



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

**POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ENZIMÁTICA DE AGUA DE COCO (*Cocos nucifera*) VERDE Y
MADURO**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

ABRAHAM JESÚS ARZETA RÍOS

Bajo la supervisión de: BENITO REYES TREJO, DR.



APROBADA



Chapingo, Estado de México, abril de 2022

**COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ENZIMÁTICA DE AGUA DE COCO (*Cocos nucifera*) VERDE Y
MADURO**

Tesis realizada por **ABRAHAM JESÚS ARZETA RÍOS** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

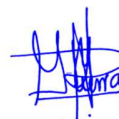
DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:



DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

ASESOR:



DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

LECTOR EXTERNO:



**DR. RUBÉN FRANCISCO GONZÁLEZ
LAREDO**

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	15
1.1. Objetivo general.....	16
1.2. Objetivos específicos	16
1.3. Hipótesis.....	17
1.4. Organización de la tesis	17
1.5. Literatura citada	18
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
2.1. El cocotero.....	20
2.1.1. Taxonomía y características	20
2.1.2. Utilidad.....	22
2.2. Agua de coco	23
2.2.1. Composición química	23
2.2.2. Usos	25
2.3. Estudios sobre el agua de coco.....	26
2.3.1. Procesos de conservación.....	26
2.3.2. Actividad enzimática	27
2.3.3. Metabolómica y quimiometría	27
2.3.4. Propiedades sensoriales.....	30
2.4. Literatura citada	30

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFIL AROMÁTICO DEL AGUA DE COCO VERDE Y MADURO	35
3.1. Introducción	37
3.2. Materiales y métodos.....	38
3.2.1. Químicos y reactivos	38
3.2.2. Muestreo.....	38
3.2.3. Análisis de RMN	39
3.2.4. Análisis HS-SPME-GC-MS	39
3.3. Resultados y discusión	40
3.3.1. Análisis de RMN	40
3.3.2. Análisis HS-SPME-GC-MS	44
3.4. Conclusiones	47
3.5. Agradecimientos	47
3.6. Literatura citada	47
4. CHANGES IN CHEMICAL COMPOSITION OF GREEN AND MATURE COCONUT WATER AFTER STORAGE.....	49
4.1. Introduction	51
4.2. Materials and methods	53
4.2.1. Plant material.....	53
4.2.2. Storage conditions	53
4.2.3. Chemicals and reagents	53
4.2.4. Determination of physicochemical properties	53
4.2.5. NMR spectroscopy	54
4.2.6. Chemometrics.....	54
4.3. Results and discussion	55
4.3.1. Effect of storage on pH, °Brix, and conductivity	55
4.3.2. Characterization of the ¹ H-NMR profile.....	57
4.3.3. Chemometric analysis	59
4.4. Conclusions	63
4.5. References	64
5. EFECTO DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO DEL AGUA DE COCO EVALUADO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE RMN Y QUIMIOMETRÍA...	68

5.1. Introducción	70
5.2. Materiales y métodos.....	73
5.2.1. Químicos y reactivos	73
5.2.2. Preparación de la muestra.....	73
5.2.3. Tratamiento térmico convencional	73
5.2.4. Procesamiento con microondas.....	74
5.2.5. Análisis de RMN	74
5.2.6. Análisis quimiométrico	75
5.3. Resultados y discusión	75
5.3.1. Evaluación por RMN.....	75
5.3.2. Análisis quimiométrico	77
5.4. Conclusiones	81
5.5. Agradecimientos	81
5.6. Literatura citada	81
6. MICROWAVE HEATING EFFECT ON TOTAL PHENOLICS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GREEN AND MATURE COCONUT WATER....	84
6.1. Introduction	86
6.2. Materials and methods	87
6.2.1. Reagents	87
6.2.2. Plant material.....	87
6.2.3. Microwave heat treatment.....	87
6.2.4. Antioxidant properties	88
6.2.5. Statistical analysis	89
6.3. Results and discussion	89
6.3.1. Antioxidant properties	89
6.4. Conclusion.....	95
6.5. Acknowledgements.....	96
6.6. References	96
7. INACTIVATION OF PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE BY CONVENTIONAL AND MICROWAVE PROCESSING OF COCONUT WATER OBTAINED FROM DIFFERENT FRUIT MATURATION STAGES	99
7.1. Introduction.....	101

7.2. Materials and methods	103
7.2.1. Sample preparation	103
7.2.2. Conventional processing.....	103
7.2.3. Microwave processing	104
7.2.4. Time-temperature profiles.....	104
7.2.6. Enzyme inactivation models	105
7.3. Results and discussion	105
7.3.1. Time–temperature profiles	105
7.3.3. Comparison between conventional and microwave heating	109
7.4. Conclusions	118
7.5. Acknowledgments.....	118
7.6. References	118
8. CONCLUSIONES GENERALES.	122

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de coco.....	22
Cuadro 2. Compuestos identificados por HS-SPME-GC-MS en agua de coco verde y maduro.....	45
Cuadro 3. Characteristics of coconut fruits evaluated before microwave heating.	90
Cuadro 4. Changes in the TPC of microwave-heated coconut water.....	91
Cuadro 5. Changes in ABTS radical scavenging capacity of microwave-heated coconut water.....	93
Cuadro 6. Three-factor ANOVA for TPC of two maturity stages of coconut water heated by microwave.	94
Cuadro 7. Three-factor ANOVA for ABTS scavenging capacity of two maturity stages of coconut water heated by microwave.	95
Cuadro 8. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW6M.	107
Cuadro 9. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW8M.	108
Cuadro 10. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW10M.	110
Cuadro 11. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW12M.	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rango de variabilidad en frutos de coco de a) variedades altas y b) variedades enanas. Fuente: Nayar (2017b).....	22
Figura 2. Niveles de manifestación del rasgo makapuno en frutos de coco. Fuente: Nguyen et al. (2016).	23
Figura 3. Espectro de ^1H -RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b).	41
Figura 4. Expansiones del espectro de RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b) (δ 0.6 a δ 3.0).	42
Figura 5. Expansiones del espectro de RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b) (δ 3.0 a δ 4.5).	43
Figura 6. Expansiones del espectro de ^1H -RMN de agua de coco, verde fresco (a) δ 6.0 a δ 9.0, b) δ 4.4 a δ 6.0) y maduro (c) δ 6.0 a δ 9.0, d) δ 4.4 a δ 6.0)	44
Figura 7. Changes in pH, conductivity and °Brix of green (a) and mature (b) coconut water during storage.....	56
Figura 8. Stacked ^1H water_presat NMR spectra of the analyzed treatments, showing the buckets generated, for water from green coconuts at the beginning of storage (purple) and stored 3 months (green) and water from mature coconuts at the beginning of storage (red) and stored 3 months (blue).	57
Figura 9. Selected portions of NMR spectra for chemometric analysis. a) green coconut water at zero storage time, b) green coconut water after three months of storage, c) mature coconut water at zero storage time and d) mature coconut water stored for three months.	58
Figura 10. a) PCA and (b) PLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1, red), mature coconut water at the beginning of storage (G2, green), green coconut water after three months of storage (G3, blue) and mature coconut water at the end time (G4, cyan).....	60
Figura 11. a) sPLS-DA and (b) OPLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1, red), mature coconut water at the beginning of storage (G2, green), green coconut water after three months of storage (G3, blue) and mature coconut water at the end time of storage (G4, cyan)..	621
Figura 12. a) VIP score of sPLS-DA and (b) OPLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1), mature coconut water at the beginning of storage	

(G2), green coconut water after three months of storage (G3) and mature coconut water at the end of the storage period (G4).	62
Figura 13. Espectros de RMN apilados de hidrógeno con supresión de agua usando presaturación, para el agua de coco fresca de frutos de diferentes edades (6 meses, verde, 8 meses, morado, 10 meses, azul y 12 meses, rojo).	76
Figura 14. Espectros de RMN apilados de hidrógeno con supresión de agua usando presaturación, para el agua de coco de 6 meses fresca (FRESH) y procesada con microondas (MW) y con tratamiento térmico convencional (CH).	77
Figura 15. PCA (a), PLS-DA (b) y OPLS-DA (c), del agua de coco fresca de 6 meses (azul), 8 meses (cian), 10 meses (rojo) y 12 meses (verde).....	78
Figura 16. PCA (a), PLS-DA (b) y OPLS-DA (c), del agua de coco de 6 meses fresca (verde), procesada con microondas (morado) y con tratamiento térmico convencional (rojo).....	80
Figura 17. Sample temperature–time profiles for (○) conventional and (●) microwave heating.....	106
Figura 18. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 6-month-old coconut water.....	113
Figura 19. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 8-month-old coconut water.....	115
Figura 20. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 10-month-old coconut water.....	116
Figura 21. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 12-month-old coconut water.....	117

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico con todo el cariño a mis padres: Abraham Arzeta Moreno y Delia Ríos Longares, que me apoyaron a cada instante, sobre todo en momentos de dificultad. Me ayudaron siempre a superar los retos que este doctorado me impuso.

A mis hermanas: Tomasa Elizabeth Arzeta Ríos y Lidia Arminda Arzeta Ríos, que me animaron a seguir adelante y no desistir, con sus palabras me dieron aliento para buscar siempre ser mejor.

A todos mis tíos paternos y maternos, que estuvieron conmigo desde el inicio de mis estudios hasta la culminación del máximo grado de estudios.

A todos los profesores que formaron parte de mi educación y sirvieron de inspiración para seguir luchando y perseverar hasta el final de los estudios.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios, por la sabiduría y entendimiento que me ha dado, porque esto además de ser la culminación de una etapa es también un nuevo despertar no solo en la ciencia, sino también en mi espíritu.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi alma máter, por darme la mejor educación desde la licenciatura hasta el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas de maestría y doctorado, un apoyo sin duda esencial.

Al doctor Benito Reyes Trejo por su dedicación al desarrollo y ejecución de este proyecto, por sus enseñanzas y su manera cordial de enseñar.

A las doctoras Diana Guerra Ramírez y Ma. Carmen Ybarra Moncada, por ser parte de mi comité asesor y participar de manera conjunta para poder hacer este trabajo.

Al doctor Holber Zuleta Prada, por su tiempo y colaboración en este proyecto.

Al doctor Crescenciano Saucedo Veloz por el apoyo brindado durante mi estancia de investigación en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Al doctor Rubén Francisco González Laredo por su colaboración como lector externo y por sus excelentes observaciones y recomendaciones.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Abraham Jesús Arzeta Ríos

Fecha de nacimiento: 6 de junio de 1990

Lugar de nacimiento: Arenal de Álvarez, municipio de Benito Juárez, Guerrero.

No. Cartilla militar: D-2757419

CURP: AERA900606HGRRSB03

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Cédula profesional: 9705501

Desarrollo académico

Preparatoria: Unidad Académica número 23, Universidad Autónoma de Guerrero, municipio de Benito Juárez, Guerrero.

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Generación 2009-2013.

Maestría: Maestría en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua. Universidad Autónoma Chapingo. Generación 2014-2016.

RESUMEN GENERAL

Composición química, actividad antioxidante y enzimática de agua de coco (*Cocos nucifera*) verde y maduro

El coco (*Cocos nucifera* L.) es una drupa fibrosa, generalmente ovoide en forma, de cuyo endospermo se obtiene el agua de coco. Los frutos en estado inmaduro o tierno son los utilizados para la obtención de agua de coco, sin embargo, también puede consumirse cuando el fruto ha madurado fisiológicamente. Aunque el agua de coco maduro es considerada un producto de desecho en el proceso de obtención de copra, es un material que aún contiene compuestos que pueden ser beneficiosos para el cuerpo humano. En este trabajo se evaluaron los compuestos volátiles y la composición química del agua de frutos de coco de diferentes estados de desarrollo durante el almacenamiento. Además, se evaluaron los efectos de tratamientos térmicos en la composición química, actividad enzimática y capacidad antioxidante del agua de coco de diferentes etapas de desarrollo del fruto. Para la determinación de los compuestos volátiles se utilizó Cromatografía de Gases, mientras que para la identificación y comparación de compuestos se empleó espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y análisis quimiométrico. Los compuestos volátiles mayoritarios encontrados en el agua de coco verde fueron: 2,6-di-ter-butilquinona (5,9%) y ácido octanoico (4,5%), mientras que en el agua de coco maduro se encontró principalmente 3-ter-butil-4-hidroxianisol (21,8%) y 1-octanol (13,6%). En el líquido se encontraron como componentes mayoritarios el etanol, ácido málico, α y β glucosa, sacarosa, fructosa y ácido γ -aminobutírico. La distinción de muestras de diferentes etapas de maduración y la evaluación de efectos de tratamientos térmicos fueron explicadas satisfactoriamente mediante análisis quimiométrico. Durante el almacenamiento, el agua de coco verde se mantuvo apta para consumo hasta por 30 días, mientras que el agua de coco maduro se mantuvo hasta dos meses. El calentamiento por microondas generó la inactivación enzimática más eficiente y un aumento en la capacidad antioxidante en los rangos de temperatura evaluados.

Palabras clave: Agua de coco, antioxidantes, quimiometría, Cromatografía de Gases, Resonancia Magnética Nuclear.

ABSTRACT

Chemical composition, antioxidant, and enzymatic activity of green and mature coconut (*Cocos nucifera*) water

The coconut (*Cocos nucifera* L.) is a fibrous drupe, generally ovoid in shape, from whose endosperm coconut water is obtained. The immature or tender fruits are used to obtain coconut water; however, it can also be consumed when the fruit has physiologically matured. Although mature coconut water is considered a waste product in the process of obtaining copra, it is a material that still contains compounds that can be beneficial to the human body. In this work, the volatile compounds and chemical composition of water from coconut fruits of different stages of development during storage were evaluated. In addition, the effects of heat treatments on the chemical composition, enzymatic activity, and antioxidant capacity of coconut water from different stages of fruit development were evaluated. Gas Chromatography was used for the determination of volatile compounds, while Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and chemometric analysis were used for the identification and comparison of compounds. The major volatile compounds found in the green coconut water were: 2,6-di-ter-butylquinone (5.9%) and octanoic acid (4.5%), while in the mature coconut water, mainly 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (21.8%) and 1-octanol (13.6%) were found. In the liquid, ethanol, malic acid, α and β -glucose, sucrose, fructose, and γ -aminobutyric acid were found as major components. The distinction of samples of different maturity stages and the evaluation of heat treatment effects were satisfactorily explained by chemometric analysis. During storage, green coconut water remained fit for consumption for up to 30 days, while mature coconut water remained fit for up to two months. Microwave heating generated the most efficient enzyme inactivation and an increase in antioxidant capacity in the temperature ranges evaluated.

Keywords: Coconut water, antioxidants, chemometric, Gas Chromatography, Nuclear Magnetic Resonance.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) es una bebida natural obtenida del endospermo del fruto del cocotero, además, es nutritiva y beneficiosa para la salud por su aplicación en problemas de deshidratación y problemas digestivos, así como por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Tan et al., 2014; Prades et al., 2012; Yong et al., 2009). Las investigaciones en torno al agua de coco son diversas, ya que involucran la composición y propiedades químicas (Seow et al., 2017; Yong et al., 2009), la evaluación sensorial del agua de coco en diferentes estados de madurez y mezclada con otros productos (Chauhan et al., 2014), los procesos de conservación y las enzimas involucradas (Campos et al., 1996; Bulhões Bezerra Cavalcante et al., 2021), así como el desarrollo de nuevos productos a base de agua de coco (Camargo et al., 2015). Las tecnologías de conservación del agua de coco incluyen la aplicación de tratamientos térmicos convencionales y alternativos tales como el calentamiento por microondas, filtración y refrigeración, esterilización a temperatura ultra alta y tratamientos a baja y alta temperatura junto con sulfitos añadidos (Ignacio & Miguel, 2021).

El carácter científico de las investigaciones sobre agua de coco se aborda desde metodologías simples en los análisis fisicoquímicos, hasta el uso de instrumentos y técnicas sofisticadas como la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Sucupira et al., 2017), cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución, ambas acopladas a detectores de masas (GC-MS y HPLC-MS respectivamente) (De Marchi et al., 2015; Wu et al., 2021), espectroscopía Raman (Richardson et al., 2019), espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón

de iones por transformada de Fourier (FT-ICR MS) (Costa et al., 2015), entre otras. El estudio de los datos comprende desde análisis de varianza de un solo factor, hasta estadística multivariada, quimiometría y metabolómica (Cunha et al., 2020; Zhang et al., 2020). En México, como en la mayoría de los países, el agua de coco de mayor interés es la de frutos tiernos. El agua de coco maduro es considerada un residuo del proceso de obtención de copra, sin embargo, se ha comenzado a investigar porque se considera que aún mantiene propiedades que la hacen apta para el consumo humano (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018) . En este sentido, el objetivo y las hipótesis de este trabajo de tesis se enuncian a continuación.

1.1. Objetivo general

Determinar la composición química, perfil aromático, actividad antioxidante y actividad enzimática del agua de coco verde y maduro, mediante análisis fisicoquímicos y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, para establecer su uso potencial.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química y el perfil aromático del agua de coco sin procesar y después de su procesamiento térmico mediante espectroscopia de RMN para establecer diferencias.
- Evaluar el efecto del procesamiento térmico en la actividad antioxidante del agua de coco, mediante los métodos de FRAP y ABTS para comparar los cambios producidos.
- Evaluar el efecto del almacenamiento en la composición química del agua de coco, mediante análisis fisicoquímicos y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, para determinar la vida de anaquel.
- Evaluar la inactivación enzimática del agua de coco con la aplicación de tratamientos térmicos para compararla en varias etapas de maduración

1.3. Hipótesis

La composición química del agua de coco se verá afectada por la edad del fruto, tiempo de almacenamiento y tipo de tratamiento térmico aplicado para la inactivación enzimática.

El tratamiento térmico del agua de coco maduro permitirá observar cambios en su composición y propiedades químicas y funcionales que serán evidenciadas por el análisis de su capacidad antioxidante.

1.4. Organización de la tesis

Este documento de tesis está compuesto de siete capítulos. El primero de ellos, la introducción general, menciona conceptos básicos y avances relacionados con el agua de coco. La revisión de literatura se aborda en el capítulo dos, ampliando la temática en torno al agua de coco, comenzando con conceptualizaciones hasta los avances científicos más recientes. El tercer capítulo trata sobre la composición química del agua de coco verde y maduro, aplicando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Gases Acoplada a Masas. El capítulo cuatro es un estudio de los cambios en las propiedades químicas del agua de coco verde y maduro después del almacenamiento durante tres meses, aplicando análisis fisicoquímicos y espectroscopía de RMN. El capítulo cinco es la evaluación del efecto de tratamientos térmicos en el agua de coco de diferentes etapas de maduración del fruto, aplicando espectroscopía de RMN y quimiometría. El sexto capítulo está relacionado con la aplicación de una tecnología convencional y una tecnología alternativa (microondas) y su efecto en las propiedades funcionales (en este caso, la actividad antioxidante) del agua de coco. El capítulo siete es un estudio de inactivación de las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa, que se sabe promueven el deterioro de las propiedades de los alimentos. Del mismo modo, se lleva a cabo una comparación de un tratamiento térmico convencional y uno alternativo.

1.5. Literatura citada

- Bulhões Bezerra Cavalcante, T. A., Santos Funcia, E. dos, & Wilhelms Gut, J. A. (2021). Inactivation of polyphenol oxidase by microwave and conventional heating: Investigation of thermal and non-thermal effects of focused microwaves. *Food Chemistry*, 340, 127911. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127911>
- Camargo Prado, F., De Dea Lindner, J., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Kaur Brar, S., & Soccol, C. R. (2015). Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 12, 489–497. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.12.020>
- Campos, C. F., Souza, P. E. A., Coelho, J. V., & Glória, M. B. A. (1996). Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20(6), 487–500. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00761.x>
- Chauhan, O. P., Archana, B. S., Singh, A., Raju, P. S., & Bawa, A. S. (2014). A refreshing beverage from mature coconut water blended with lemon juice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3355–3361. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0825-6>
- Chen, W., Zhang, G., Chen, W., Zhong, Q., & Chen, H. (2018). Metabolomic profiling of matured coconut water during post-harvest storage revealed discrimination and distinct changes in metabolites. *RSC Advances*, 8(55), 31396–31405.
- Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Oliveira, B. G., Ogawa, E. M., Korres, A. M. N., Ventura, J. A., & Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 174, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.154>
- Cunha, A. G., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V, Rodrigues, T. H. S., de Brito, E. S., & de Miranda, M. R. A. (2020). Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC-MS, UPLC-HRMS, and NMR. *Food Chemistry*, 126874.
- De Marchi, F., Aprea, E., Endrizzi, I., Charles, M., Betta, E., Corollaro, M. L., Cappelletti, M., Ferrentino, G., Spilimbergo, S., & Gasperi, F. (2015). Effects of Pasteurization on Volatile Compounds and Sensory Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water: Thermal vs. High-Pressure Carbon Dioxide Pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1501-4>
- Ignacio, I.-F., & Miguel, T.-S. (2021). Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. *South African Journal of Botany*, 141, 414–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.030>
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.

- Richardson, P. I. C., Muhamadali, H., Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2019). Rapid quantification of the adulteration of fresh coconut water by dilution and sugars using Raman spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 272, 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.038>
- Seow, E. K., Muhamed, A. M. C., Cheong-Hwa, O., & Tan, T. C. (2017). Composition and Physicochemical Properties of Fresh and Freeze-Concentrated Coconut (*Cocos nucifera*) Water. *Journal Of Agrobiotechnology*, 8(1), 13–24.
- Sucupira, N. R., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., & Sousa, P. H. M. (2017). NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry*, 216, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.035>
- Tan, T.-C., Cheng, L.-H., Bhat, R., Rusul, G., & Easa, A. M. (2014). Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chemistry*, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>
- Wu, J., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, M., & Chen, W. (2021). Effect of ultrasonic treatment on the activity of sugar metabolism relative enzymes and quality of coconut water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105780. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105780>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144.
- Zhang, G., Chen, W., Chen, W., & Chen, H. (2018). Improving the quality of matured coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water by low alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: antioxidant and volatile profiles. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 964–976. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3004-y>
- Zhang, Y., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Yun, Y., & Chen, W. (2020). Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. *Foods*, 9(1), 46.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cocotero

2.1.1. Taxonomía y características

El coco o cocotero, *Cocos nucifera* L taxonómicamente pertenece a la familia Arecaceae, subfamilia Arecoideae, tribu Cocoseae, subtribu Attaleinae y género *Cocos*. La clasificación de la familia Arecaceae ha sufrido varios cambios, debidos principalmente a la aparición de nueva información, proveniente principalmente de estudios filogenéticos (Nayar, 2017b). Una muestra de la variabilidad de los frutos de coco se muestra en la Figura 1. El cocotero es una palmera perenne monoica, perteneciente al grupo de las monocotiledóneas, siendo una especie monotípica del género *Cocos*. Posee un tallo delgado sin ramificar con una copa de hojas pinadas que producen racimos. El tallo no produce ramas y carece de corteza y cambium, mientras que las raíces son fibrosas (Niral & Jerard, 2018).

