90*(5), 477–482, 2015.

KANG, J., PRICE, W. E., ASHTON, J., TAPSELL, L. C., & JOHNSON, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MS<sup>n</sup>. **Food Chemistry**, *211*, 215–226, 2016.

KOBAYASHI, H., MORISAKI, N., TAGO, Y., HASHIMOTO, Y., IWASAKI, S., KAWACHI, E., NAGATA, R & SHUDO, K. Identification of a major cytokinin in coconut milk. **Experientia**, *51*(11), 1081–1084, 1995.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., ORTEGA-BARRALES, P., ZENGIN, G., MOCAN, A., SIMIRGIOTIS, M. J., CEYLAN, R., UYSAL, S., & AKTUMSEK, A. Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential sources of bioactive compounds for the food industry. **Food and Chemical Toxicology**, *107*, 609–619, 2017.

MA, Z., GE, L., LEE, A. S. Y., YONG, J. W. H., TAN, S. N., & ONG, E. S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, *610*(2), 274–281, 2008.

MALIEN-AUBERT, C., DANGLES, O., & AMIOT, M. J. Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *50*(11), 3299–3305, 2002.

MURASAKI-ALIBERTI, N. C., SILVA, R. M. S., GUT, J. A. W., TADINI, C. C. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in green coconut (*Cocos nucifera*) water. **International Journal of Food Science and Technology**, 44, 2662–2668, 2009.

PADUMADASA, C., DHARMADANA, D., & ABEYSEKERA, A. M. Distribution of progestogenic proanthocyanidins within the inflorescence of *Cocos nucifera* L. **Journal of Medicinal Plants Studies**, 4(4), 38–43, 2016.

PALMEIRA, S. F., MOURA, F. DE S., ALVES, V. de L., OLIVEIRA, F. M. DE, BENTO, E. S., CONSERVA, L. M., & ANDRADE, E. H. DE A. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal**, 19(1), 69–71, 2004.

PRADES, A., ASSA, R. R. A., DORNIER, M., PAIN, J. P., & BOULANGER. Characterisation of the volatile profile of coconut water from five varieties using an optimised HS-SPME-GC analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 92(12), 2471–2478, 2012.

PRADES, A., DORNIER, M., DIOP, N., & PAIN, J.-P. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, 67(2), 87–107, 2012.

RADULOVIĆ, N., BLAGOJEVIĆ, P., & PALIĆ, R. Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L.(Ericaceae). **Molecules**, 15(9), 6168–6185, 2010.

REICHEL, M., CARLE, R., SRUAMSIRI, P., & NEIDHART, S. Changes in flavonoids and nonphenolic pigments during on-tree maturation and postharvest pericarp browning of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) as shown by HPLC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(8), 3924–3939, 2011.

ROLLE, R. **Good practice for the small-scale production of bottled coconut water**. FAO. Rome, 2007.

SANTOSO, U., KUBO, K., OTA, T., TADOKORO, T., & MAEKAWA, A. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, 57(2), 299–304. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00237-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00237-5), 1996.

SUCUPIRA, N. R., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., DE BRITO, E. S., WURLITZER, N. J., & SOUSA, P. H. M. NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. **Food Chemistry**, 216, 217–224, 2017.

TRETYAKOV, K., V. (2007). **Retention data NIST mass spectrometry data center**. <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/C13H26O2Si/c1-5-6-7-8-9-10-11-12-13%2814%291516%282,3%294/h5H,1,6-12H2,2-4H3>. Accessed 29 December 2014.

VAN STADEN, J., & DREWES, S.E. (1975). Identification of zeatin and zeatin riboside in coconut milk. **Physiologia Plantarum**, 34 (2), 106–109, 1975.

VIGLIAR, R., SDEPANIAN, V. L., & FAGUNDES-NETO, U. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an inland region. **Jornal de Pediatria**, 82(4), 308–312, 2006.

Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos Nucifera* L.) water. **Molecules**, *14*(12), 5144–5164, 2009.

YOUSEFI, M., NATEGHI, L., & REZAEI, K. Investigation of physicochemical properties, fatty acids profile and sterol content in Malaysian coconut and palm oil. **Annals of Biological Research**, *4*(4), 214–219, 2013.

ZANG, S., & ZHU, M. J. Characterization of Polyphenolics in Grape Pomace Extracts Using ESI Q-TOF MS/MS. **Journal of Food Science & Nutrition**, *1*(1), 1–10, 2015.

Zeng, Y. X., Zhao, C. X., Liang, Y. Z., Yang, H., Fang, H. Z., Yi, L. Z., & Zeng, Z. Da. Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China. **Analytica Chimica Acta**, *595*(1–2 SPEC. ISS.), 328–339, 2007.

ZHAO, H., JIANG, M., LIANG, Q., XIE, C., SONG, S., WANG, J., BAI, G., & LUO, G. Fragmentation pathway studies of several plant hormones using an electrospray ionization-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. **International Journal of Mass Spectrometry**, *335*, 7–15, 2013.

ZHOU, J., YI, H., ZHAO, Z-X., SHANG, X-Y., ZHU, M-J., KUANG, G-J., ZHU, C-C., & ZHANG, L. Simultaneous qualitative and quantitative evaluation of Ilex kudingcha C. J. tseng by using UPLC and UHPLC-qTOF-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *155*, 15–26, 2018.