El coco es una drupa fibrosa, generalmente ovoide en forma, que presenta varios tamaños y colores. En general, un coco tarda aproximadamente 12 meses en madurar, con un peso de hasta 1.2-2 kg (Liu, 2016). El desarrollo del coco verde puede llevar de 6 a 7 meses. Este producto ha sido extensamente estudiado y contiene en promedio 400 ml de líquido estéril que puede beberse, además de ser nutritivo, refrescante y de buen sabor. La palma de coco se encuentra en los trópicos y subtrópicos, en todas las islas de los océanos Pacífico e Índico, además de las costas del sur y sudeste

asiático y partes del este de África. En el continente americano, los españoles observaron palmeras de cocos después del desembarco de Colón en las indias occidentales (Nayar, 2017a).

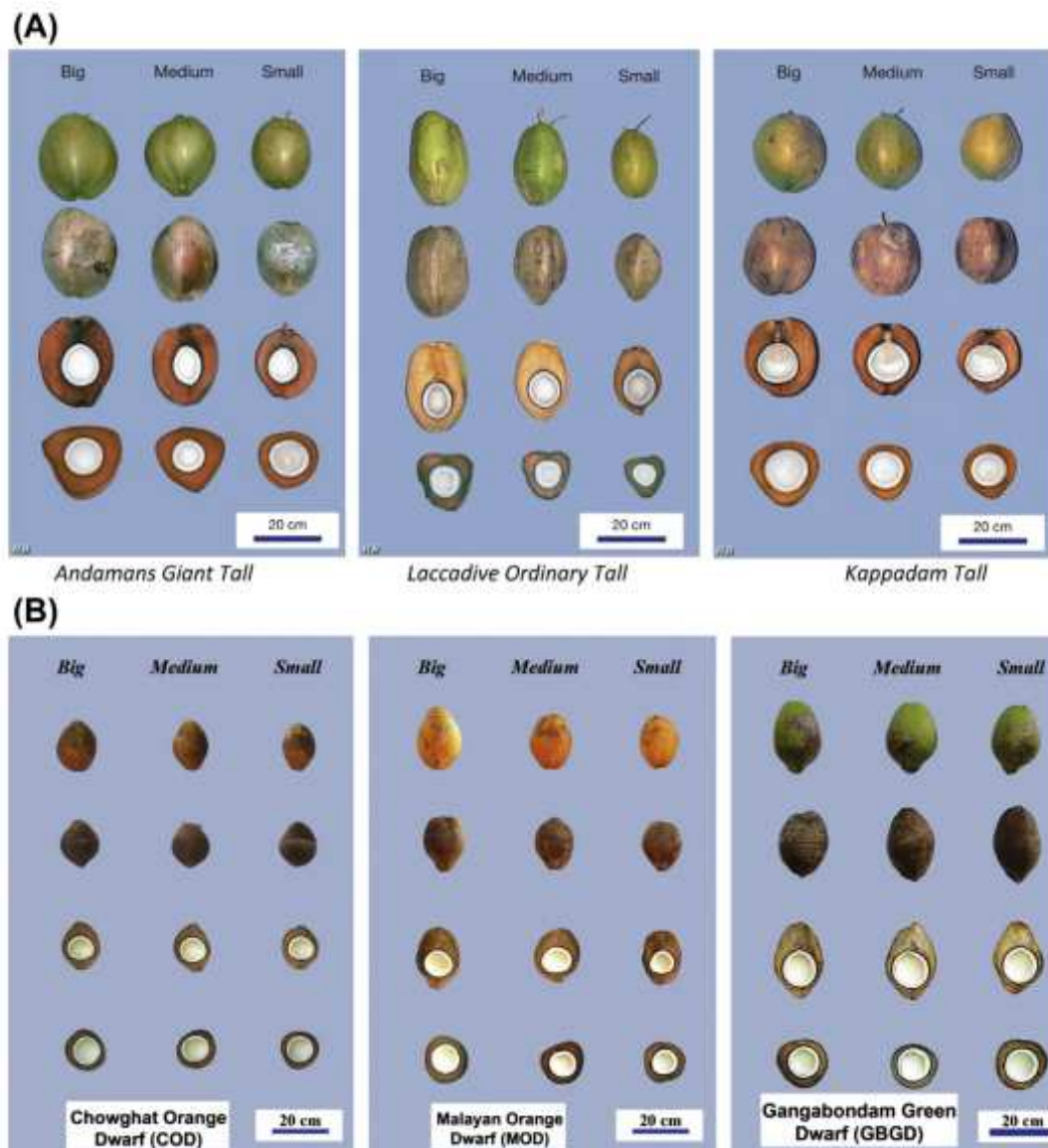


Figura 1. Rango de variabilidad en frutos de coco de a) variedades altas y b) variedades enanas. Fuente: Nayar (2017b).

El origen exacto del cocotero no es preciso. De acuerdo con estudios fósiles y datos moleculares, se cree que la palma de coco se originó, evolucionó y dispersó flotando en el ecosistema de atolón de coral al sudeste de Asia. También se han encontrado evidencias fósiles en el sur de Asia y Australia, con la diversidad más

alta en la región de Melanesia. Se cree que la domesticación del cocotero ocurrió cuando la gente llegó a los océanos Índico y Pacífico (Arulandoo, 2017).

2.1.2. Utilidad

La utilidad del cocotero como cultivo industrial es diversa, ya que no sólo está enfocada a la producción de copra (de la que deriva el aceite de coco), sino también a la obtención de la fibra del fruto, el carbón de la concha, la producción de leche de coco, crema de coco, harina de coco, coco desecado y nata de coco. Son alrededor de 100 productos los que se elaboran a partir de este cultivo (Walter & Kuaye, 2014; Granados Sánchez & López Ríos, 2002). Se estima que el área cubierta por el cultivo de cocotero en el mundo alcanza los 11.8 millones de hectáreas. Los principales países productores de coco en términos de área se muestran en el Cuadro 1. El resto de los territorios, que representan el 8%, está formado por Samoa, Micronesia, Fiji, Islas Salomón, Vanuatu, Palau, Bangladesh, China, Myanmar, Isla del Coco, Polinesia Francesa, Guam, Kiribati, Tonga, Comoras, Ghana, Costa de Marfil, Madagascar, Nigeria, Tanzania, Colombia, República Dominicana y Jamaica (Perera et al., 2010). Algunos países de África (Tanzania, Mozambique y Nigeria) se encuentran dentro de los 20 principales productores (Chan et al., 2016).

Cuadro 1. Principales países productores de coco.

País	% de aportación al área total
Indonesia	31
Filipinas	26
India	16
Sri Lanka	4
Tailandia	3
Tanzania	3
Malasia	2
Brasil	2
Papúa Nueva Guinea	2
Vietnam	1
México	1
Mozambique	1
Resto	8

Fuente: Elaboración propia con datos de Perera et al. (2010).

Los productos derivados del coco representan un valor comercial valuado en 11.5 miles de millones de dólares (mmdd) en 2020 y se estima que alcanzarán un valor comercial de 31.1 mmdd en el 2026 (Ignacio & Miguel, 2021). La mejora en el manejo y comercialización de este cultivo está siendo llevada a cabo con la aplicación de nuevas tecnologías de procesamiento y estrategias de investigación relacionadas con las ciencias ómicas (Ignacio & Miguel, 2021). La introducción al mercado de variedades de élite como los cocos aromáticos y makapuno (Figura 2), ha generado mayor atención en las tecnologías de reproducción del cocotero, así como en la citología y genética del coco y la evaluación de su valor alimenticio y calidad nutricional. Aunque estas variedades producen un endospermo delicioso, de carácter sólido y gelatinoso, estas mismas características le impiden la germinación *in situ*, por lo que es necesario recurrir a la propagación *in vitro* (Nguyen et al., 2016).



Figura 2. Niveles de manifestación del rasgo makapuno en frutos de coco. Fuente: Nguyen et al. (2016).

2.2. Agua de coco

2.2.1. Composición química

El agua de coco está compuesta principalmente de azúcares, vitaminas, minerales, aminoácidos, fitohormonas (Yong et al., 2009) y una concentración relativamente alta de potasio (mayor a 200 mg 100g⁻¹) y baja en sodio (menor a 17 mg 100 g⁻¹) (Campos et al., 1996).

La composición química del agua de coco se ha estudiado ampliamente y se ha determinado que está afectada por varios factores. La variedad, las etapas de madurez, el suelo y las condiciones ambientales son las principales variables que ocasionan las diferencias en el perfil químico del agua de coco (Maciel et al., 1992; Yong et al., 2009). Jackson et al. (2004) estudiaron los cambios químicos ocurridos durante la maduración del coco, comparando cuatro etapas de desarrollo del fruto (7, 8, 9 y 10 meses) y considerando los sólidos solubles totales, acidez titulable, turbidez, cenizas, lípidos, azúcares totales y volumen de agua como variables de interés. Los resultados mostraron que el volumen de agua aumenta considerablemente, así como el contenido de lípidos, proteína, sólidos solubles totales, acidez y turbidez. Concluyeron que la etapa de maduración óptima para cosechar los frutos de coco es de 9 meses.

Tan et al. (2014) compararon la composición y las propiedades fisicoquímicas del agua de coco en diferentes estados de madurez, cocos inmaduros, maduros y excesivamente maduros. En las muestras que estudiaron encontraron que el pH, la turbidez y los contenidos de minerales del agua de coco excesivamente maduro fueron los más altos, mientras que el volumen de agua, la acidez titulable, los sólidos solubles totales y el contenido total de fenoles para la misma agua fueron los más bajos, además encontraron que la madurez afectaba el contenido de azúcares.

Seow et al. (2017) mencionaron que el agua de cocos verdes contiene sólidos solubles totales de aproximadamente 6 °Brix, mientras que el agua de cocos maduros contiene alrededor de 4 °Brix. Además, duplicaron la concentración de agua de coco utilizando un proceso simplificado de concentración por congelación. Las muestras concentradas congeladas fueron significativamente ($P < 0.05$) más altas en azúcares, acidez, minerales, proteína, grasa bruta y compuestos fenólicos totales en comparación con el agua de coco fresca. Campos et al. (1996) determinaron la composición química, actividad enzimática y las cualidades del sabor del agua de coco. De acuerdo con Yong et al. (2009) la composición química del agua de coco comprende principalmente

fitohormonas, iones inorgánicos y vitaminas. Dentro de las fitohormonas se encuentran auxinas como el ácido indol-3-acético. También están presentes citoquininas y giberelinas. Costa et al. (2015) monitorearon la degradación fisicoquímica del agua de coco introduciendo muestras en una fuente de ionización por electrospray (ESI) combinada con la técnica de espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón de iones de Fourier (FT-ICR MS) para caracterizar compuestos químicos in situ producidos durante el envejecimiento natural. La combinación de estas técnicas es una herramienta poderosa para predecir las propiedades fisicoquímicas del agua de coco, como el pH y la acidez titulable, donde especies como fructosa, glucosa, sacarosa y ácido glucónico pueden usarse como marcadores naturales para monitorear la calidad de las frutas

2.2.2. Usos

El procesamiento del coco tiene varios subproductos dependiendo de la finalidad para la que sea usada la pulpa. Los principales usos de la pulpa del coco son la copra y para la elaboración de leche de coco. Cuando el uso está destinado para leche de coco se tienen dos subproductos de la pulpa, la torta de leche de coco y el agua de coco maduro, mientras que en el caso de la copra se tiene solamente agua de coco maduro. Rodsamran y Sothornvit (2018) evaluaron el potencial del agua de coco maduro y la torta de leche de coco como una fuente alternativa para la extracción de proteínas y compuestos antioxidantes. Soares et al. (2016) evaluaron las características fisicoquímicas y sensoriales de vino de agua de coco que obtuvieron de fermentar el agua con *Saccharomyces cerevisiae* a 25 °C durante 30 días. También se han desarrollado bebidas funcionales no lácteas y fermentadas utilizando agua de coco como ingrediente principal para proporcionar las propiedades de salud intrínsecas (Camargo Prado et al., 2015) y se ha utilizado el probiótico potencial *Lactobacillus plantarum* para producir bebidas fermentadas de agua de coco maduro con el objetivo de proporcionar valor agregado (Kantachote et al., 2017).

Prando et al. (2014) estudiaron los efectos in vitro del agua de coco en combinación con giberelinas y citoquininas como parte del medio de cultivo en la proliferación y crecimiento de avellana (*Corylus avellana* L.). Incluso se ha empleado el agua de coco como una fuente alternativa de lipoproteínas en los extendedores de semen que podría reemplazar los subproductos animales (London et al., 2017). Por su contenido nutricional que incluye ingredientes bioactivos y sus propiedades biológicas, el agua de coco puede ser considerada como una bebida funcional natural (Prades et al., 2012; Souyouf et al., 2018; Vázquez-Cabral et al., 2014).

2.3. Estudios sobre el agua de coco

2.3.1. Procesos de conservación

La pasteurización del agua de coco se lleva a cabo mediante esterilización UHT (Ultra High Temperature, por sus siglas en inglés), altas presiones de dióxido de carbono o mediante luz ultravioleta. La evaluación de los procesos del agua de coco se ha abordado con espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) la cual es una herramienta analítica importante para el análisis de mezclas complejas, como en el control de calidad de los alimentos (Sucupira et al., 2017). De Marchi et al. (2015) analizaron muestras frescas no tratadas (FN) y muestras pasteurizadas utilizando dos tecnologías diferentes: tratamiento térmico convencional (pasteurización térmica, PT) y pasteurización a alta presión de dióxido de carbono (HPCD, por sus siglas en inglés). Los citados identificaron 73 compuestos volátiles en agua de coco. Además, el análisis de discriminación sensorial (prueba triangular) mostró que no había diferencias significativas entre las muestras de HPCD y FN, mientras que las muestras de PT y FN se percibieron de forma significativamente diferente. Adubofuor et al. (2016) investigaron los efectos de la pasteurización en las cualidades del agua de dos variedades de coco. Llevaron a cabo tres procesos de pasteurización (90 °C durante 5 min, 80 °C durante 15 min y 70 °C durante 25 min). En ambas variedades ocurrió la reducción de las propiedades de las muestras. A pesar de

que la pasteurización tiene un efecto de reducción de los microorganismos, también ocasiona la reducción del valor nutricional y sensorial del agua de coco.

Se han llevado a cabo estudios enfocados en otros métodos para preservar el agua de coco, como la esterilización en frío del agua de coco tierno utilizando ultrafiltración de fibra hueca (Karmakar & De, 2017) o la microfiltración no térmica en dos etapas y en condiciones asépticas para preservar el agua de coco (Mahnot et al., 2014).

2.3.2. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la enzima polifenol oxidasa (PPO) es más resistente al calor que la peroxidasa (POD) en todas las etapas de maduración. La menor resistencia térmica de las enzimas PPO y POD se encontró en los cocos excesivamente madurados en comparación con los cocos inmaduros y maduros (Tan et al., 2014). De Matos Ribeiro et al. (2017) evaluaron el efecto de la termosonicación para reducir la actividad enzimática en agua de coco y optimizar los parámetros de operación óptimos (amplitud y tiempo) y la correspondiente energía acústica específica requerida para la inactivación enzimática completa. El ultrasonido presentó un efecto aditivo al tratamiento térmico sobre la inactivación de las enzimas PPO y POD.

2.3.3. Metabolómica y quimiometría

Las ciencias biológicas cuyos nombres tienen la terminación -ómica, como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, corresponden al campo de estudio conocido como ciencias ómicas. Asimismo, los objetos de estudio de dichos campos emplean la terminación -oma, como el genoma, proteoma, transcriptoma o metaboloma, respectivamente (Vailati-Riboni et al., 2017). Los metabolitos son productos intermediarios o finales de reacciones bioquímicas, tienen bajo peso molecular (<1500 Da), participan en procesos celulares y están involucrados en vías metabólicas interconectadas. Las moléculas endógenas (provenientes del metabolismo primario o secundario) o de origen externo (la

dieta, xenobióticos y xeno-metabolitos) están incluidas en estos metabolitos (Boccard & Rudaz, 2020).

“La metabolómica es la ciencia que estudia las moléculas pequeñas (metabolitos) en sistemas biológicos con el objetivo de obtener información sobre las células, biofluidos y organismos”. Mientras que “los métodos quimiométricos son herramientas poderosas para resolver problemas de datos generados en los estudios metabolómicos y extraer información valiosa” (Feizi et al., 2021). La metabolómica tiene por objetivo monitorear los metabolitos en sistemas biológicos de manera cualitativa o cuantitativa. Para esto es necesario medir y comparar de manera adecuada los patrones metabólicos. La RMN y la MS (asociada con un método de separación previo, como la cromatografía de gases, cromatografía de líquidos o electroforesis capilar) son las referencias actuales para la medición de los perfiles metabólicos (Boccard & Rudaz, 2020). Es usual que los metabolitos generen varias señales que son detectadas por procedimientos automáticos. Se emplea una secuencia de diferentes pasos para integrar y relacionar picos en varias muestras, permitiendo una comparación apropiada. Para identificar metabolitos de interés particular, se emplean métodos univariados, mientras que los perfiles metabólicos completos son abordados mediante análisis quimiométricos multivariados (Boccard & Rudaz, 2020).

La metabolómica basada en RMN se lleva a cabo empleando herramientas de programas de cómputo (comerciales o de acceso abierto), que abarcan desde el preproceso espectroscópico hasta el análisis estadístico multivariado. A menudo los investigadores usan múltiples opciones de software para analizar los datos metabolómicos. Una solución integral es encontrada en plataformas de acceso abierto como Metabonomic, MetaboAnalyst y Automics. Estas plataformas llevan a cabo el análisis quimiométrico mediante técnicas multivariadas como PCA y PLS-DA (Izquierdo-García et al., 2011). Además de emplear química analítica y tecnología de plataformas, la metabolómica requiere el uso de bioinformática y estadística multivariada para el descubrimiento de biomarcadores. Dependiendo de la identificación del metabolito durante el procesamiento de los datos, la

metabolómica se puede dividir en dos enfoques distintos: dirigida y no dirigida (Griffiths et al., 2010).

El análisis integral intencionado de todos los analitos medibles en una muestra se denomina metabolómica no dirigida, mientras que la medición de grupos definidos de metabolitos caracterizados químicamente y anotados bioquímicamente se llama metabolómica dirigida (Roberts et al., 2012).

La quimiometría se compone de varias aplicaciones y estrategias para maximizar la información extraída de un sistema químico. Los métodos quimiométricos ofrecen una ruta eficiente para una interpretación significativa de los resultados. Se clasifican como: métodos estadísticos, modelos de aprendizaje automático y soluciones personalizadas (Paul & de Boves Harrington, 2021). El análisis quimiométrico de espectroscopía de RMN se inicia con la representación del conjunto de datos, corrección de línea base, fase y cambios de frecuencia. Consecutivamente se lleva a cabo el escalamiento, edición de espectro y agrupamiento. El análisis estadístico correspondiente puede abordarse mediante métodos no supervisados, como el PCA y el análisis de grupos jerárquicos, o con métodos supervisados, como la regresión de componentes principales, mínimos cuadrados parciales, modelado suave independiente de analogías de clases, análisis discriminante linear y vecinos cercanos K (Alam & Alam, 2004).

Una de las técnicas más usadas para investigar metabolitos desconocidos en ingeniería de tejidos es la RMN. Ha sido empleada para investigar perfiles metabólicos *in vivo* e *in vitro* (Raja et al., 2020), en metabolómica y lipidómica de microalgas (Bisht et al., 2021). También, se ha empleado la RMN en combinación con quimiometría para detectar adulteración de miel de abeja (Yong et al, 2022a) y de nidos comestibles de pájaros (Yong, et al., 2022b). Además, la metabolómica se ha empleado en el descubrimiento de biomarcadores mediante la combinación de espectros de RMN de biofluidos y métodos de reconocimiento de patrones (Smolinska et al., 2012).

2.3.4. Propiedades sensoriales

Seow et al. (2017) evaluaron la aceptabilidad de los consumidores de agua de coco concentrada por congelación en comparación con el agua de coco fresca. Según sus resultados, la evaluación sensorial no indicó diferencia significativa ($P > 0.05$). Tras la reconstitución (al SST inicial), las muestras reconstituidas congeladas concentradas conservaron la misma aceptabilidad que el agua fresca de coco. Por otro lado, la evaluación sensorial de los atributos del agua de coco se ha llevado a cabo después de aplicar la pasteurización (De Marchi et al., 2015). Adubofuor et al. (2016) evaluaron sensorialmente y seleccionaron la muestra pasteurizada más preferida de agua de coco de dos variedades empleando agua de coco no pasteurizada como control. Utilizaron 50 panelistas para evaluar el agua de coco pasteurizada y no pasteurizada usando una escala hedónica de 9 puntos. Assa et al. (2013) investigaron las características sensoriales del agua de coco de cuatro cultivares de coco durante la maduración de los frutos. Los parámetros probados fueron los sabores (dulce, salado y agrio), las preferencias gustativas y los contenidos de azúcares. Los resultados obtenidos mostraron interacciones significativas entre cultivares y etapas de madurez para los parámetros analizados. Por lo tanto, durante la maduración de los frutos secos, el sabor dulce del agua de coco predomina de acuerdo con las etapas de madurez. Los resultados de las pruebas hedónicas condujeron a la preferencia del agua de coco según su sabor dulce.

2.4. Literatura citada

- Adubofuor, J., Amoah, I., & Osei-Bonsu, I. (2016). Sensory and physicochemical properties of pasteurized coconut water from two varieties of coconut. *Food Science and Quality Management*, (54), 3–12.
- Alam, T.M.: Alam, M.K. (2004). *Chemometric Analysis of NMR Spectroscopy Data: A Review* (Vol. 54, pp. 41–80). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(04\)54002-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0066-4103(04)54002-4)
- Arulandoo, X. (2017). Encyclopedia of Applied Plant Sciences || The Coconut Palm. , (), 426–430. doi:10.1016/B978-0-12-394807-6.00237-9
- Assa, R. R., Prades, A., Konan, A. G., Nemlin, J., & Konan, J.-L. (2013). Sensory evaluation and sugars contents of coconut (# *Cocos nucifera* # l.) water during

- nuts ripening. *African Journal of Food Science*, 7(7), 186–192.
- Bisht, B., Kumar, V., Gururani, P., Tomar, M. S., Nanda, M., Vlaskin, M. S., Kumar, S., & Kurbatova, A. (2021). The potential of nuclear magnetic resonance (NMR) in metabolomics and lipidomics of microalgae- a review. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 710, 108987. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108987>
- Boccard, J., & Rudaz, S. (2020). 4.20 - *Analysis of Metabolomics Data—A Chemometrics Perspective* (S. Brown, R. Tauler, & B. B. T.-C. C. (Second E. Walczak (eds.); pp. 483–505). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14593-7>
- Camargo Prado, F., De Dea Lindner, J., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Kaur Brar, S., & Soccol, C. R. (2015). Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 12, 489–497. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.12.020>
- Campos, C. F., Souza, P. E. A., Coelho, J. V., & Glória, M. B. A. (1996). Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20(6), 487–500. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00761.x>
- Chan, S. Y., Liu, S., Tanujaya, S., & Tan, S. Y. (2016). Coconut Handbook. Tetra Pak South East Asia Pte Limited, Coconut Knowledge Centre. <https://books.google.com.mx/books?id=qx6IAQAACAAJ>
- Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Oliveira, B. G., Ogawa, E. M., Korres, A. M. N., Ventura, J. A., & Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 174, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.154>
- De Marchi, F., Aprea, E., Endrizzi, I., Charles, M., Betta, E., Corollaro, M. L., Cappelletti, M., Ferrentino, G., Spilimbergo, S., & Gasperi, F. (2015). Effects of Pasteurization on Volatile Compounds and Sensory Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water: Thermal vs. High-Pressure Carbon Dioxide Pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1501-4>
- De Matos Ribeiro, M., Valdramidis, V. P., Nunes, C. A., & de Souza, V. R. (2017). Synergistic effect of thermosonication to reduce enzymatic activity in coconut water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 404–410.
- Feizi, N., Hashemi-Nasab, F. S., Golpelichi, F., Saburouh, N., & Parastar, H. (2021). Recent trends in application of chemometric methods for GC-MS and GC×GC-MS-based metabolomic studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116239>
- Granados Sánchez, D., & López Ríos, G. F. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 8(1), 39. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62980105>

- Griffiths, W. J., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D. P., & Deigner, H.-P. (2010). Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(32), 5426–5445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200905579>
- Ignacio, I.-F., & Miguel, T.-S. (2021). Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. *South African Journal of Botany*, 141, 414–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.030>
- Izquierdo-García, J. L., Villa, P., Kyriazis, A., del Puerto-Nevado, L., Pérez-Rial, S., Rodriguez, I., Hernandez, N., & Ruiz-Cabello, J. (2011). Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 59(3), 263–270. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2011.02.001
- Jackson, J. C., Gordon, A., Wizzard, G., McCook, K., & Rolle, R. (2004). Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1049–1052.
- Kantachote, D., Ratanaburee, A., Hayisama-ae, W., Sukhoom, A., & Nunkaew, T. (2017). The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. *Journal of Functional Foods*, 32, 401–408. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.03.018>
- Karmakar, S., & De, S. (2017). Cold sterilization and process modeling of tender coconut water by hollow fibers. *Journal of Food Engineering*, 200, 70–80. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2016.12.021>
- Liu, S. (2016). *Coconut handbook* (L. ShuQi (ed.); Primera ed). Tetra Pak South East Asia Pte Ltd.
- London, K. T., Christensen, B. W., Scott, C. J., Klooster, K., Kass, P. H., Dujovne, G. A., & Meyers, S. A. (2017). The Effects of an Oxygen Scavenger and Coconut Water on Equine Sperm Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 58, 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2017.08.014>
- Maciel, M. I., Oliveira, S. L., & Da Silva, I. P. (1992). Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16(1), 13–22.
- Mahnot, N. K., Kalita, D., Mahanta, C. L., & Chaudhuri, M. K. (2014). Effect of additives on the quality of tender coconut water processed by nonthermal two stage microfiltration technique. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1191–1195. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.06.040>
- Nayar, N. M. (2017a). *Chapter 2 - Early History, Lore, and Economic Botany* (Nayar, C (ed.); pp. 9–24). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809778-6.00002-4>
- Nayar, N. M. (2017b). *Chapter 3 - Taxonomy and Intraspecific Classification* (Nayar, C. (ed.); pp. 25–50). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809778-6.00003-6>

- Nguyen, Q. T., Bandupriya, H. D. D., Foale, M., & Adkins, S. W. (2016). Biology, propagation and utilization of elite coconut varieties (makapuno and aromatics). *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 579–589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.003>
- Niral, V., & Jerard, B. A. (2018). *Botany, Origin and Genetic Resources of Coconut BT - The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives* (Krishnakumar, V., Thampan, P. K & Nair, M. A. (eds.); pp. 57–111). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2754-4_3
- Paul, A., & de Boves Harrington, P. (2021). Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116165>
- Perera, L., Perera, S. A. C. N., Bandaranayake, C. K., & Harries, H. C. (2010). *Coconut BT - Oil Crops* (J. Vollmann & I. Rajcan (eds.); pp. 369–396). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77594-4_12
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.
- Prando, M. A. S., Chiavazza, P., Faggio, A., & Contessa, C. (2014). Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171, 91–94. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2014.03.052>
- Raja, G., Jung, Y., Jung, S. H., & Kim, T.-J. (2020). 1H-NMR-based metabolomics for cancer targeting and metabolic engineering –A review. *Process Biochemistry*, 99, 112–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.023>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(1), 30.2.1-30.2.24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2018). Bioactive coconut protein concentrate films incorporated with antioxidant extract of mature coconut water. *Food Hydrocolloids*, 79, 243–252. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.12.037>
- Seow, E. K., Muhamed, A. M. C., Cheong-Hwa, O., & Tan, T. C. (2017). Composition and Physicochemical Properties of Fresh and Freeze-Concentrated Coconut (*Cocos nucifera*) Water. *Journal Of Agrobiotechnology*, 8(1), 13–24.
- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*, 750, 82–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>
- Soares, L. S. O., Abreu, V. K. G., Lemos, T. de O., & Pereira, A. L. F. (2016). Vино de Agua de Coco: Evaluación Físico-Química y Sensorial. *Revista de Ciencia*

y *Tecnología*, 26, 19–25.

- Souyoul, S. A., Saussy, K. P., & Lupo, M. P. (2018). Nutraceuticals: A Review. *Dermatology and Therapy*, 8(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s13555-018-0221-x>
- Sucupira, N. R., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., & Sousa, P. H. M. (2017). NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry*, 216, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.035>
- Tan, T.-C., Cheng, L.-H., Bhat, R., Rusul, G., & Easa, A. M. (2014). Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chemistry*, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). *What Are Omics Sciences? BT - Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach* (B. N. Ametaj (ed.); pp. 1–7). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1
- Vázquez-Cabral, B. D., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., & Córdova-Moreno, I. T. S. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*, 13(4), 169–178. <https://doi.org/10.1007/s13749-014-0035-0>
- Walter, E. H. M., & Kuaye, A. Y. (2014). Case study on the safety and sustainability of fresh bottled coconut water. *Global Safety of Fresh Produce*, 367–382. <https://doi.org/10.1533/9781782420279.5.367>
- Yong, C.-H., Muhammad, S. A., Aziz, F. A., Nasir, F. I., Mustafa, M. Z., Ibrahim, B., Kelly, S. D., Cannavan, A., & Seow, E.-K. (2022a). Detecting adulteration of stingless bee honey using untargeted ¹H NMR metabolomics with chemometrics. *Food Chemistry*, 368, 130808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130808>
- Yong, C.-H., Muhammad, S. A., Aziz, F. A., Ng, J.-S., Nasir, F. I., Adenan, M. N. H., Moosa, S., Othman, Z., Abdullah, S. N. A., Sharif, Z., Ismail, F., Kelly, S. D., Cannavan, A., & Seow, E.-K. (2022b). Detection of adulteration activities in edible bird's nest using untargeted ¹H-NMR metabolomics with chemometrics. *Food Control*, 132, 108542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108542>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144.

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFIL AROMÁTICO DEL AGUA DE COCO VERDE Y MADURO

Resumen

La constitución de los compuestos volátiles del agua de coco (*Cocos nucifera* L.) se analizó mediante micro extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) de espacio de cabeza utilizando frutos de maduración en dos etapas (verde y maduro). Las diferencias encontradas en este análisis muestran que el agua de coco verde se presenta como productos mayoritarios; 2,6-di-ter-butilquinona (5,9%), ácido octanoico (4,5%) y ácido dodecanoico (2,7%). Como el agua de coco madura mostró resultados importantes para cuatro componentes mayoritarios como 3-ter-butil-4-hidroxianisol (21,8%), 1-octanol (13,6%), 3-metil-2-hexanona (13,4%), 2,6-di-terbutil quinona (9,6%). Cabe señalar que un aumento en la concentración de 2,6-di-ter-butilquinona en agua de coco madura, implica un aumento en el grado de oxidación en esta etapa de maduración. Asimismo, la presencia de 3-ter-butil-4-hidroxianisol y 1-octanol indican una distinción importante en las propiedades organolépticas del agua de coco madura. Por otro lado, el análisis ejecutado por Resonancia Magnética Nuclear indicó principalmente que hubo una disminución en el contenido y proporción de azúcares presentes en el agua de coco madura. En ambos casos la presencia de etanol no es un contaminante en ambas muestras (verde y madura). El uso de la cromatografía de gases y la resonancia magnética nuclear son herramientas muy poderosas para el estudio de la composición de compuestos volátiles, por un lado, y agua de coco en diferentes estados de maduración.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, agua de coco, análisis de RMN, análisis HS-SPME-GC-MS, compuestos volátiles

CHEMICAL COMPOSITION AND AROMA PROFILE OF GREEN AND MATURE COCONUT WATER

Abstract

The composition of volatile coconut water (*Cocos nucifera* L.) compounds was analyzed by head space solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) using two-stage maturity fruits (green and mature). The differences found in this analysis show that main products found in green coconut water are 2,6-di-ter-butylquinone (5.9%), octanoic (4.5%) and dodecanoic (2.7%) acids. As mature coconut water exhibited important results for four majority components as 3-ter-butyl-4-hydroxyanisole (21.8%), 1-octanol (13.6%), 3-methyl-2-hexanone (13.4%), 2,6-di-ter-butylquinone (9.6%). It should be noted that an increase in the concentration of 2,6-di-ter-butylquinone in mature coconut water, implies an increase in the degree of oxidation at this stage of maturation. Likewise, the presence of 3-ter-butyl-4-hydroxyanisole and 1-octanol indicate an important distinction in the organoleptic properties of mature coconut water. On the other hand, the analysis carried out by Nuclear Magnetic Resonance, indicated mainly that there was a decrease in the content and proportion of sugars present in mature coconut water. In both cases the presence of ethanol is not a contaminant in both samples (Green and mature). The use of gas chromatography and Nuclear Magnetic Resonance are very powerful tools for the study of the composition of volatile compounds on the one hand, and coconut water in different states of maturation.

Keywords: *Coconuts nucifera*, coconut water, NMR analysis, HS-SPME-GC-MS analysis, volatile compounds

3.1. Introducción

El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) es una bebida natural obtenida del endospermo del fruto del coco. El consumo de esta bebida nutritiva y beneficiosa para la salud ha tenido un aumento en el tamaño del mercado en los últimos años (Prades et al., 2012; Yong et al., 2009). Las propiedades fisicoquímicas del agua de coco se describen por el contenido de azúcares (principalmente fructosa, glucosa y sacarosa), ácidos orgánicos (ácido málico como el dominante), la presencia de minerales (alto contenido de potasio, pero bajo contenido de sodio), trazas de proteínas, aminoácidos libres (lisina, triptófano, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y glicina) y compuestos antioxidantes (Tan et al., 2014). Además, la composición del agua de coco presenta diferencias relacionadas con la etapa de desarrollo del fruto, variedad de coco, prácticas de cultivo, procesamiento y condiciones de almacenamiento (Campos et al., 1996).

En el agua de coco fresca, se han identificado azúcares, iones inorgánicos, vitaminas, lípidos, aminoácidos, compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos, enzimas y fitohormonas (Yong et al., 2009). Además, se han identificado más de setenta compuestos volátiles, que se han clasificado como aldehídos, ésteres y cetonas (De Marchi et al., 2015). Se ha estudiado la composición y las propiedades fisicoquímicas del agua de coco obtenida de coco inmaduro, maduro y demasiado maduro. A medida que el coco madura, el pH, la turbidez, el contenido de minerales y el contenido de sacarosa aumentan, mientras que el volumen de agua, la acidez titulable, los sólidos solubles totales, el contenido de fenoles totales, la fructosa y la glucosa disminuyen (Tan et al., 2014).

Se han utilizado varias técnicas para identificar los compuestos en el agua de coco. Costa et al. (2015) utilizaron la técnica de espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier (FT-ICR MS) combinada con una fuente de ionización por ionización por electrospray (ESI) para describir compuestos durante la degradación del agua de coco. La predicción de la calidad en agua de coco microfiltrada y con adición de ácido L-ascórbico se ha llevado a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN),

Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), revelando que la adición de ácido L-ascórbico retrasó la rancidez (Purkayastha et al., 2012). Se han empleado la espectroscopía de RMN y quimiometría para evaluar las variaciones de metabolitos primarios en diferentes procesos químicos y térmicos del agua de coco (Sucupira et al., 2017). Además, en agua de coco maduro, se han identificado 18 metabolitos como biomarcadores diferenciales, utilizando una técnica metabolómica que emplea cromatografía líquida de ultra rendimiento junto con espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS / MS) y aplicando análisis estadístico multivariado (Chen et al., 2018).

Hasta donde se sabe, no se ha informado previamente de ningún otro estudio sobre los cambios en las propiedades químicas del agua de coco verde y maduro, considerando también los cambios en los compuestos volátiles. El objetivo de este trabajo fue evaluar la composición química y el perfil aromático del agua de coco de frutos verdes y maduros utilizando RMN y HS-SPME-GC-MS para identificar compuestos químicos asociados con diferentes estados de madurez.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Químicos y reactivos

Todos los productos químicos usados eran de calidad analítica y se adquirieron del fabricante de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.2.2. Muestreo

Se recolectaron frutos de coco verdes (6 meses) y maduros (12 meses) de una plantación de cocoteros en el municipio de Benito Juárez (Guerrero, México). Los cocos se enjuagaron inicialmente con agua del grifo, seguido de 15 min de desinfección en agua clorada (100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sodio) y luego, se cortaron para extracción de agua, se filtraron con una tela de muselina y se congelaron a -17 ± 2 °C para un análisis detallado posterior.

3.2.3. Análisis de RMN

Los análisis se efectuaron en un espectrómetro de RMN (400 MHz Agilent Technology Inc., Sta Clara, California, EUA). Los desplazamientos químicos de ^1H se midieron en D_2O en relación con TMS como patrón interno. Las condiciones típicas para los espectros de protones se tomaron del trabajo de Sucupira et al. (2017) con algunas modificaciones, como sigue: ancho de pulso de 45° , tiempo de adquisición de 2.5 s, tamaño de FT de 32 K y resolución digital de 0.3 Hz por punto. Las condiciones típicas para los espectros de carbono fueron las siguientes: ancho de pulso de 45° , tamaño de FT de 65 K y resolución digital de 0.5 Hz por punto. El número de escaneos varió de 1200 a 10,000 por espectro. Para la supresión de agua se aplicó la secuencia de pulsos PRESAT (d 4,66). Se utilizó el software MestreC v2.3 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España) para procesar los datos de RMN.

3.2.4. Análisis HS-SPME-GC-MS

Para el análisis de Microextracción en Fase Sólida en modo Espacio de Cabeza, acoplada a Cromatografía de Gases con detectores de Espectrometría de Masas (HS-SPME-GC-MS) se utilizó la metodología propuesta por De Marchi et al. (2015) con algunas modificaciones. Se transfirió una alícuota de 5 ml de agua de coco a un vial de 20 ml y se añadieron juntos 2 g de NaCl. El vial se cerró con un tapón de sílice revestido de teflón (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) y se equilibró a 50°C durante 10 min con agitación constante. Se expuso fibra de microextracción en fase sólida (DVB / CAR / PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) durante 60 min en el espacio de cabeza del vial. Los compuestos adsorbidos por HS-SPME se analizaron en un cromatógrafo de gases (GC) conectado con un detector de masas que funciona en modo de ionización electrónica (EI) (fuente de ionización interna; 70 eV) con un rango de exploración de m/z 35 a 300 (sistema Agilent 1200, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA).

La separación se llevó a cabo en una columna capilar de sílice fundida HP-INNOWax (30 m de 0.32 mm de DI, espesor de película de 0.5 μm , Agilent, EUA). La temperatura inicial del horno de GC fue de 40 °C y se elevó a 150 °C con una velocidad 2 °C min^{-1} , luego aumentó a 6 °C min^{-1} hasta que alcanzó 250 °C, que se mantuvo durante 15 min. El gas de arrastre fue helio grado cromatográfico a un caudal de columna constante de 1.5 ml min^{-1} . Las muestras se analizaron por triplicado. La identificación de los compuestos se basó en la coincidencia de espectros de masas con la biblioteca estándar NIST-98 / Wiley y los índices de retención lineal (LRI) en comparación con la literatura. Los LRI se calcularon en las mismas condiciones cromatográficas después de la inyección de una serie de n-alcanos C7-C30 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Análisis de RMN

En la Figura 3 se muestra una comparación de los espectros representativos de RMN del agua de coco verde y maduro. Las señales indicadas son propias de los compuestos etiquetados dado que el espectro es de agua de coco, misma que contiene una mezcla de carbohidratos y ácidos orgánicos, entre otros metabolitos. Se observa que el área de los compuestos que aparecen entre δ 3.2 y δ 4.4 es mayor en el agua de coco verde que en el agua de coco maduro. Esta zona pertenece principalmente a señales de protones característicos de los carbohidratos, que se han encontrado en una alta concentración en el agua de coco verde y que se reducen cuando el coco madura (Tan et al., 2014). La conversión de los principales azúcares del agua de coco, como glucosa y fructosa en sacarosa, cuando el fruto madura, es evidente en la zona de δ 4.0 a δ 5.5, que corresponde a estos carbohidratos (Sucupira et al., 2017).

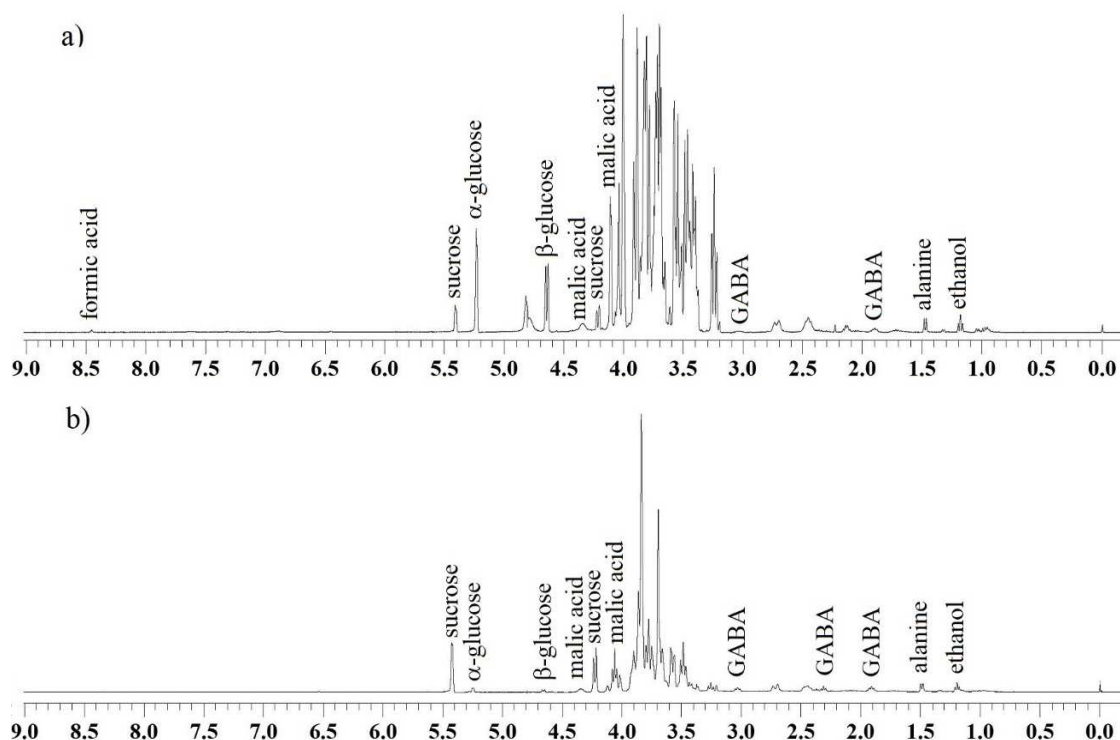


Figura 3. Espectros característicos de ^1H -RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b).

La expansión de la zona de menor frecuencia del espectro (Figura 4) muestra los aminoácidos libres, ácidos orgánicos y grupos metilo terminales (Purkayastha et al., 2012; Sucupira et al., 2017), se observa que la mayoría de estos compuestos presentes en el agua de coco verde (Figura 4a) se encuentran en el agua de coco maduro (Figura 4b) en proporciones similares. No se identificó ácido oleico en ninguna de las dos muestras analizadas (agua de coco verde y maduro). El aminoácido valina también aumenta en el agua de coco maduro. La presencia de etanol en el agua de coco verde es mayor que en el agua de coco maduro, además no implica necesariamente contaminación o fermentación en ambas muestras (verde y maduro), ya que se ha encontrado en el agua de coco verde fresco. El ácido láctico aumenta en el agua de coco maduro, mientras que el aminoácido alanina disminuye a medida que el fruto madura. El ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido málico y ácido acético permanecen casi en las mismas proporciones en el agua de coco verde y maduro.

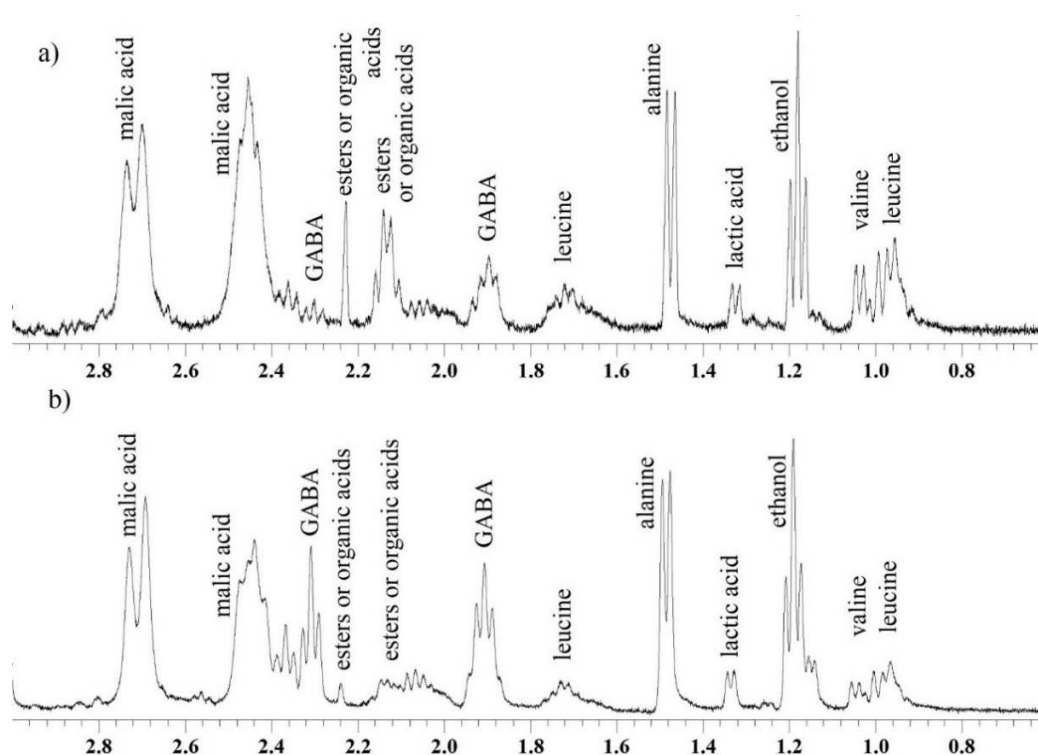


Figura 4. Expansiones del espectro de RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b) (δ 0.6 a δ 3.0).

La región donde se detectan hidrógenos de grupos hidroxilo (Figura 5) muestra que la glucosa en el agua de coco verde se encuentra en niveles más altos que en el agua de coco maduro. Además, la sacarosa y el ácido málico son más altos en el agua de coco verde que en el agua de coco maduro. La proporción de glucosa, fructosa y sacarosa disminuye a medida que el fruto madura, siendo la glucosa el azúcar más afectado al aumentar la madurez. Estos cambios se deben a la degradación enzimática de estos azúcares que generan mayor cantidad de etanol en el agua de coco.

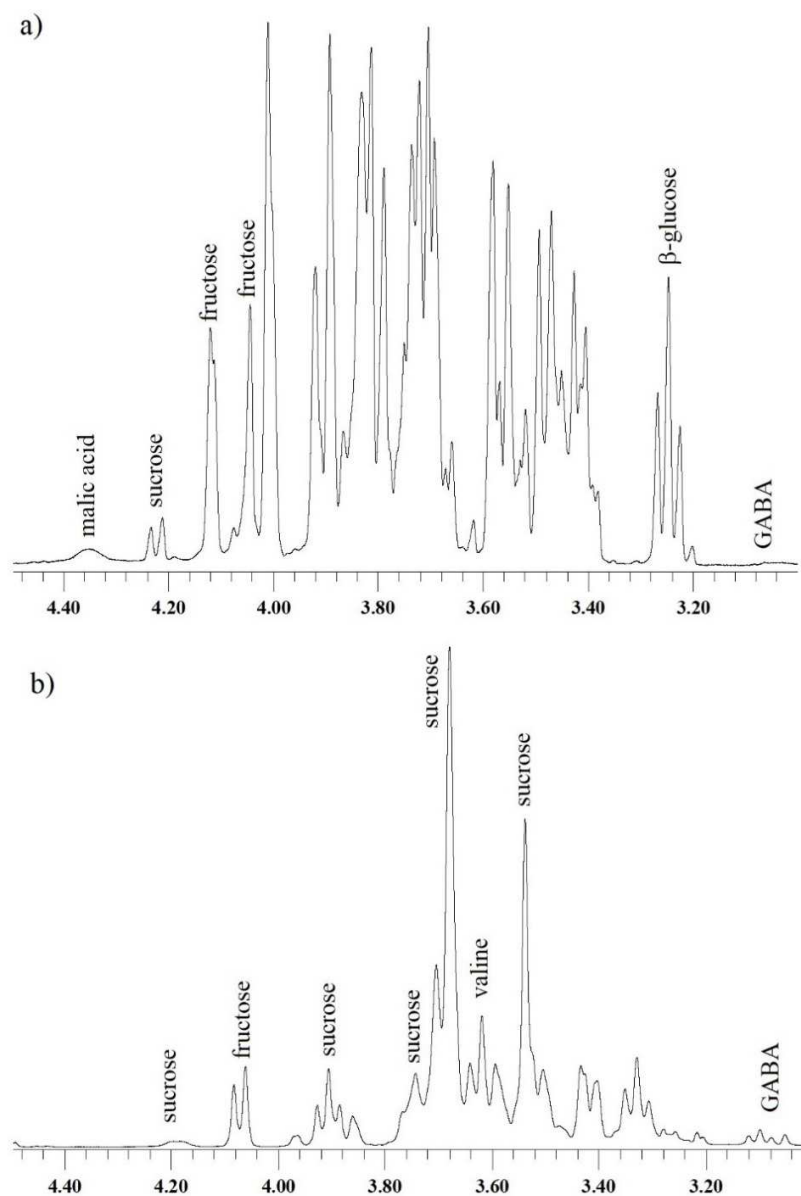


Figura 5. Expansiones del espectro de RMN de agua de coco verde (a) y maduro (b) (δ 3.0 a δ 4.5).

La Figura 6 muestra una expansión de la continuación de la zona de hidrógeno carbinólico, donde se observa que la glucosa y la sacarosa se encuentran en altas concentraciones en el agua de coco verde mientras que el agua de coco maduro solo retiene algo de α -glucosa. La β -glucosa se encontró en el agua de

coco verde, mientras que no se detectó en el agua de coco maduro. En el agua de coco maduro, se encontró la señal del protón anomérico α -ramnopiranosil, mientras que en el agua de coco verde no estaba presente. El ácido fórmico (δ 8,46) está presente en el agua de coco verde en pequeñas concentraciones; sin embargo, no se detectó en agua de coco maduro. La ausencia de ácido fórmico en el agua de coco maduro se puede atribuir a la formación de dioles (Gibson, 1969), que se han detectado en los compuestos volátiles del agua de coco maduro en concentraciones relativamente altas (8%).

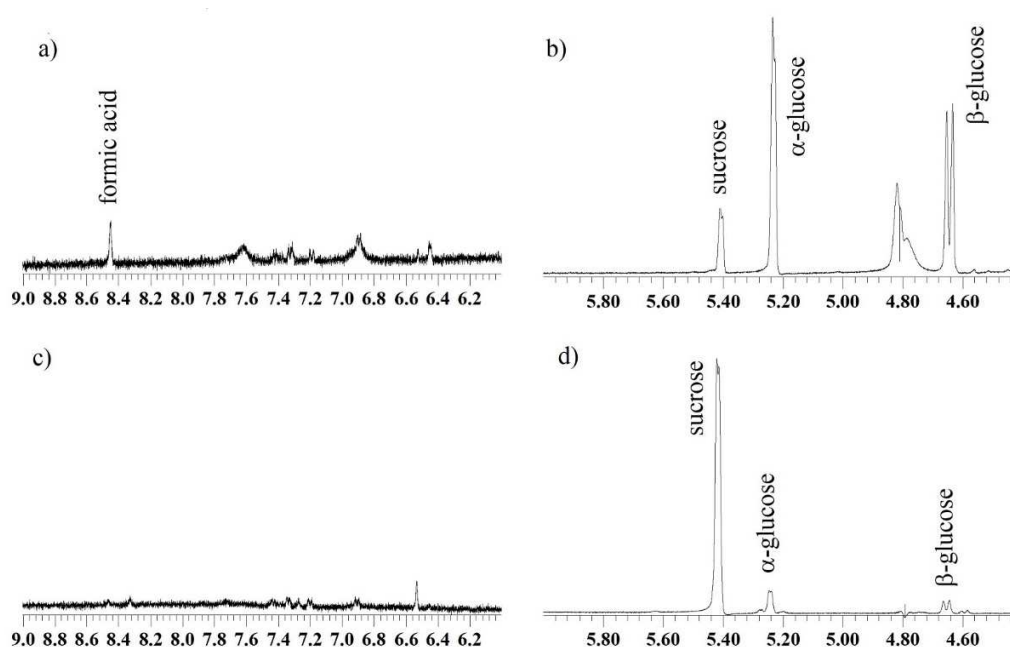


Figura 6. Expansiones del espectro de ^1H -RMN de agua de coco, verde fresco (a) δ 6.0 a δ 9.0, b) δ 4.4 a δ 6.0) y maduro (c) δ 6.0 a δ 9.0, d) δ 4.4 a δ 6.0)

3.3.2. Análisis HS-SPME-GC-MS

Los compuestos volátiles identificados en el agua de coco verde y maduro fueron 51 en conjunto (Cuadro 2). Para el agua de coco verde, fueron identificados 30 compuestos, mientras que para el agua de coco maduro se identificaron 32 compuestos. 19 compuestos fueron identificados solamente en el agua de coco verde, y 21 compuestos solamente en agua de coco maduro. Los compuestos

comunes en ambas aguas fueron 11, cuyos nombres son; octanal, trans-1,2-bis-(1-metiletenil) ciclobutano, alcohol feniletílico, β -Terpineol, ácidos octanoico, ácido nonanoico, timol, selinano, 2,6-di-ter-butilquinona, galaxólido, ftalato de isobutilo ácido ftálico y éster diisobutilico.

Los compuestos más abundantes en el agua de coco verde fueron: 2,6-di-ter-butilquinona, ácido octanoico, ácido dodecanoico, 2-etil-3-hidroxihexil-2-metilpropanoato, alfa terpineol y el ácido n-decanoico, mientras que en el agua de coco maduro eran: 3-ter-butil-4-hidroxianisol, 1-octanol, 2-hexanona, 3-metil-, 2,6-di-ter-butilquinona y diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol. Se han reportado otros compuestos volátiles abundantes en el agua de coco (De Marchi et al., 2015), como acetaldehído, benzaldehído, 2-etil-1-hexanol, 3,4-dimetil benzaldehído, ácidos octanoico, decanoico y dodecanoico, 3-penten-2-ona (especialmente en las muestras con tratamiento térmico) y octanol.

Cuadro 2. Compuestos identificados por HS-SPME-GC-MS en agua de coco verde y maduro.

N	Nombre del componente	RT	LRI	Verde	Maduro
				Area (%)	Area (%)
1	2-heptanona	5.386	829.724	-	1.662264
2	Ciclopropano, propil-	5.598	838.7261	0.171296	-
3	3-metil-2-hexanona	6.089	859.5754	-	13.35244
4	1-hexanol, 4-metil-	7.999	936.4536	-	0.351516
5	5-hepten-2-ona, 6-metil-	8.357	950.0761	0.129352	-
6	Ácido pentanoico	8.473	954.4901	-	5.843034
7	Ácido hexanoico, éster etílico	8.695	962.9376	-	1.211657
8	Octanal	8.849	968.2268	0.16821	0.562394
9	Benceno, 1-metil-3- (1-metiletil) -	9.407	990.0304	0.143185	-
10	Ciclobutano, 1,2-bis (1-metiletenil) -, trans-	9.541	994.5586	0.332193	0.469034
11	Ciclopentano, 1,1-dimetil-	10.512	1034.878	0.236047	-
12	1-octanol	10.532	1035.705	-	13.67899
13	cis-dihidro- α -terpineol	10.54	1036.036	0.131785	-
14	2-nonanona	11.032	1056.392	-	1.079875
15	o-isopropeniltolueno	11.082	1058.461	0.170996	-
16	Benceno, 1-etil-3,5-dimetil-	11.1	1059.206	-	0.260973
17	2-Nonanol	11.291	1067.108	-	0.441483

N	Nombre del componente	RT	LRI	Verde	Maduro
				Area (%)	Area (%)
18	Nonanal	11.385	1070.997	0.676735	-
19	2-Nonen-1-ol	11.394	1071.369	-	0.540434
20	Alcohol feniletílico	11.663	1081.92	0.244913	0.379983
21	1,7-octadien-3-ol, 3,7-dimetil-	12.209	1104.695	0.250859	-
22	3-ciclohexen-1-ol, 1-metil-4- (1-metiletil) -	12.218	1105.038	-	0.594427
23	Ciclohexanol, 1-metil-4- (1-metiletenil) -	12.561	1135.229	0.404952	0.316604
24	Ácido octanoico	13.48	1153.206	4.488199	1.123191
25	.alpha.-Terpineol	13.696	1161.45	1.970762	-
26	1,10-Decanodiol	13.872	1168.168	0.42739	-
27	Ácido nonanoico	15.408	1229.08	0.816	1.663329
28	Timol	15.873	1248.757	1.800572	1.315807
29	Pentano, 3,3-dimetil-	16.034	1255.012	-	0.284898
30	Ciclopentano, 1,1,3,4-tetrametil-, cis-	16.118	1258.492	-	0.306474
31	Selinane	17.118	1299.917	0.543026	0.500505
32	m-Cresol, TBDMS	17.352	1310.311	0.15691	-
33	2-metilpropanoato de 2-etil-3-hidroxihexilo	17.719	1326.622	1.993964	-
34	ácido n-decanoico	17.768	1328.8	1.807784	-
35	Fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil) -	19.061	1386.267	0.279823	-
36	3-terc-butil-4-hidroxianisol	19.559	1408.953	-	21.81409
37	2,6-di-terc-butilquinona	19.683	1414.827	5.872897	9.574027
38	Ciclotetradecano	19.865	1423.449	-	1.644567
39	.delta.-Nonalactona	20.344	1446.139	-	6.685615
40	Lilial	21.02	1478.162	0.207011	-
41	Diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol	22.141	1533.066	-	7.989209
42	Ftalato de dietilo	22.2	1536.022	-	0.379077
43	cis-.beta.-Farneseno	22.685	1560.321	-	0.273545
44	Ácido dodecanoico	21.748	1513.377	2.659183	-
45	2,6-bis (1,1-dimetiletil) -4- (1-oxopropil) fenol	22.817	1566.934	0.13196	-
46	Hedione	23.368	1594.539	0.220563	-
47	1-penten-3-ona, 1- (2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il) -	23.674	1610.429	0.233277	-
48	3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldehído	25.395	1701.616	-	4.393581
49	Galaxolida	26.909	1785.961	0.43105	0.404415
50	Tonalid	27.054	1794.039	-	0.223561
51	Ácido ftálico, éster de diisobutilo	27.119	1797.66	1.286048	0.678992

3.4. Conclusiones

El agua de coco se analizó en dos estados de maduración, la proporción de 2,6-di-ter-butilquinona en agua de coco maduro, indicó un aumento en el grado de oxidación en esta etapa de maduración. La presencia de 3-ter-butil-4-hidroxianisol y 1-octanol explican las diferencias en las propiedades organolépticas del agua de coco maduro. El análisis de RMN indicó una disminución en el contenido y proporción de azúcares presentes en el agua de coco maduro, y la presencia de etanol no implica necesariamente contaminación o fermentación en ambas muestras (verde y maduro), ya que se ha encontrado en verde fresco. agua de coco. La GC y la RMN son herramientas muy poderosas para el estudio de la composición química y los compuestos volátiles del agua de coco en diferentes etapas de maduración.

3.5. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por una beca de la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo, México. A.J. Arzeta-Ríos agradece el apoyo de beca del CONACYT, México.

3.6. Literatura citada

- Campos, C. F., Souza, P. E. A., Coelho, J. V., & Glória, M. B. A. (1996). Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20(6), 487–500. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00761.x>
- Chen, W., Zhang, G., Chen, W., Zhong, Q., & Chen, H. (2018). Metabolomic profiling of matured coconut water during post-harvest storage revealed discrimination and distinct changes in metabolites. *RSC Advances*, 8(55), 31396–31405.
- Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Oliveira, B. G., Ogawa, E. M., Korres, A. M. N., Ventura, J. A., & Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 174, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.154>
- De Marchi, F., Aprea, E., Endrizzi, I., Charles, M., Betta, E., Corollaro, M. L., Cappelletti, M., Ferrentino, G., Spilimbergo, S., & Gasperi, F. (2015). Effects of Pasteurization on Volatile Compounds and Sensory Properties of Coconut

- (*Cocos nucifera* L.) Water: Thermal vs. High-Pressure Carbon Dioxide Pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1501-4>
- Gibson, H. W. (1969). Chemistry of formic acid and its simple derivatives. *Chemical Reviews*, 69(5), 673–692. <https://doi.org/10.1021/cr60261a005>
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.
- Purkayastha, M. Das, Kalita, D., Das, V. K., Mahanta, C. L., Thakur, A. J., & Chaudhuri, M. K. (2012). Effects of L-ascorbic acid addition on micro-filtered coconut water: Preliminary quality prediction study using 1H-NMR, FTIR and GC-MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 184–199.
- Sucupira, N. R., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., & Sousa, P. H. M. (2017). NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry*, 216, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.035>
- Tan, T.-C., Cheng, L.-H., Bhat, R., Rusul, G., & Easa, A. M. (2014). Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chemistry*, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144.

4. CHANGES IN CHEMICAL COMPOSITION OF GREEN AND MATURE COCONUT WATER AFTER STORAGE

Abstract

Postharvest storage of coconut fruits has been of special interest since it is a major factor in the utilization of this product, either for fresh consumption or for industrialization. The chemical properties of coconut water are affected by multiple factors, such as variety, growing region, fruit maturity stages, and storage conditions. The objective of this work was to compare the chemical changes occurring in the water of green and mature coconut fruits during storage, using physicochemical analysis and ¹H-NMR-based chemometrics. Physicochemical analysis, ¹H-NMR spectroscopy, and chemometric analysis were applied using unsupervised and supervised methods. It was found that the main variables affected by storage were °Brix and pH. In chemometric analysis, supervised methods obtained a better separation of samples into groups. The OPLS discriminative analysis achieved complete separation of groups by maturity stage and storage time. Tender coconut water had a more significant deterioration than mature coconut water. It was observed by chemometrics that sugars, malic acid, and GABA are significant variables when separating the samples into clearly differentiated groups.

Keywords: *Cocos nucifera*, chemical changes, maturity stages, NMR, chemometrics, multivariate analysis.

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUA DE COCO VERDE Y MADURO DESPUÉS DEL ALMACENAMIENTO

Resumen

El almacenamiento postcosecha de los frutos de coco ha sido de especial interés ya que es un factor importante en la utilización de este producto, ya sea para su consumo en fresco o para su industrialización. Las propiedades químicas del agua de coco se ven afectadas por múltiples factores, como la variedad, la región de cultivo, los estados de madurez del fruto y las condiciones de almacenamiento. El objetivo de este trabajo fue comparar los cambios químicos que ocurren en el agua de frutos de coco verdes y maduros durante el almacenamiento, utilizando análisis fisicoquímicos y quimiometría basada en $^1\text{H-NMR}$. Se aplicó el análisis fisicoquímico, la espectroscopia $^1\text{H-NMR}$ y el análisis quimiométrico utilizando métodos no supervisados y supervisados. Se comprobó que las principales variables afectadas por el almacenamiento eran el °Brix y el pH. En el análisis quimiométrico, los métodos supervisados obtuvieron una mejor separación de las muestras en grupos. El análisis discriminativo OPLS logró una separación completa de los grupos por estado de madurez y tiempo de almacenamiento. El agua de coco tierna tuvo un deterioro más significativo que el agua de coco madura. Se observó mediante quimiometría que los azúcares, el ácido málico y el GABA son variables significativas a la hora de separar las muestras en grupos claramente diferenciados.

Palabras clave: Cocos nucifera, cambios químicos, estados de madurez, RMN, quimiometría, análisis multivariante.

4.1. Introduction

Coconut water is a natural beverage consumed for the benefits it provides to the human body, which are attributed to chemical composition. Green coconut water is highly demanded as a refreshing or sports drink (Cappelletti et al., 2015; Ignacio & Miguel, 2021). It has also been used for its nutritional and therapeutic value to inhibit and alleviate numerous problems associated with health, and as a suitable medium to promote growth (Naik et al., 2020). On the other hand, mature coconut water has been underutilized, and attempts have been made to add value by using it to produce “nata de coco”, coconut champagne, coconut water concentrates, vinegar, components for tissue culture and enzyme production, biogas generation, and blended with fruit juices (Chauhan et al., 2014).

Coconut water is mainly composed of sugars and minerals; however, it has a typical flavor and some original properties (Prades, Dornier et al., 2012). The constituents of coconut water are classified as sugars, sugar alcohols, inorganic ions, vitamins, lipids, amino acids, nitrogenous compounds, organic acids, enzymes, and phytohormones (Yong et al., 2009). Essential elements such as Fe, Cu, Mn, and Zn are found in the form of complexes, varying according to the maturity and origin of the fruits (Alchoubassi et al., 2021). The chemical composition of coconut water has been studied in fruits at different maturity stages, from green or tender to overly-mature, also considering the inactivation of enzymes (Tan et al., 2014). Likewise, the antioxidant properties of green and mature coconut water (Arzeta-Ríos et al., 2020), and the chemical and quality properties of fresh and bottled coconut water have been considered (Walter & Kuaye, 2014).

Postharvest quality of tender coconut water has been evaluated by observations of weight loss, water volume, pH, total sugars, amino acids, minerals, and sensory tests (Haseena et al., 2010). Chemical constituents of coconut water are affected by storage time Costa et al. (2015) studied the physicochemical degradation of coconut water during storage at room temperature, correlating results from conventional methodologies with readings obtained by subjecting coconut water

to an Electrospray Ionization (ESI) source combined with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR MS). The spoilage mechanisms of tender coconut water have been studied with the application of metabolomics to determine the storage time limit. Zhang et al. (2020) analyzed the effect of refrigerated storage on coconut water metabolites. Storage of mature coconuts, with a focus on fruit water metabolites, has been studied to identify differential biomarkers. Chen et al. (2018) employed supervised and unsupervised multivariate methods to analyze samples of mature coconut water stored for five months. Shelf life and metabolic changes during storage have also been studied in mature coconut fruits (Luengwilai et al., 2014).

Metabolomics approaches for coconut water have been based on Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer (UPLC-MS/MS), and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Chen et al., 2018; Cunha et al., 2020; Paul & de Boves Harrington, 2021). Metabolomics with chemometrics has been applied in food adulteration detection. ¹H-NMR spectra have worked as the basis for non-targeted metabolomics (C.-H. Yong, Muhammad, Aziz, Nasir et al., 2022; C.-H. Yong, Muhammad, Aziz, Ng et al., 2022). Likewise, chemometric analysis has been applied in the study of fruits and vegetables to determine quality and freshness parameters (Li et al., 2021). Another utility has been in the determination of ages and harvesting periods in olive oil (Bouchaala et al., 2014), and to evaluate and predicting fruit quality at ripening and during storage (Aioriello et al., 2018; Nicolosi et al., 2018). Likewise, the characterization of fruit varieties such as apple (Tomita et al., 2015), and mandarin (Migues et al., 2021) has been carried out by ¹H-NMR-based metabolomic profiling. Chemometric analyses have also been used to define harvest times due to their sensitivity (Migues et al., 2021), as well as in the geographical discrimination of fruits and wines (López-Aguilar et al., 2021). NMR and GC-MS-based metabolomics has been applied to characterize water-soluble and volatile compounds in processed vegetables such as cabbage vinegar (Ishihara et al., 2018). Kumar et al. (2021) characterized coconut water from fruits of different developmental stages using

the GC-MS-based metabolomics approach. Additionally, NMR-based chemometric analysis has been employed to understand variations in the chemical composition of coconut water (Sucupira et al., 2017). Therefore, the aim of this work was to compare changes in the chemical composition of green and mature coconut water caused by storage, using physicochemical and chemometric analyses based on ^1H -NMR.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Plant material

Green (6 months) and mature (12 months) coconuts were collected from a plantation located in the municipality of Benito Juárez, Guerrero, Mexico. They were stored at room temperature for a period of three months (t_0 =start of storage, and t_f =end of storage), considering sampling points in time with separation of 15 days, having as experimental unit one coconut and performing four replicates per sampling point.

4.2.2. Storage conditions

To evaluate the effect of storage on coconut water quality, measurements of storage temperature and relative humidity were taken with a HOBO datalogger (ONSET, Massachusetts, USA). Data acquisition was carried out every 2 min during the three months of the experiment.

4.2.3. Chemicals and reagents

All chemicals used in this study were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA.

4.2.4. Determination of physicochemical properties

The volume of water was measured with a graduated cylinder. Total soluble solids (TSS) were measured with a digital refractometer (ATAGO, Japan) and expressed as °Brix at 25 °C. The pH was determined using a Beckman phi 40

potentiometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, California). Electrical conductivity was measured using a pocket conductivity meter.

4.2.5. NMR spectroscopy

A solution containing 14 mM EDTA and 1% TMSP dissolved in deuterated water was prepared. A 10 mL aliquot of the resulting coconut water samples was taken and filtered using Whatman No. 2 filter paper, then 0.2 mL of the filtrate was taken and transferred to 5 mm resonance tubes and mixed with the EDTA, TMSP, and D₂O solution. NMR experiments were carried out on an Agilent 400-MHz spectrometer. NMR spectra were acquired in triplicate using a PRESAT pulse sequence for the removal of the water signal (δ 4.86).

Care was taken to disregard signals near the water peak to avoid the influence of satellite or parasitic signals residual from the water signal. ¹H spectra were acquired, with a total of 64 scans, with a spectral window of 12 ppm, an acquisition time of 5 s, and a relaxation time of 10 s, according to methodology of Sucupira et al. (2017). The spectra were processed in the Vnmrj program (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) and with the MestreC v2.3 software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) to process the NMR data.

4.2.6. Chemometrics

Data transformation and obtaining the NMR matrix was done with the NMRProcFlow platform. Baseline correction, spectra alignment, and spectrum segmentation into buckets were performed. Chemometric analysis was performed using the open-access MetaboAnalys 5.0 platform. Principal Component Analysis (PCA) was used as an unsupervised method. The supervised methods used were Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLS-DA), and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA).

4.3. Results and discussion

4.3.1. Effect of storage on pH, °Brix, and conductivity

During the three months of coconut storage, the average room temperature was 17.5 °C, with a maximum of 21.0 °C and a minimum of 13.7 °C. The average relative humidity was 66.1%, with a maximum of 79.7% and a minimum of 35.8%. Storage temperature was lower than reported by other authors (Costa et al., 2015; Haseena et al., 2010; Luengwilai et al., 2014), which could explain a longer shelf life compared to other studies. Relative humidity remained at values close to those reported in other studies (Luengwilai et al., 2014; Maciel et al., 1992). The changes in pH, conductivity, and °Brix due to storage time are shown in Figure 7. The pH of green coconut water is maintained during the first 30 days at values close to pH=5.3, a value very close to that reported in the literature (Costa et al., 2015; Haseena et al., 2010; Siriphanich et al., 2011), after that it starts to rise gradually until it reaches pH=6.5. According to Guo et al. (2022), in the pH range of 5.5 to 6.5 there is a gradual increase in yeast activity as pH increases, while, when exceeding this value, fermentation starts to decrease. The pH of mature coconut water remained stable throughout the storage time, with values close to pH=6.0, like that reported by literature (Chauhan et al., 2014; Chen et al., 2018; Siriphanich et al., 2011). Green coconut water ferments faster due to the high moisture content in the fiber and the poor development of the endocarp, which protects the interior of the seed, in addition to the loss of the perianth, which exposes the fruit to fungal attack (Haseena et al., 2010).

In mature coconut water, °Brix increased slightly and began to decrease gradually after the first month of storage. This may be due to high metabolism at the beginning of storage (Zhang et al., 2020) . After 75 days of storage, there was an increase in °Brix which may be attributed to water loss. In green coconut fruits, there was a noticeable deterioration in quality after the first month of storage, while in mature fruits no deterioration was observed until after 75 days of storage. A similar trend was reported by Luengwilai et al. (2014), however, Chen et al. (2018) reported a trend of decrease at the beginning of storage and °Brix increase from

the first month and continues to increase until the 5th month. These differences may be since the fruits stored in this study began to ferment and after 75 days the °Brix were concentrated because prolonged storage causes the loss of water from the fruits (Maciel et al., 1992; Pareek et al., 2011).

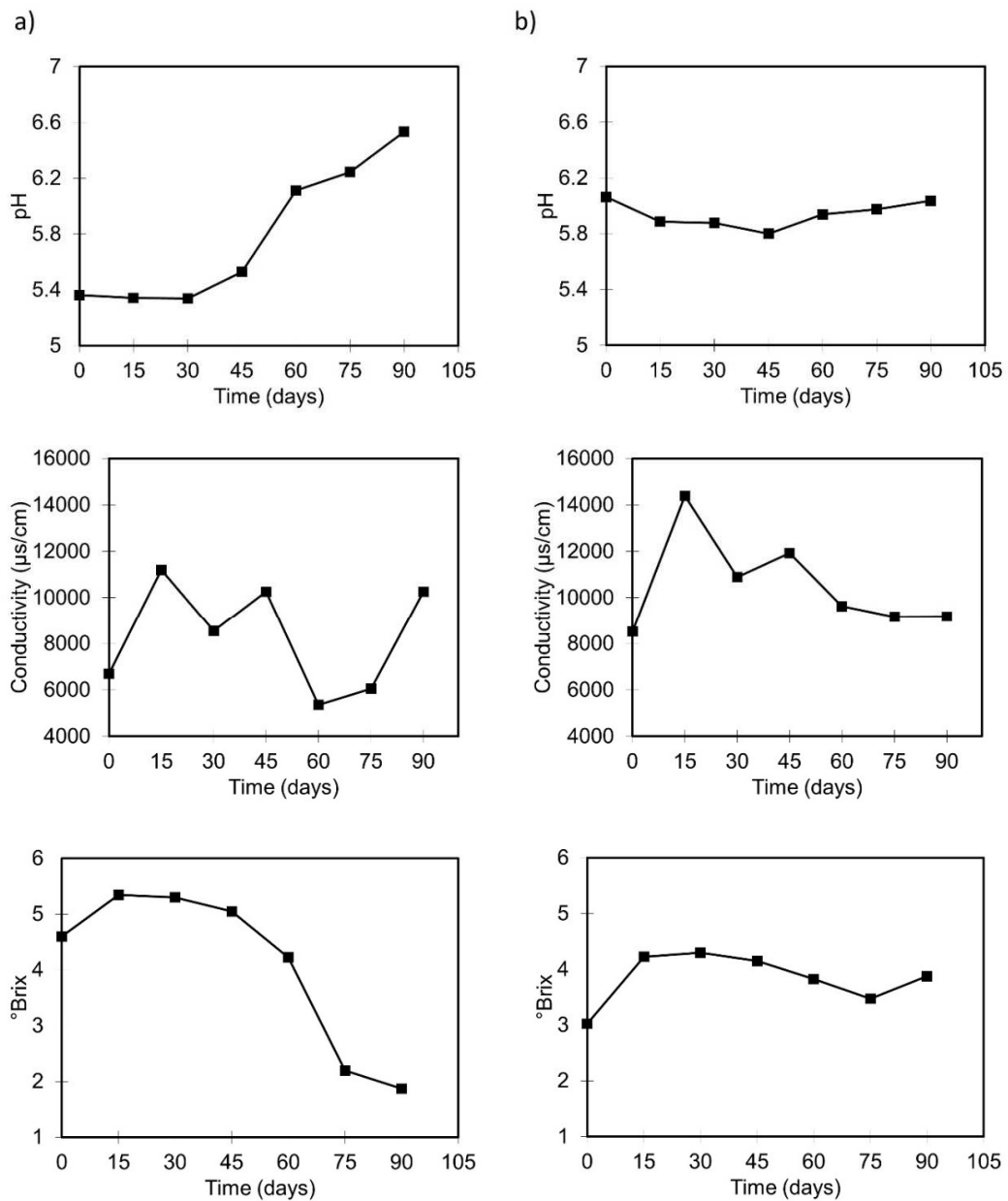


Figure 7. Changes in pH, conductivity and °Brix of green (a) and mature (b) coconut water during storage.

The electrical conductivity was highly variable in green coconut water ranging from 5,000 to 11,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, such variability has been reported in other studies (Delfiya & Thangavel, 2016; Kannangara et al., 2018). The electrical conductivity of mature coconut water started to stabilize in the last month of storage, reaching values close to 9,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a value very close to that reported by Chen et al. (2018) for three months of storage of mature coconut fruits. The °Brix of green coconut water increased from 4.6 to 5.3 in the first month of storage, like those reported by Maciel et al. (1992), and began to reduce drastically after 30 days of storage, due to the consumption of sugars during alcoholic fermentation promoted by microorganisms such as yeasts, which can grow easily in this natural medium (Prades, Assa, et al., 2012).

4.3.2. Characterization of the ^1H -NMR profile

The ^1H -NMR spectra obtained were arranged in four groups as shown in Figure 8. Special care was taken not to choose signals that were very close to the suppression space of the non-deuterated water, to avoid considering residual signals (López-Aguilar et al., 2021).

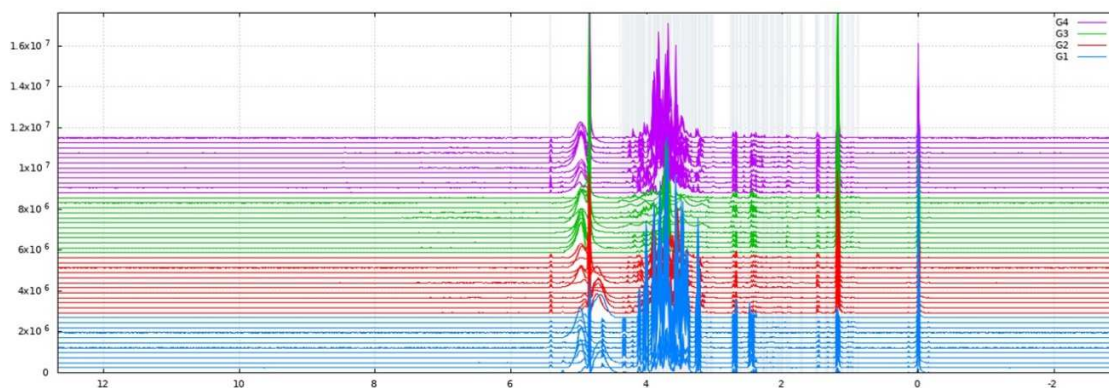


Figure 8. Stacked ^1H water_presat NMR spectra of the analyzed treatments, showing the buckets generated, for water from green coconuts at the beginning of storage (purple) and stored 3 months (green) and water from mature coconuts at the beginning of storage (red) and stored 3 months (blue).

A total of 146 buckets containing the main signals of the compounds present in coconut water were obtained. It was possible to identify some signals of the

spectrum by comparing similarities with databases and published literature (Cunha et al., 2020; Sucupira et al., 2017). Figure 9 shows the expansions of the ^1H -NMR spectra representative of each treatment (green and mature coconut water at time zero of storage and after three months of storage). Significant changes are observed in the section of sugars (ppm=3.2-4.2), organic acids (ppm=1.8-3.0), and amino acids (ppm=1.0-1.6) (Figure 9). Green coconut water at zero storage time contained the highest signal intensity corresponding to sugars, followed by mature coconut water stored for three months. According to Sucupira et al. (2017), the compounds with higher concentrations and not showing overlapping resonances are sucrose, α - and β -glucose, fructose, ethanol, and malic acid.

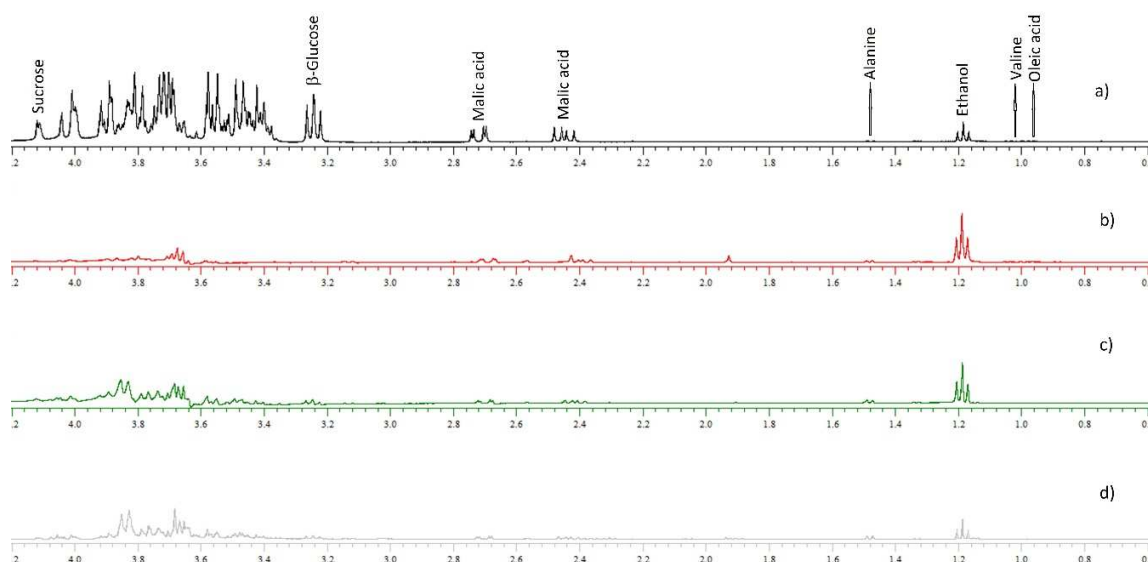


Figure 9. Selected portions of NMR spectra for chemometric analysis. a) green coconut water at zero storage time, b) green coconut water after three months of storage, c) mature coconut water at zero storage time and d) mature coconut water stored for three months.

In the NMR spectrum of green coconut water stored for three months (Figure 9a), a significant reduction in sugar content is observed with respect to green coconut water at the beginning of storage (Figure 9b), coinciding with the changes in sugar concentration ($^{\circ}\text{Brix}$) shown in Figure 7. Major differences are observed in the ethanol concentration (triplet at 1.2 ppm from methyl), which increases after

storage in the case of green coconut, mainly due to the fermentation process (Figure 9b). It should be noted that the presence of ethanol in freshly harvested coconut water is not a contaminant, ethanol has been reported to occur naturally (Sucupira et al., 2017). Mature coconut water does not show significant changes related to sugar concentration (Figures 9c and 9d), so it was necessary to complement the information with multivariate analysis.

It can also be appreciated that malic acid was found in high concentrations in green coconut water with respect to mature coconut water, however, it remained present in all samples (Chen et al., 2018; Cunha et al., 2020; Sucupira et al., 2017). The most evident change is in the sugar signals (3.2-4.2 ppm), which are observed greatly reduced in green coconut as storage time increases, but increases in the case of mature coconut, due to the increase in the concentration of metabolites caused by the loss of water.

4.3.3. Chemometric analysis

The ^1H -NMR spectra of green and mature coconut water at time zero (t_0) and three months of storage (t_f) were subjected to exploratory analysis. The first two components of the PCA (Figure 10a) accounted for 63.3% of the variance, while in the PLS-DA (Figure 10b) the variance explained by the first two components was 50.9%.

Chemometric studies of coconut water have applied PCA to reduce the dimensionality of the original data and to support the interpretation of multivariate analysis (Sucupira et al., 2017). With PCA, it was possible to differentiate mature coconut water samples at the beginning and end of storage. The variability of metabolites derived from storage time has been established using the PCA by examining the arrangement and grouping of samples as a function of their variance and exposing the samples to different principal components (Zainal et al., 2019). Most of the " t_0 " mature coconut water samples were positioned at positive values of PC1, while the samples at the end time were mostly positioned at negative values of the same PC. However, for green coconut water " t_0 " and " t_f "

clearly defined groups could not be separated into clusters and their grouping overlapped with those of mature coconut water.

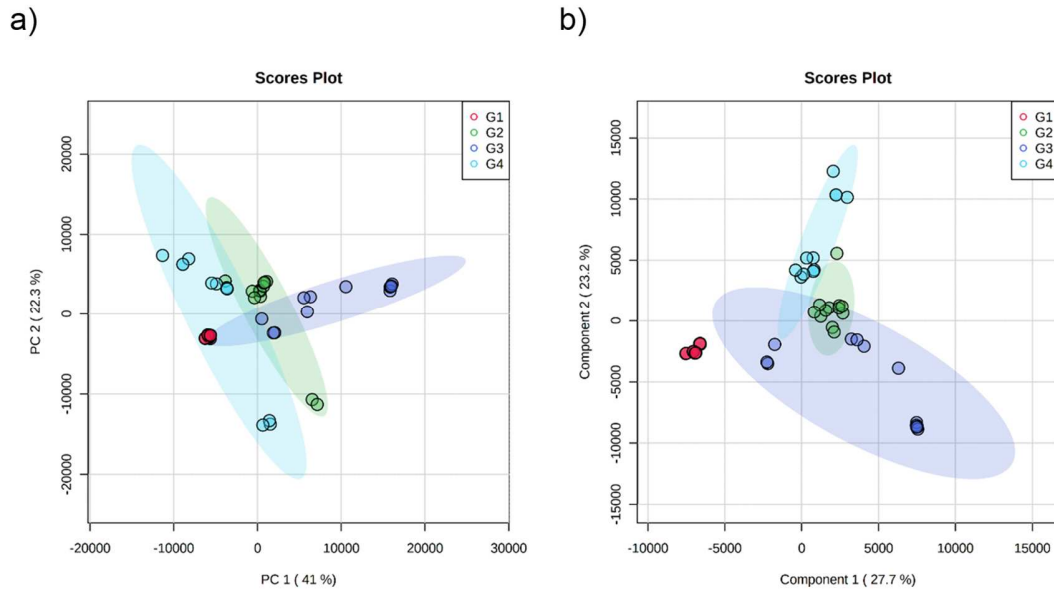


Figure 10. a) PCA and (b) PLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1, red), mature coconut water at the beginning of storage (G2, green), green coconut water after three months of storage (G3, blue) and mature coconut water at the end time (G4, cyan).

In PLS-DA a clear separation of the green coconut water "t₀" (negative values of PC1) from the rest of the samples is observed (Figure 10b). Differences between fruit maturity stages can be found by comparing sugar signals in NMR spectra (Migues et al., 2021). The difference between maturity stages in coconut water can be explained by the fact that tender fruit has a higher β -glucose content than mature fruit, while mature coconut water contains a higher concentration of sucrose. Our observation of sugar content in green and mature coconut water agreed with the findings of Tan et al. (2014). Likewise, the mature coconut water samples are in positive scores for both PC1 and PC2, observing the separation of initial and final storage times. The green coconut samples "t_f" showed the highest variability and overlapped with the mature coconut water samples "t₀".

The sPLS discrimination analysis had an explained variance of 41.1% for the first two components (Figure 11a). The formation of three groups was observed,

where green coconut water “t₀” was clearly differentiated, obtaining the highest positive values of PC1. Mature coconut water was positioned in negative values of PC1 and PC2, in addition, a clear difference between the no-storage condition and stored for three months could not be observed. Again, the cluster of green coconut water “t₃” showed the highest variability and was mainly positioned at negative PC1 and positive PC2 values.

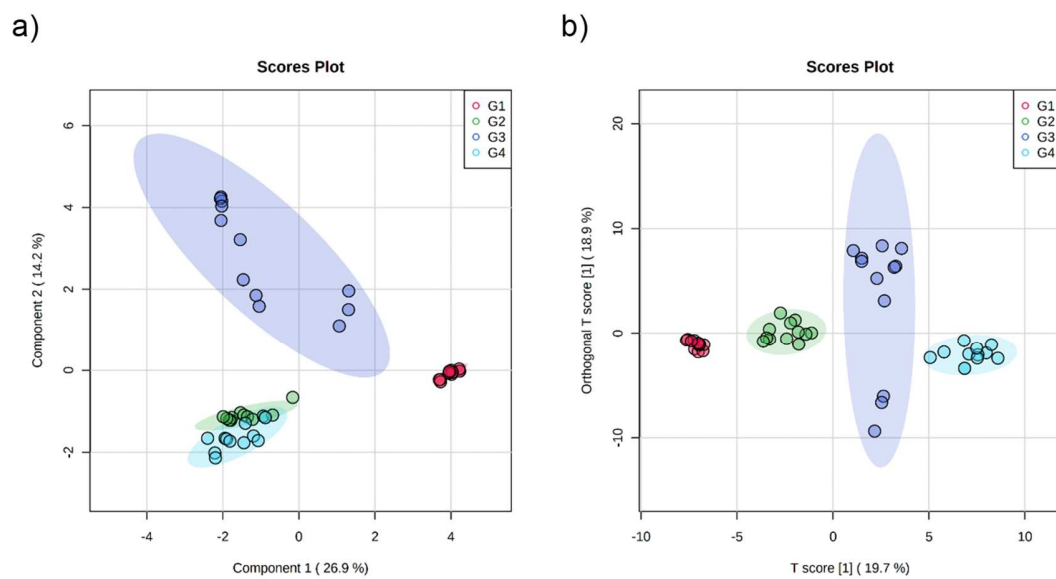


Figure 11. a) sPLS-DA and (b) OPLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1, red), mature coconut water at the beginning of storage (G2, green), green coconut water after three months of storage (G3, blue) and mature coconut water at the end time of storage (G4, cyan).

OPLS-DA can easily obtain better separation of samples by development stages and storage time (Figure 11b). The supervised OPLS-DA model allows obtaining the best possible information from the data set by refining the multivariate subspace through Monte-Carlo cross-validations (López-Aguilar et al., 2021). The separation of four groups of samples is most clearly observed, where coconut water samples at the beginning of storage fall in the T-score range <0 , while coconut water samples stored for three months fall in the T-score range >0 . Unambiguous discrimination is allowed by the distribution of the loadings around

the four quadrants obtained for the analysis of the samples (López-Aguilar et al., 2021).

The VIP (Variable Interdependent Parameters) scores obtained from the unsupervised methods (Figure 12) show the signals of the main compounds causing higher variation among the samples. The chemical shift with the greatest difference between the samples is the one found at 3.24, 3.99, and 3.27 ppm (Figure 6a), which correspond to the signal of methylene protons in sugars, mainly β -glucose. These results agreed with the chemometric model of Sucupira et al. (2017), who defined that the most important variables causing differences in coconut water samples are carbohydrates.

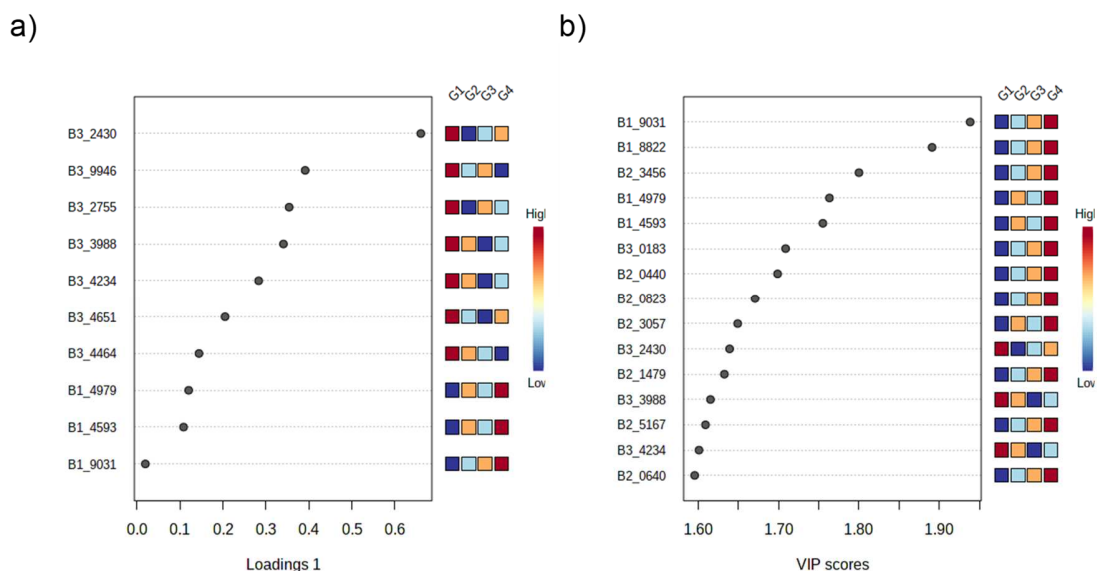


Figure 12. a) VIP score of sPLS-DA and (b) OPLS-DA of green coconut water at the beginning of storage (G1), mature coconut water at the beginning of storage (G2), green coconut water after three months of storage (G3) and mature coconut water at the end of the storage period (G4).

In addition, the VIP score of the OPLS analysis (Figure 12b) shows that the signal at 1.90 ppm, corresponding to the methyl protons in acetic acid causes the greatest difference between the samples. It is observed that the green coconut water "t₀" has this compound in the lowest concentration (G1), moreover, the concentration of acetic acid increases after three months of storage, both for

green coconut (G3) and mature coconut (G4). Signals at 1.88 ppm and 2.34 ppm correspond to methylene protons in gamma-aminobutyric acid (GABA), which is also found at a higher concentration in samples stored for three months. Chen et al. (2018) reported that gamma-aminobutyric acid is found in high concentrations in mature coconut water stored for three months. Alanine (1.49 ppm) is found in a much lower concentration in green coconut water than in mature coconut water, however, after storage, it increases in both cases. Green coconut water contains a higher concentration of malic acid (2.51 ppm) than mature coconut water. Storage of coconut water also causes an increase in malic acid concentration, agreeing with that reported by Chen et al. (2018). Ethanol, valine, and oleic acid were not considered discriminants in coconut water storage.

4.4. Conclusions

It was possible to determine by physicochemical analysis and ^1H -NMR-based chemometrics, which characteristics of coconut water change during storage. With the determination of physicochemical properties, it was found that the main variables affected by storage were °Brix and pH. In the chemometric analysis, the supervised methods obtained a better separation of the samples into groups. The OPLS discriminative analysis achieved complete separation of groups by maturity stage and storage time. In addition, it was determined which compounds are related to these physicochemical changes since it was observed by chemometrics that sugars, malic acid, and GABA are significant variables when separating the samples into clearly differentiated groups. Tender coconut water had a more significant deterioration than mature coconut water. The maintenance of the chemical properties of green coconut water for was up to 30 days, while those of mature coconut water were maintained for two months of storage. ^1H -NMR-based chemometrics was a powerful tool to obtain quantitative information on metabolite signals causing variation in coconut water samples.

4.5. References

- Alchoubassi, G., Kińska, K., Bierla, K., Lobinski, R., & Szpunar, J. (2021). Speciation of essential nutrient trace elements in coconut water. *Food Chemistry*, 339, 127680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127680>
- Amoriello, T., Ciccoritti, R., Paliotta, M., & Carbone, K. (2018). Classification and prediction of early-to-late ripening apricot quality using spectroscopic techniques combined with chemometric tools. *Scientia Horticulturae*, 240, 310–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.031>
- Arzeta-Ríos, A. J., Guerra-Ramírez, D., Reyes-Trejo, B., Ybarra-Moncada, M. C., & Zuleta-Prada, H. (2020). Microwave heating effect on total phenolics and antioxidant activity of green and mature coconut water. *International Journal of Food Engineering*, 16(12).
- Bouchaala, F. C., Lazzez, A., Jabeur, H., Daoud, L., & Bouaziz, M. (2014). Physicochemical characteristics of extra virgin olive oil in function of tree age and harvesting period using chemometric analysis. *Scientia Horticulturae*, 180, 52–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.056>
- Cappelletti, M., Ferrentino, G., Endrizzi, I., Aprea, E., Betta, E., Corollaro, M. L., Charles, M., Gasperi, F., & Spilimbergo, S. (2015). High pressure carbon dioxide pasteurization of coconut water: A sport drink with high nutritional and sensory quality. *Journal of Food Engineering*, 145, 73–81.
- Chauhan, O. P., Archana, B. S., Singh, A., Raju, P. S., & Bawa, A. S. (2014). A refreshing beverage from mature coconut water blended with lemon juice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3355–3361. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0825-6>
- Chen, W., Zhang, G., Chen, W., Zhong, Q., & Chen, H. (2018). Metabolomic profiling of matured coconut water during post-harvest storage revealed discrimination and distinct changes in metabolites. *RSC Advances*, 8(55), 31396–31405.
- Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Oliveira, B. G., Ogawa, E. M., Korres, A. M. N., Ventura, J. A., & Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 174, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.154>
- Cunha, A. G., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. v, Rodrigues, T. H. S., de Brito, E. S., & de Miranda, M. R. A. (2020). Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC-MS, UPLC-HRMS, and NMR. *Food Chemistry*, 126874.
- Delfiya, D. S. A., & Thangavel, K. (2016). Effect of ohmic heating on polyphenol oxidase activity, electrical and physicochemical properties of fresh tender coconut water. *International Journal of Food Engineering*, 12(7), 691–700.
- Guo, Y., Li, W., Chen, H., Chen, W., Zhang, M., Zhong, Q., & Chen, W. (2022).

- Optimization and Rheological Study of an Exopolysaccharide Obtained from Fermented Mature Coconut Water with *Lipomyces starkeyi*. *Foods*, 11(7), 999.
- Haseena, M., Kasturi Bai, K. v, & Padmanabhan, S. (2010). Post-harvest quality and shelf-life of tender coconut. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 686–689. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0097-y>
- Ignacio, I.-F., & Miguel, T.-S. (2021). Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. *South African Journal of Botany*, 141, 414–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.030>
- Ishihara, S., Inaoka, T., Nakamura, T., Kimura, K., Sekiyama, Y., & Tomita, S. (2018). Nuclear magnetic resonance-and gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomic characterization of water-soluble and volatile compound profiles in cabbage vinegar. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(1), 53–62.
- Kannangara, A. C., Chandrajith, V. G. G., & Ranaweera, K. (2018). Comparative analysis of coconut water in four different maturity stages. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 1814–1817.
- Kumar, M., Saini, S. S., Agrawal, P. K., Roy, P., & Sircar, D. (2021). Nutritional and metabolomics characterization of the coconut water at different nut developmental stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103738.
- Li, X., Sekiyama, Y., Nakamura, N., Suzuki, Y., & Tsuta, M. (2021). Estimation of komatsuna freshness using visible and near-infrared spectroscopy based on the interpretation of NMR metabolomics analysis. *Food Chemistry*, 364, 130381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130381>
- López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcals and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods*, 10(1), 157.
- Luengwilai, K., Beckles, D. M., Pluemjit, O., & Siriphanich, J. (2014). Postharvest quality and storage life of ‘Makapuno’ coconut (*Cocos nucifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 175, 105–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.005>
- Maciel, M. I., Oliveira, S. L., & da Silva, I. P. (1992). Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16(1), 13–22.
- Migues, I., Hodos, N., Moltini, A. I., Gámbaro, A., Rivas, F., Moyna, G., & Heinzen, H. (2021). ¹H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability. *Scientia Horticulturae*, 287, 110262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110262>
- Naik, M., CK, S., & Rawson, A. (2020). Tender coconut water: A review on recent

- advances in processing and preservation. *Food Reviews International*, 1–22.
- Nicolosi, E., Ferlito, F., Amenta, M., Russo, T., & Rapisarda, P. (2018). Changes in the quality and antioxidant components of minimally processed table grapes during storage. *Scientia Horticulturae*, 232, 175–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.050>
- Pareek, S., Yahia, E. M., Pareek, O. P., & Kaushik, R. A. (2011). Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*, 44(7), 1741–1751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.016>
- Paul, A., & de Boves Harrington, P. (2021). Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116165>
- Prades, A., Assa, R. R. A., Dornier, M., Pain, J., & Boulanger, R. (2012). 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.
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.
- Siriphanich, J., Saradhulhat, P., Romphopphak, T., Krisanapook, K., Pathaveerat, S., & Tongchitpakdee, S. (2011). 2 - Coconut (*Cocos nucifera* L.). In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 8–35e). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857092885.8>
- Sucupira, N. R., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., & Sousa, P. H. M. (2017). NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry*, 216, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.035>
- Tan, T.-C., Cheng, L.-H., Bhat, R., Rusul, G., & Easa, A. M. (2014). Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chemistry*, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>
- Tomita, S., Nemoto, T., Matsuo, Y., Shoji, T., Tanaka, F., Nakagawa, H., Ono, H., Kikuchi, J., Ohnishi-Kameyama, M., & Sekiyama, Y. (2015). A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chemistry*, 174, 163–172.
- Walter, E. H. M., & Kuaye, A. Y. (2014). Case study on the safety and sustainability of fresh bottled coconut water. *Global Safety of Fresh Produce*, 367–382. <https://doi.org/10.1533/9781782420279.5.367>
- Yong, C.-H., Muhammad, S. A., Aziz, F. A., Nasir, F. I., Mustafa, M. Z., Ibrahim,

- B., Kelly, S. D., Cannavan, A., & Seow, E.-K. (2022). Detecting adulteration of stingless bee honey using untargeted ¹H NMR metabolomics with chemometrics. *Food Chemistry*, 368, 130808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130808>
- Yong, C.-H., Muhammad, S. A., Aziz, F. A., Ng, J.-S., Nasir, F. I., Adenan, M. N. H., Moosa, S., Othman, Z., Abdullah, S. N. A., Sharif, Z., Ismail, F., Kelly, S. D., Cannavan, A., & Seow, E.-K. (2022). Detection of adulteration activities in edible bird's nest using untargeted ¹H-NMR metabolomics with chemometrics. *Food Control*, 132, 108542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108542>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144.
- Zainal, B., Ding, P., Ismail, I. S., & Saari, N. (2019). ¹H NMR metabolomics profiling unveils the compositional changes of hydro-cooled rockmelon (*Cucumis melo* L. *reticulatus* cv glamour) during storage related to in vitro antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 246, 618–633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.036>
- Zhang, Y., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Yun, Y., & Chen, W. (2020). Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. *Foods*, 9(1), 46.

5. EFECTO DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO DEL AGUA DE COCO EVALUADO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE RMN Y QUIMIOMETRÍA

Resumen

La composición química del agua de coco sometida a tratamiento térmico convencional y calentamiento con microondas, así como la composición del agua de frutos de coco de cuatro etapas de desarrollo, fue analizada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y quimiometría. La evaluación quimiométrica se llevó a cabo con la aplicación de modelos no supervisados y supervisados para el análisis multivariado de los datos. El análisis de componentes principales (PCA) fue aplicado para evaluar las diferencias en la composición del agua de coco debida al desarrollo del fruto, así como los efectos de los tratamientos térmicos en el agua de coco. El PCA solamente fue capaz de separar de manera aceptable las diferencias provocadas por el desarrollo del fruto, pero no de los tratamientos térmicos. Los métodos supervisados, Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) y Análisis Discriminante de Proyecciones Ortogonales a Estructuras Latentes (OPLS-DA) fueron capaces de detectar diferencias entre las edades, incluso las diferencias sutiles ocurridas por los tratamientos térmicos. El PLS-DA resultó ser menos sensible que el OPLS-DA. La distinción de muestras de diferentes etapas de maduración y la evaluación de efectos de tratamientos térmicos en agua de coco puede ser explicada satisfactoriamente mediante la aplicación de RMN y análisis quimiométrico de métodos supervisados.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, análisis multivariado, microondas, tecnologías alternativas.

EFFECT OF THERMAL PROCESSING OF COCONUT WATER EVALUATED BY NMR SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS

Abstract

The chemical composition of coconut water subjected to conventional heat treatment and microwave heating, as well as the composition of coconut water from four stages of development, was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and chemometrics. The chemometric evaluation was carried out with the application of unsupervised and supervised models for the multivariate analysis of the data. The principal component analysis (PCA) was applied to evaluate the differences in the composition of the coconut water due to the development of the fruit, as well as the effects of the thermal treatments in the coconut water. The PCA was only able to separate positively the differences caused by the development of the fruit, but not the thermal treatments. The supervised methods, Discriminant Analysis of Partial Least Squares (PLS-DA) and Discriminant Analysis of Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS-DA) were able to detect differences between ages, even the subtle differences occurred by heat treatments. PLS-DA turned out to be less sensitive than OPLS-DA. The distinction of samples from different stages of maturation and the evaluation of the effects of heat treatments in coconut water can be satisfactorily explained by the application of NMR and chemometric analysis of supervised methods.

Keywords: *Cocos nucifera*, multivariate analysis, microwaves, alternative technologies.

5.1. Introducción

El agua de coco ha sido estudiada ampliamente por sus propiedades químicas y biológicas. Está conformada principalmente por azúcares como la fructosa, glucosa y sacarosa, además de lípidos y aminoácidos esenciales (Yong et al., 2009; Prades et al., 2012). Además, el agua de coco ha sido catalogada como una bebida muy versátil por su aplicación en la prevención de problemas de salud, deshidratación, problemas digestivos, sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Tan et al., 2014). Sin embargo, el agua de coco es un producto de rápida degradación fisicoquímica (Costa et al., 2015), al que se han aplicado métodos de conservación convencionales y tecnologías alternativas de procesamiento. Los tratamientos térmicos, además de prolongar la vida de anaquel del agua de coco, también alteran sus compuestos aromáticos. Estos efectos en el agua de coco maduro incluyen el aumento de ésteres de ácidos grasos y a disminución de cetonas (Nasution et al., 2019). El efecto del tratamiento térmico convencional en la composición química y la inactivación de enzimas se ha descrito para agua de coco de diferentes etapas de desarrollo del fruto. Con el avance del desarrollo del fruto se tiene un aumento en el pH, turbidez y contenido de minerales, sin embargo, la acidez titulable, sólidos solubles totales y contenido de fenoles totales disminuyen. La resistencia de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) al tratamiento térmico disminuye conforme el fruto se desarrolla (Tan et al., 2014).

Entre las principales tecnologías alternativas a los tratamientos térmicos convencionales en agua de coco, se encuentran los campos eléctricos pulsantes, luz ultravioleta, pulsos de luz de alta intensidad, campos eléctricos de radiofrecuencia, calentamiento por microondas, calentamiento óhmico, irradiación y ozonización, expansión flash-vacío, ultrasonido, alta presión hidrostática y dióxido de carbono supercrítico. A pesar de parecer menos perjudiciales que el tratamiento térmico convencional, estas tecnologías incluyen muchos parámetros que vuelven difícil la comparación y evaluación de los efectos sobre el producto procesado (Jiménez-Sánchez et al., 2017). También se

han empleado la luz ultravioleta en combinación con antimicrobianos y bajas temperaturas para prevenir el crecimiento de microorganismos como *Salmonella typhimurium* (Beristaín-Bauza et al., 2018). Así mismo, se han estudiado los efectos del calentamiento con microondas sobre la concentración de vitamina C, encontrándose que es más alto comparado con el tratamiento térmico convencional. También el contenido de polifenoles se mantiene, y la degradación de color es baja, sin embargo, el contenido de carotenoides se ve afectado por las microondas (Jiménez-Sánchez et al., 2017).

El efecto de tecnologías alternativas sobre la actividad enzimática en agua de coco también ha sido abordado con la aplicación de termo sonicación, por su eficiencia en la inactivación microbiológica y enzimática. Se ha encontrado que el ultrasonido presenta un efecto sinérgico con el tratamiento térmico sobre la inactivación de la PPO y POD (Ribeiro et al., 2017). También se ha empleado la tecnología de ultrasonido como un tratamiento de sensibilización previo al tratamiento térmico para la inactivación enzimática (Rojas et al., 2017). Las altas presiones de dióxido de carbono también han sido empleadas en garantizar la estabilidad microbiológica y preservar los atributos sensoriales y nutricionales del agua de coco (Cappelletti et al., 2015). Otras tecnologías alternativas como el calentamiento óhmico también han sido empleadas para tratar el agua de coco. Sus efectos en la actividad enzimática, y propiedades fisicoquímicas y eléctricas del agua de coco han sido estudiados, encontrándose que no hay cambios significativos en el pH, acidez titulable y color, mientras que la actividad de la PPO se reduce (Delfiya & Thangavel, 2016).

El procesamiento de alimentos fluidos mediante calentamiento por microondas ha sido empleado por su rapidez, limpieza y facilidad de uso. Un aspecto para considerar en la aplicación de esta tecnología son las propiedades dieléctricas del material a calentar. Los estudios relacionados con este proceso se enfocan en la inactivación de enzimas del alimento y sus efectos en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales (Salazar-González et al., 2012). La tecnología de microondas también ha sido aplicada para inactivar las enzimas PPO y POD. La

inactivación de estas enzimas ha sido descrita con un modelo de cinética de primer orden (Matsui et al., 2008). La comparación de una tecnología alternativa contra la pasteurización convencional se ha llevado a cabo para conocer el efecto en los compuestos volátiles del agua de coco. Las altas presiones de dióxido de carbono (tratamiento de conservación no térmico) agotan los alcoholes de cadena corta y media, mientras que la pasteurización convencional provoca un aumento de aldehídos, cetonas y 2-acetil-1-pirrolina. Sensorialmente, no se ha detectado diferencia entre las muestras sin procesar y las procesadas con altas presiones de dióxido de carbono, mientras que en la pasteurización convencional sí se han percibido diferentes (De Marchi et al., 2015).

El efecto de diferentes tecnologías de procesamiento en las propiedades químicas del agua de coco ha sido estudiado con espectroscopía de RMN (Sucupira et al., 2017) aplicó RMN y quimiometría para determinar la variación de la composición química del agua de coco sometida a tratamientos térmicos con adición de sulfito, evaluando las diferencias mediante un análisis de componentes principales (PCA). La composición química del agua de coco sometida a diferentes procesos térmicos también ha sido estudiada complementando los estudios de RNM con técnicas como la cromatografía de gases y cromatografía líquida de alto rendimiento- espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS, por sus siglas en inglés). La variación química entre las muestras fue determinada mediante mínimos cuadrados parciales: método de análisis discriminante (PLS-DA) que utiliza el algoritmo PLS simplificado (Cunha et al., 2020). Los análisis metabolómicos en agua de coco se han llevado a cabo para caracterizar los cambios nutricionales durante el desarrollo del fruto (Kumar et al., 2021) y también entender los mecanismos de deterioro durante el almacenamiento de agua de coco (Zhang et al., 2020). El uso de bases de datos y análisis estadísticos no supervisados, como PLS-DA y OPLS-DA, para diferenciar metabolitos son esenciales en los estudios metabolómicos.

El objetivo de este estudio es determinar las propiedades químicas del agua de coco de diferentes edades al ser tratada térmicamente de manera convencional y con microondas, mediante espectroscopía de RMN combinada con quimiometría, para detectar diferencias producidas por el desarrollo del fruto y evaluar el efecto de los tratamientos térmicos.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Químicos y reactivos

El agua deuterada (D_2O , D 99.9%), 3-trimetilsililpropionato de sodio (TMSP-2,2,3,3- d_4 , 98%) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 98.5%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

5.2.2. Preparación de la muestra

Cocos de seis, ocho, diez y doce meses de desarrollo (de verdes a maduros) fueron cosechados en una plantación de cocoteros en el municipio de Benito Juárez (Guerrero, México) en enero de 2021. La extracción del agua de coco se realizó manualmente usando un cuchillo de acero inoxidable previamente desinfectado. Posteriormente se filtró con una tela de muselina y se almacenó a $-17 \pm 2^\circ C$ para análisis posteriores.

5.2.3. Tratamiento térmico convencional

Muestras de 5 mL de agua de coco fueron colocadas en tubos de vidrio. El tratamiento térmico se llevó a cabo por inmersión del tubo de vidrio en un baño de agua caliente con agitación y temperatura controlada E100 (Lauda, Alemania). Una vez alcanzada la temperatura y el tiempo de calentamiento se retiró el tubo y se introdujo en un baño de agua fría con hielo. La temperatura del baño de agua caliente fue de $90^\circ C$ y se mantuvo durante 130 s.

5.2.4. Procesamiento con microondas

El calentamiento con microondas se llevó a cabo en lotes, utilizando un sistema de digestión de microondas enfocado (CEM, mod. Discover system, EUA, Matthews), a 2450 MHz. Se colocaron 5 mL de agua de coco en tubos de vidrio y se insertaron en la cavidad del digestor para permitir la incidencia de microondas. El tubo fue retirado una vez que se alcanzó la temperatura y el tiempo de calentamiento. Posteriormente, se introdujo en un baño de agua fría con hielo para detener el proceso de calentamiento. La temperatura programada en el digestor de microondas fue de 90 °C y el tiempo de sostenimiento fue de 130 s, para llevar a cabo la comparación con los efectos del tratamiento térmico convencional.

5.2.5. Análisis de RMN

Las muestras sometidas a tratamientos térmicos y las muestras sin tratamiento fueron transferidas a tubos de centrifuga de 10 mL y centrifugadas a 6000 RPM durante 15 min. Se tomaron alícuotas de 190 µL de agua de coco y se colocaron en tubos de resonancia de 5 mm, luego se mezclaron con 510 µL de una solución de agua deuterada (D₂O, D 99.9%) que contenía 14 mM de EDTA y 1% de 3-trimetilsililpropionato de sodio (TMSP-2,2,3,3 -d₄, 98% de pureza). La adición de EDTA fue para minimizar el efecto de la fuerza iónica en los cambios de frecuencia en los espectros de RMN (Sucupira et al., 2017).

Los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro de RMN (400 MHz Agilent Tech.® Inc., Sta Clara, California, EE. UU.). Los desplazamientos químicos de ¹H se midieron en D₂O en relación con TMSP como estándar interno. Las condiciones de adquisición de los espectros de RMN se tomaron del trabajo de la metodología de Cunha et al. (2020) con algunas modificaciones, como sigue: La secuencia de pulsos PRESAT se utilizó para la supresión de agua no deuterada con un desplazamiento químico δ 4,85. El ancho de pulso fue de 45°, con tiempo de adquisición de 5 s, retardo de relajación de 10 s y 64 k puntos en

el dominio del tiempo con una ventana espectral de 16 ppm y resolución digital de 0.3 Hz por punto.

5.2.6. Análisis quimiométrico

Los datos de los espectros de ^1H -RMN fueron utilizados como entrada para el programa NMRProcFlow (Jacob et al., 2017) para llevar a cabo las correcciones de línea de base, alineaciones de RMN de deformación del tiempo paramétricas o de mínimos cuadrados, agrupamiento de tamaño variable para perfiles no dirigidos y normalización de la matriz de datos (López-Aguilar et al., 2021). La región cercana al agua no deuterada (4.81 ppm) no fue considerada en la estrategia de agrupamiento.

Los análisis quimiométricos se llevaron a cabo en el sitio web de bioinformática de código abierto MetaboAnalyst 5.0. A partir de la matriz RMN de datos normalizados se obtuvieron los análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) y el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales (OPLS-DA, por sus siglas en inglés), con un nivel de confianza del 95%.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Evaluación por RMN

Los espectros apilados de ^1H -RMN (Figura 13) del agua de coco de diferentes edades muestran mayor concentración de señales en el rango entre 3.2 y 4.1 ppm, que corresponden a los hidrógenos en los carbonos portadores de hidroxilos en los azúcares (Sucupira et al., 2017). Las señales de la región alifática entre los desplazamientos químicos δ 0.9 y 2.8 son atribuidas a la valina, etanol y a los ácidos láctico, acético y málico, mientras que las señales entre los desplazamientos químicos δ 4.1 y 5.5 son atribuidas a protones distintivos de las cadenas de fructosa, sacarosa, ácido málico, α -glucosa y β -glucosa (Cunha et al., 2020).

El agua de coco de diferentes edades contiene diferencias poco marcadas en la región alifática (δ 0.9 a 2.8), sin embargo, la señal del etanol presenta una diferencia notoria ya que se observa que es mayor conforme el fruto llega a la madurez. Asimismo, se observa que las señales de la región carbinólica de los espectros de agua de coco se reducen conforme el fruto madura. Otros cambios en las señales del espectro de agua de coco ocurridas por la maduración del fruto contemplan el aumento de la sacarosa, mientras que la fructosa, α -glucosa y β -glucosa disminuyen, coincidiendo con los reportado en pruebas químicas de otros estudios (Tan et al., 2014).

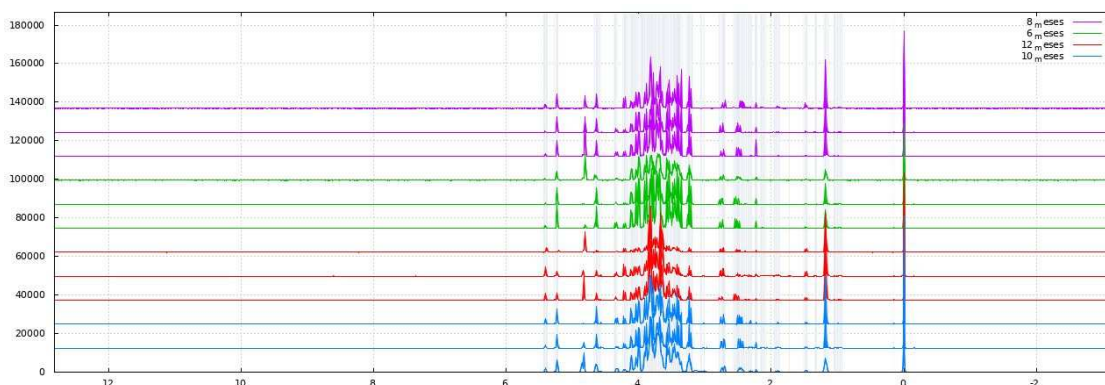


Figura 13. Espectros de RMN apilados de hidrógeno con supresión de agua usando presaturación, para el agua de coco fresca de frutos de diferentes edades (6 meses, verde, 8 meses, morado, 10 meses, azul y 12 meses, rojo).

La Figura 14 presenta los espectros de ^1H -RMN de las muestras de agua de coco de 6 meses frescas y procesadas con calentamiento convencional y con microondas, siendo los espectros inferiores los correspondientes al tratamiento térmico convencional (TTC). No se observan cambios detectables en las señales de los espectros, sin embargo, la señal correspondiente al etanol es menor en las muestras procesadas de manera convencional, esto debido a que el calentamiento de la muestra genera la liberación de este compuesto del agua de coco.

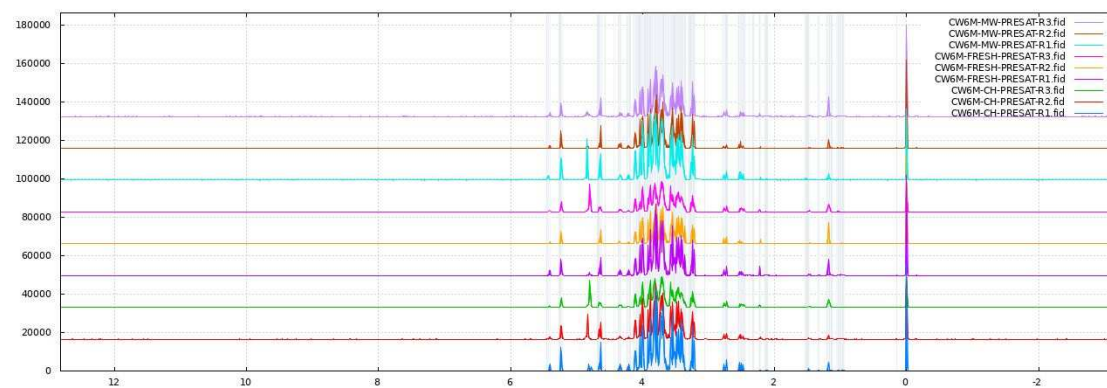


Figura 14. Espectros de RMN apilados de hidrógeno con supresión de agua usando presaturación, para el agua de coco de 6 meses fresca (FRESH) y procesada con microondas (MW) y con tratamiento térmico convencional (CH).

5.3.2. Análisis quimiométrico

Los espectros de ^1H -RMN del agua de coco de diferentes edades fueron sometidos a un análisis exploratorio (Figura 15) usando un método no supervisado como el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) y dos métodos supervisados, concretamente, el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) y el Análisis Discriminante de Proyecciones Ortogonales a Estructuras Latentes (OPLS-DA, por sus siglas en inglés).

Los primeros dos componentes del PCA representaron el 94.5% de la varianza, mientras que en el PLS-DA la varianza explicada por los primeros dos componentes fue del 92.9%. El OPLS-DA tuvo una menor varianza explicada (51.4% de las primeras dos puntuaciones T), sin embargo, fue el análisis que hizo una mejor discriminación entre las cuatro etapas de maduración analizadas.

El PCA (Figura 15a) fue capaz de separar el agua de coco maduro del resto de los estados de madurez, cuyo valor positivo de las puntuaciones indica una gran diferencia del resto de las muestras, que tuvieron puntuaciones negativas en el primer componente principal. El resto de las muestras (6, 8 y 10 meses) no pudieron ser separadas con precisión por el PCA, ya que se situaron muy cercanas y en el mismo cuadrante.

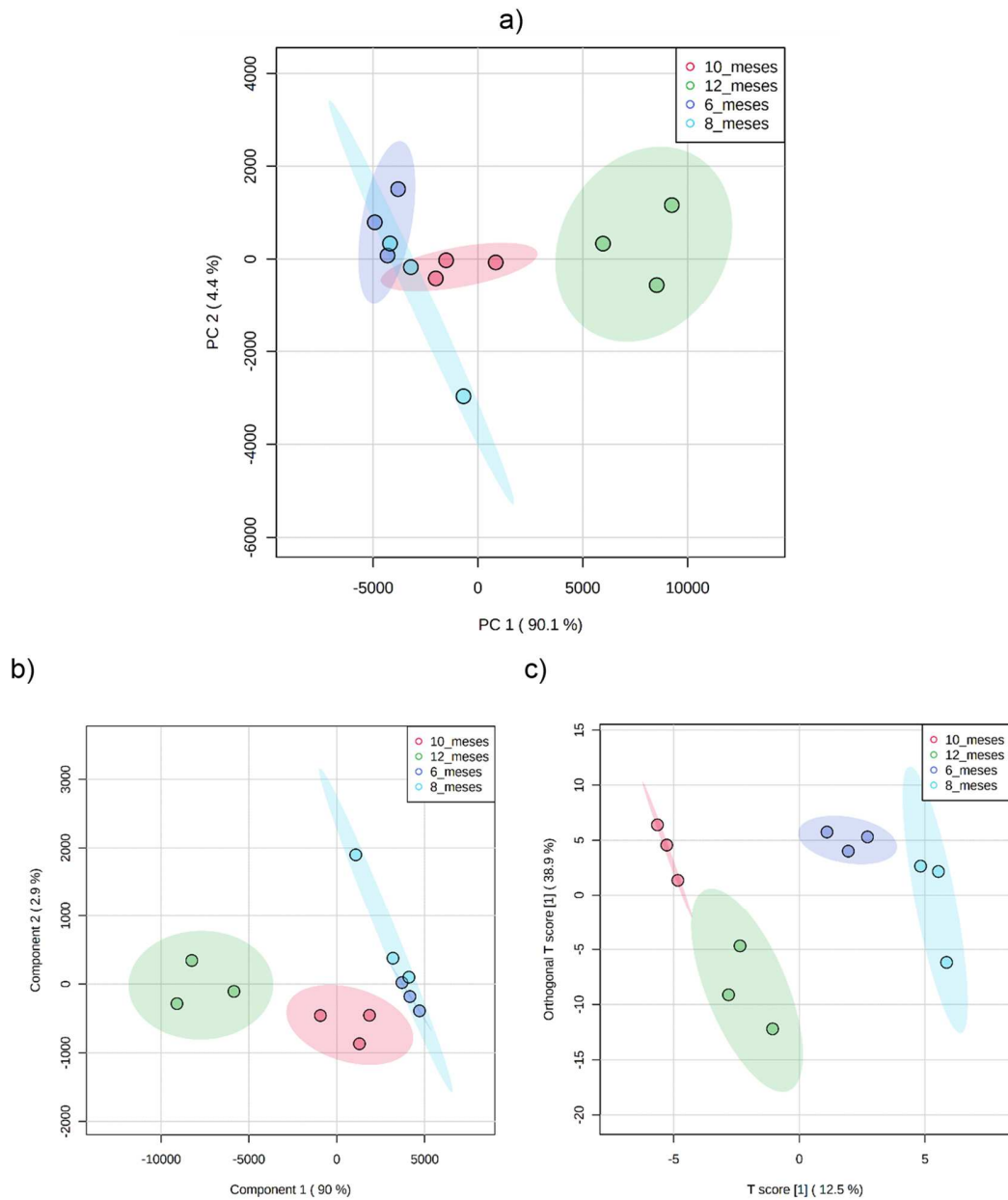


Figura 15. PCA (a), PLS-DA (b) y OPLS-DA (c), del agua de coco fresca de 6 meses (azul), 8 meses (cian), 10 meses (rojo) y 12 meses (verde).

Una mejor discriminación fue posible aplicando el método supervisado PLS-DA (Figura 15b), obteniendo una separación de un tercer grupo definido por el agua de coco de 10 meses, que puede asegurarse con un 95% de confiabilidad, que es diferente al agua de coco de 12 meses y al agua de coco de 6 y 8 meses. El

otro método supervisado (OPLS-DA) logró un mejor desempeño al separar las cuatro edades del agua de coco en grupos claramente diferenciados (Figura 15c). Con este método podemos asegurar que el agua de coco de 6 meses es más parecida al agua de coco de 8 meses y muy distinta al agua de coco de 12 meses.

El PCA del efecto de los tratamientos térmicos sobre las propiedades del agua de coco de 6 meses (Figura 16a) no fue capaz de distinguir diferencias entre el agua de coco sin procesar (fresca) y el agua de coco procesada con tratamiento térmico convencional (CH) o con microondas (MW). La varianza acumulada explicada de los tratamientos térmicos usando el PCA se redujo en comparación con la varianza explicada para las etapas de desarrollo del fruto, sin embargo, este método tuvo la mayor explicación de la varianza (86.5%). Esta disminución en la explicación de la varianza es debida a que las diferencias entre tratamientos son muy sutiles y un método no supervisado no es capaz de detectarlas. La aplicación del método supervisado PLS-DA (Figura 16b) logró diferenciar los efectos del calentamiento con microondas sobre las propiedades del agua de coco verde sin procesar. Los efectos del tratamiento térmico convencional sobre las propiedades del agua de coco de 6 meses no pudieron ser diferenciados de los provocados por el tratamiento con microondas.

La mayor diferencia de los efectos de los tratamientos térmicos sobre las propiedades del agua de coco fue detectada con el OPLS-DA (Figura 16c), separando claramente a las muestras del agua de coco procesada con microondas del resto. También el efecto del tratamiento térmico convencional sobre las muestras pudo ser diferenciado de las muestras sin procesar. Sin embargo, no se puede determinar cuál de los dos tratamientos térmicos es más diferente o parecido que el estado sin procesar. Si bien, ambos tratamientos térmicos generan cambios que pudieron ser detectados por el OPLS-DA, no se puede determinar cuál de los dos es más conveniente o si los cambios producidos poden ser considerados como deseables.

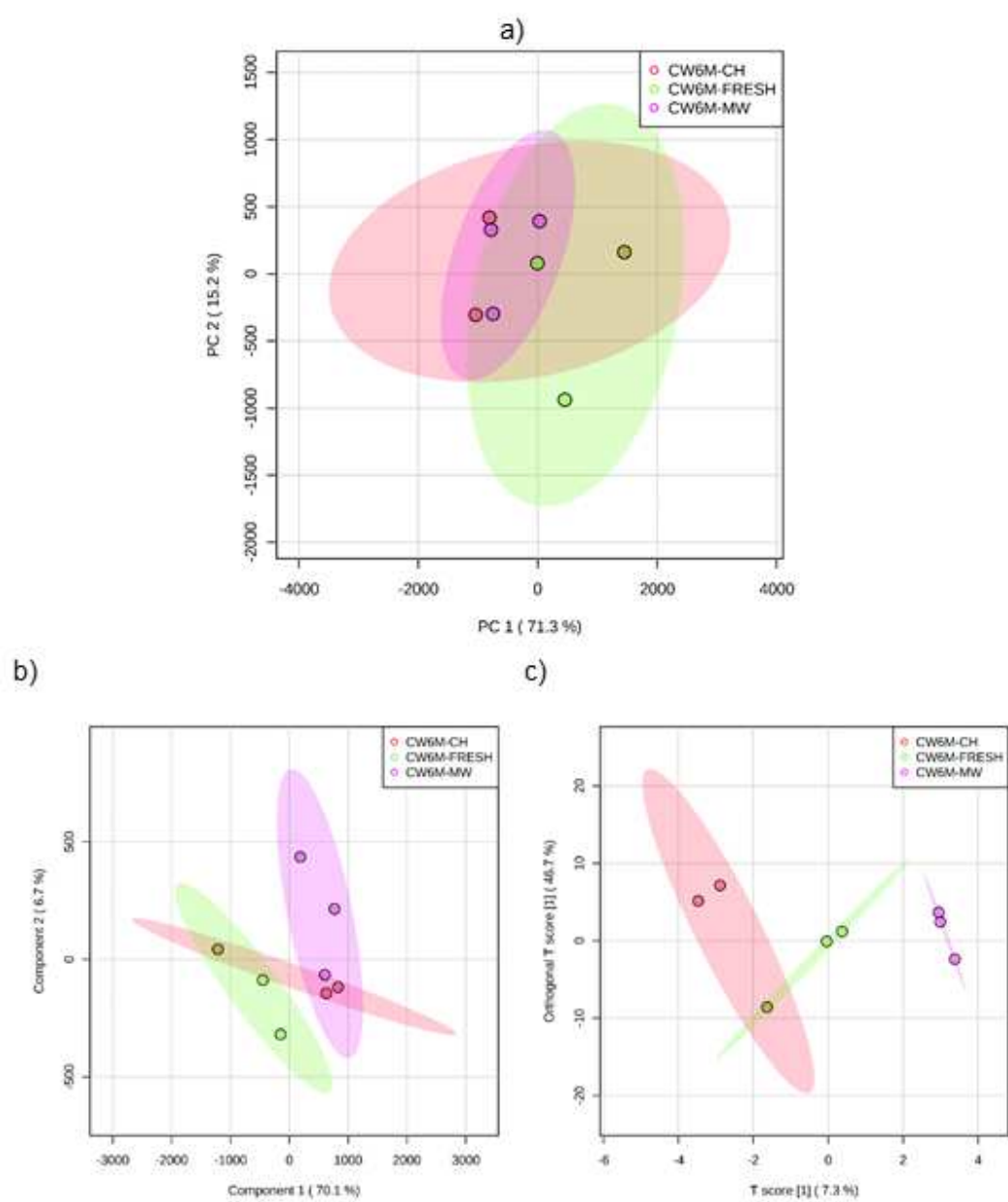


Figura 16. PCA (a), PLS-DA (b) y OPLS-DA (c), del agua de coco de 6 meses fresca (verde), procesada con microondas (morado) y con tratamiento térmico convencional (rojo).

5.4. Conclusiones

La evaluación de los cambios en el agua de coco generados por la maduración de los frutos, así como los efectos de los tratamientos térmicos en las propiedades del agua de coco fue abordado de manera satisfactoria mediante el uso de espectroscopía ^1H -RMN combinada con quimiometría. La maduración del fruto resultó ser un factor muy discriminante que puede ser detectado por los métodos supervisados y no supervisados, siendo éstos últimos los que mejor discriminan entre muestras de cada una de las edades analizadas. El análisis exploratorio del efecto de los tratamientos térmico en el agua de coco fue abordado con un método supervisado y dos métodos no supervisados. El PCA no fue capaz de detectar diferencias entre tratamientos, mientras que el PLS-DA detectó de manera satisfactoria diferencias sutiles entre las muestras. El PLS-DA resultó ser más limitado al detectar diferencias sutiles comparado con el OPLS-DA, el cual sí pudo separar los efectos de los tratamientos en el agua de coco. El análisis quimiométrico en conjunto con la espectroscopía de RMN puede ser una herramienta confiable para la distinción de muestras de agua de coco de diferentes edades de maduración. Con este estudio es posible establecer las señales de RMN que caracterizan a una etapa de maduración específica y con ello poder determinar si una muestra problema pertenece a una edad u otra.

5.5. Agradecimientos

Estamos agradecidos con CONACYT por el apoyo brindado. Abraham Jesús Arzeta Ríos agradece a CONACYT-México por su beca de doctorado (622555).

5.6. Literatura citada

- Beristaín-Bauza, S., Martínez-Niño, A., Ramírez-González, A. P., Ávila-Sosa, R., Ruíz-Espinosa, H., Ruiz-López, I. I., & Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Inhibition of *Salmonella Typhimurium* growth in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by hurdle technology. *Food Control*, 92, 312–318. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.05.010>
- Cappelletti, M., Ferrentino, G., Endrizzi, I., Aprea, E., Betta, E., Corollaro, M. L., Charles, M., Gasperi, F., & Spilimbergo, S. (2015). High Pressure Carbon

- Dioxide pasteurization of coconut water: A sport drink with high nutritional and sensory quality. *Journal of Food Engineering*, 145, 73–81. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.08.012>
- Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Oliveira, B. G., Ogawa, E. M., Korres, A. M. N., Ventura, J. A., & Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 174, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODCHEM.2014.10.154>
- Cunha, A. G., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V., Rodrigues, T. H. S., de Brito, E. S., & de Miranda, M. R. A. (2020). Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC-MS, UPLC-HRMS, and NMR. *Food Chemistry*, 126874.
- De Marchi, F., Aprea, E., Endrizzi, I., Charles, M., Betta, E., Corollaro, M. L., Cappelletti, M., Ferrentino, G., Spilimbergo, S., & Gasperi, F. (2015). Effects of Pasteurization on Volatile Compounds and Sensory Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water: Thermal vs. High-Pressure Carbon Dioxide Pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1501-4>
- Delfiya, D. S. A., & Thangavel, K. (2016). Effect of ohmic heating on polyphenol oxidase activity, electrical and physicochemical properties of fresh tender coconut water. *International Journal of Food Engineering*, 12(7), 691–700.
- Jacob, D., Deborde, C., Lefebvre, M., Maucourt, M., & Moing, A. (2017). NMRProcFlow: A graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 13(4), 36.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2017). Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 637–652.
- Kumar, M., Saini, S. S., Agrawal, P. K., Roy, P., & Sircar, D. (2021). Nutritional and metabolomics characterization of the coconut water at different nut developmental stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103738.
- López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcals and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods*, 10(1), 157.
- Matsui, K. N., Gut, J. A. W., de Oliveira, P. V., & Tadini, C. C. (2008). Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 169–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.003>
- Nasution, Z., Jirapakkul, W., & Lorjaroenphon, Y. (2019). Aroma compound profile

- of mature coconut water from tall variety through thermal treatment. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 277–286.
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., & Pain, J.-P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2), 87–107.
- Ribeiro, M. de M., Valdramidis, V. P., Nunes, C. A., & de Souza, V. R. (2017). Synergistic effect of thermosonication to reduce enzymatic activity in coconut water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 404–410. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2017.04.013>
- Rojas, M. L., Trevilin, J. H., dos Santos Funcia, E., Gut, J. A. W., & Augusto, P. E. D. (2017). Using ultrasound technology for the inactivation and thermal sensitization of peroxidase in green coconut water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 173–181.
- Salazar-González, C., San Martín-González, M. F., López-Malo, A., & Sosa-Morales, M. E. (2012). Recent studies related to microwave processing of fluid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 31–46.
- Sucupira, N. R., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., & Sousa, P. H. M. (2017). NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry*, 216, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.035>
- Tan, T.-C., Cheng, L.-H., Bhat, R., Rusul, G., & Easa, A. M. (2014). Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chemistry*, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144.
- Zhang, Y., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Yun, Y., & Chen, W. (2020). Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. *Foods*, 9(1), 46.

6. MICROWAVE HEATING EFFECT ON TOTAL PHENOLICS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GREEN AND MATURE COCONUT WATER

Abstract

Coconut water (*Cocos nucifera* L.) from fruits of two ripening stages (green and mature) was used to perform microwave heat treatments. Three different heating conditions with maximum temperatures of 70, 80 and 90 °C were tested in three holding times (0, 2 and 4 min). The Total Phenolic Content (TPC) using the Folin-Ciocalteu method and ABTS radical scavenging capacity were evaluated for each combination of coconut fruit age, heating temperature, and holding time. It was observed that green coconut water exhibited significant differences ($p < 0.05$) compared to mature coconuts in terms of TPC (46.03 and 69.16 mg GAE/L, respectively) and ABTS radical scavenging capacity (422.31 and 549.1 $\mu\text{mol TE/L}$, respectively). An increase in TPC (up to 23%) and antioxidant activity (up to 19%) was also observed with increasing temperature in the range of 70 to 90 °C. Green coconut water showed the largest increase in both TPC and antioxidant activity.

Keywords: *Cocos nucifera*, antioxidant capacity, nutraceutical potential, alternative technology

EFFECTO DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS SOBRE LOS FENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL AGUA DE COCO VERDE Y MADURO

Resumen

Se utilizó agua de coco (*Cocos nucifera* L.) de frutos de dos estados de maduración (verde y maduro) para efectuar tratamientos térmicos con microondas. Se ensayaron tres condiciones diferentes de calentamiento con temperaturas máximas de 70, 80 y 90 °C en tres tiempos de sostenimiento (0, 2 y 4 min). Se evaluó el Contenido Fenólico Total (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad de barrido de radicales ABTS para cada combinación de edad del fruto de coco, temperatura de calentamiento y tiempo de mantenimiento. Se observó que el agua de coco verde mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con los cocos maduros en términos de TPC (46,03 y 69,16 mg GAE/L, respectivamente) y capacidad de barrido de radicales ABTS (422,31 y 549,1 $\mu\text{mol TE/L}$, respectivamente). También se observó un aumento del TPC (hasta un 23%) y de la actividad antioxidante (hasta un 19%) con el aumento de la temperatura en el rango de 70 a 90 °C. El agua de coco verde mostró el mayor aumento tanto del TPC como de la actividad antioxidante.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, capacidad antioxidante, potencial nutracéutico, tecnología alternativa

6.1. Introduction

The coconut, *Cocos nucifera* L. (Arecaceae), is a governing part of the littoral flora across the tropics. Coconut water consumption in the international market has increased continuously in recent years, having various traditional uses. Recently it has been described as a natural functional drink and as a sports drink [1]. The chemical composition of coconut water has been determined in various studies, focusing on tender fruits [2–5] and on different stages of fruit ripening [6].

The extraction of coconut water entails the rupture of the stable and sterile conditions that it had within the fruit [7]. This has led to the application of thermal treatments for sterilization and enzymatic inactivation. The effect of heat treatment in the composition, physicochemical properties and enzymatic inactivation kinetics of immature, mature and overly- mature coconuts has been studied [6]. However, the nutritional quality, the physicochemical, rheological and organoleptic properties of the processed products can be lost when traditional thermal techniques are used [8].

There are alternatives to coconut water processing that have different effects on quality. To preserve coconut water, the effect of a non-thermal two-stage microfiltration technique under aseptic conditions has been evaluated [9]. The effect of other techniques such as ohmic heating [10], high pressure carbon dioxide pasteurization [11, 12], ultraviolet radiation [13] and microwave heating [7] has also been evaluated. Most of these studies have focused on fresh coconut and have addressed the processes of inactivation of the enzymes Polyphenol oxidase and Peroxidase.

The effect of microwave heating and conventional heat treatments on antioxidant activity has been evaluated in juice concentrates [14], as well as green vegetables [15]. Kinetic evaluation of antioxidant capacity has been evaluated in York cabbage after a bleaching treatment [16] and microwave processing [17].

The phytochemical compounds and antioxidant activity in fresh coconut water have also been evaluated [18]. Specifically, the antioxidant activity has been little

studied in coconut water of different stages of maturation. The evaluation of phenolic compounds before and after heat treatment has been carried out formerly [6]. However, there are no studies related to the antioxidant activity of coconut water after alternative processing techniques such as microfiltration, ohmic heating, ultraviolet radiation, etc. The aim of this work was to determine the stability of total phenolics and antioxidant activity in coconut water of two stages of maturity, through changes induced by microwave treatment.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Reagents

Folin-Ciocalteu, 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) reagents, anhydrous sodium carbonate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and gallic acid were purchased from Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA.

6.2.2. Plant material

In this study, coconut fruits of two different stages of maturity were used. The fruit ages were 9 (green) and 12 months (mature). All coconuts were harvested from the garden of a producer from Benito Juárez, Guerrero, Mexico. Coconut water was extracted manually with a special knife to pierce the fruit mesocarp. The water extracted from three coconuts of each age was used to perform the microwave heat treatment. Endosperm thickness was measured with a digital caliper, with an average of three different reading points. The volume of water was measured with a graduated cylinder. Total soluble solids (TSS) were expressed as Brix and measured with a digital hand refractometer (ATAGO, Japan). All determinations were made in triplicate.

6.2.3. Microwave heat treatment

The batch microwave heating process was carried out in a microwave system (CEM, mod. Discover system, USA, Matthews) at 2450 MHz [7]. A glass tube was filled with 5 mL of coconut water. The glass tube was inserted vertically into the

microwave digester cavity under continuous microwave incidence. Once the desired temperature and holding time were reached, the tube was quickly inserted into an ice water bath to accelerate cooling. Subsequently, aliquots were collected to determine total phenolics and the ABTS test. Three different heating conditions with maximum temperatures of 70, 80 and 90 ° C were tested at three holding times (0, 2 and 4 min) for coconut water of two stages of fruit ripening.

6.2.4. Antioxidant properties

Total Phenolic Content

The Total Phenolic Content (TPC) of coconut water of two stages of maturation was determined using the Folin-Ciocalteu method [19] adapted to microplates [20]. A stock solution of 500 mg/L gallic acid in deionized water was made to prepare a calibration curve in a concentration range of 1.25 to 11.25 µg/mL. In the wells of a 96-well microplate 25 µL of coconut water, 125 µL of distilled water, 20 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 30 µL of 20% sodium carbonate (Na₂CO₃) were mixed. The mixture was reacted for 30 min under dark conditions. Each sample was processed in triplicate. After time, the absorbance reading was taken at a wavelength of 760 nm in a microplate reader (Synergy 2, BioTek, USA). The results were reported as milligram gallic acid equivalents per milliliter (mg GAE/mL).

ABTS test

The ABTS (2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) radical test was carried with some modifications [21]. For the preparation of the ABTS solution, equal volumes of two solutions (A and B) were mixed. Solution A consisted of 7.4 mM ABTS and solution B is 2.6 mM sodium persulfate. After mixing both solutions, it was allowed to incubate at room temperature for 16 h in a dark place. After the incubation time, 600 µL of the mixture was taken and titrated to 10 mL with pure methanol. A stock solution of Trolox at 250 mg/L (with 80% methanol) was prepared for the calibration curve. The dilutions of the Trolox stock solution for the calibration curve were prepared to give final concentrations

in a range of 5 to 60 μM . In a microplate, 20 μL of the optimal coconut water or Trolox water solution and 180 μL of ABTS were placed. The decrease in absorbance was recorded at 734 nm after 10 min. With the data obtained, a Trolox calibration curve was generated. Based on the equation obtained, the μmol of sample equivalent to Trolox ($\mu\text{mol TE/L}$) was determined to capture the ABTS radical.

6.2.5. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. SAS statistical software (SAS Institute Inc., 2019) was used. The results were reported as mean values $\pm$ standard deviation and analyzed by analysis of variance. Comparisons of means were made using the HSD test with a significance of 0.05. Three-factor design was used to analyze the differences between coconut fruit ages, temperature and holding time.

6.3. Results and discussion

6.3.1. Antioxidant properties

Total Phenolic Content (TPC)

The Total Phenolic Content (TPC) is affected by the heat generated by the microwaves, microwave treatments consist of maintaining the power for a certain time, usually not longer than 15 min [7, 17]. The TPC of coconut water of different stages of maturation has been analyzed by different authors, however, the effect of microwave heating on the antioxidant activity of coconut water has not been described. The one-way ANOVA was carried out to analyze the differences between the characteristics of fresh coconut water of two stages. Table 3 shows the variation of the TPC in coconut water of two stages of maturation (9 and 12 months). It is observed that the water of the green coconuts present significant differences compared to mature coconuts in terms of TPC (46.03 and 69.16 mg GAE/L, respectively) and ABTS radical scavenging capacity (422.31 and 549.10 $\mu\text{mol TE/L}$, respectively). Water volume and endosperm thickness show significant difference between fruit age ($p < 0.05$). The thickness of the

endosperm was greater in the mature coconut than in the green coconut, as stated in literature [22, 23]. The volume of coconut water is within the range (100 to 600 mL) reported in the literature [4], being higher in green coconut water than in mature coconut water [1, 6]. The measured volume of mature coconut water is slightly higher than that reported for tall varieties by other authors [1, 4]. Total soluble solids content did not show statistically significant difference ($p = 0.581$) between green and mature coconut water, which is not consistent in the literature. This is due to the variety, region, and time of harvest [23]. In most coconut varieties the total soluble solids reduce as the fruit ripens [6, 24].

Table 3. Characteristics of coconut fruits evaluated before microwave heating.

Coconut age (months)	Water volume (mL)	Soluble solids (°Brix)	Endosperm thickness (mm)	TPC (mg GAE/L)	ABTS radical scavenging capacity (μmol TE/L)
9	523.33 ± 25.17a	6.40 ± 0.10a	5.67 ± 0.58b	46.03 ± 0.53b	422.31 ± 21.62b
	403.33 ± 20.82b	6.17 ± 0.67a	13.33 ± 0.58a	69.16 ± 1.33a	549.10 ± 15.65 ^a

Mean ± Standard deviation values in a column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

The treatment of green coconut water with microwaves at temperatures between 40 and 90 °C has been reported [7], based on measuring the temperature and not the microwave power by a certain time to determine the enzymatic activity. In addition, it has been reported a holding time of zero seconds for all treatments, evaluating degradation kinetics of antioxidant compounds. In this study, the effect of microwave heating in two stages of coconut fruit maturation was assessed, considering three temperatures (70, 80 and 90 °C) and three holding times (0, 2 and 4 min). TPC and ABTS radical scavenging capacity were evaluated for each combination of coconut age, temperature, and time. Table 4 shows a reduction of the TPC at temperatures between 70 and 80 °C. However, with the increase in heating temperature and holding time (90 °C, 4 min) an increase in the TPC is observed. So far, the increase in phenolic content in coconut water due to microwave heating has not been reported, however, in some fresh vegetables

increase phenolic content due to heat treatment is attributed to the release of flavonols [15]. It can be observed that total phenolic content in mature coconut water is higher than in green coconut water in all treatments tested. Although the mature coconut water suffered a reduction in the TPC, the disappearance of the significant difference between both coconut waters was not observed. It can be observed that microwave treatments effects on coconut water of two stages initially caused a reduction in the TPC and a subsequent increase in this parameter at temperatures above 80 °C.

Table 4. Changes in the TPC of microwave-heated coconut water.

Coconut Age (months)	Temperature (°C)	Holding time (min)	TPC (mg GAE/L)	% ¹
9	70	0	45.69 ± 2.54c	99
		2	40.50 ± 4.59c	88
		4	40.23 ± 5.43c	87
	80	0	42.92 ± 3.89c	93
		2	40.07 ± 2.30c	87
		4	54.07 ± 9.34ab	117
	90	0	51.72 ± 4.85bc	112
		2	56.26 ± 10.50ab	122
		4	56.51 ± 2.43ab	123
12	70	0	62.10 ± 5.78ab	90
		2	60.58 ± 2.48ab	88
		4	57.75 ± 2.99ab	84
	80	0	59.30 ± 3.33ab	86
		2	62.74 ± 1.61ab	91
		4	61.73 ± 1.90ab	89
	90	0	66.37 ± 0.63 ^a	96
		2	66.34 ± 2.02 ^a	96
		4	66.81 ± 0.80 ^a	97

Mean ± Standard deviation values in a column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

¹ Fresh = 100.

Temperature has different effects on the TPC of food. It has been reported that phenolic compounds such as quercetin derivatives present a higher thermal

stability, which causes phenolic compounds to increase [25]. The reduction of the TPC can also occur when food is cooked [26], which is attributed to the breakdown of phenolics [15]. The increase in temperature and holding time has a greater effect on the TPC of green coconut water, generating an increase of 23% respect to fresh coconut water, compared to mature coconut water (content less than 100%). It can be observed that the greater effect of the treatments tested on the TPC (for both, green and mature coconut water) is mainly due to the increase in temperature and to a lesser extent to the holding time.

ABTS test

The effect of heat treatment on antioxidant capacity of vegetables has been determined by ABTS assay [25]. Microwave heat treatment of coconut water of different maturity stages was evaluated to determine the effect on the ABTS radical scavenging capacity. In Table 5, it can be seen that there is a significant difference ($p < 0.05$) between ABTS scavenging of green coconut water and mature coconut water. The response of green coconut water to microwave heat treatments was mainly a reduction of the ABTS scavenging ($< 100\%$) over the entire range of evaluated temperatures, but not for mature coconut water, which showed an increase at 90 °C (111%).

Heat treatments like boiling increase the antioxidant activity of vegetables [15]. It is documented that antioxidant potential after heat treatments has no change due to formation of novel or naturally occurring compounds [27]. Another reason is attributed to pro-oxidant activity reduction caused by the inactivation of peroxidases at high temperatures [28]. The release of bound phenolic compounds through thermal treatment enhances the phenolic content and the antioxidant response [29].

The antioxidant capacity of 12-month coconut water before microwave heating (fresh) is significantly ($p < 0.05$) higher than that of 9-month coconut water (549.10 and 422.31 $\mu\text{mol TE/L}$, respectively).

Table 5. Changes in ABTS radical scavenging capacity of microwave-heated coconut water.

Coconut Age (months)	Temperature (°C)	Holding time (min)	ABTS radical scavenging capacity ($\mu\text{mol TE/L}$)	% ¹
9	70	0	403.72 $\pm$ 26.24c	96
		2	396.45 $\pm$ 25.08c	94
		4	408.95 $\pm$ 4.30c	97
	80	0	383.95 $\pm$ 33.97c	91
		2	405.11 $\pm$ 40.31c	96
		4	434.17 $\pm$ 25.44c	103
	90	0	461.41 $\pm$ 14.97bc	109
		2	491.00 $\pm$ 40.22abc	116
		4	503.29 $\pm$ 41.48abc	119
	70	0	576.46 $\pm$ 51.35ab	105
		2	557.11 $\pm$ 69.08ab	101
		4	581.28 $\pm$ 20.91ab	106
12	80	0	559.47 $\pm$ 80.00ab	102
		2	562.65 $\pm$ 76.10ab	102
		4	558.56 $\pm$ 70.32ab	102
	90	0	612.99 $\pm$ 19.86 ^a	112
		2	594.73 $\pm$ 29.76ab	108
		4	610.63 $\pm$ 25.35 ^a	111

Mean $\pm$ Standard deviation values in a column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

¹ Fresh = 100.

For 12-month coconut water (processed), 70 °C and 0 min, there were 576.46 $\mu\text{mol TE/L}$, while for 90 °C and 4 min, 610.63 $\mu\text{mol TE/L}$ were quantified (a significant increase, $p < 0.05$). In addition, for 9-month-old coconut water processed at 70 °C and 0 min, there were 403.72 $\mu\text{mol TE/L}$, whereas for 90°C and 4 min, 503.29 $\mu\text{mol TE/L}$ were determined (i.e., a significant increase, $p < 0.05$). The effect of temperature on the antioxidant capacity of green coconut water (96-119%) is more noticeable than in mature coconut water (105-111%). In green coconut water, the increase in ABTS scavenging was 422 $\mu\text{mol TE/L}$ (fresh) to 503 $\mu\text{mol TE/L}$ (i.e., microwave treated at 90 °C and holding time of 4 min). Mature coconut water showed no significant difference ($p < 0.05$) in antioxidant

capacity with microwave heat treatments (i.e., temperature and holding time combinations).

5.3.2. Statistical analysis

Three-factor ANOVA was performed for the treatment of coconut water by microwave heating at fixed temperatures with variable time (0 to 4 min. For cases where the working temperature was less than 90 °C, no statistically significant difference ($\alpha=0.05$) was found in the TPC of mature coconut water during the microwave processing time. Table 6 shows that coconut fruit age is a variable that generates significant differences in the TPC, as reported in the literature [6]. The total phenolic content in green coconut water (9 months) is lower than that found in mature coconut water (12 months).

Table 6. Three-factor ANOVA for TPC of two maturity stages of coconut water heated by microwave.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	P value
Age	1	3071.18	3071.18	147.42	<0.0001
Temperature	2	887.57	443.79	21.3	<0.0001
Time	2	32.62	16.31	0.78	0.465
Age * Temperature	2	91.52	45.76	2.2	0.126
Age * Time	2	78.96	39.48	1.89	0.165
Temperature * Time	4	243.4	60.85	2.92	0.034
Age * Temperature * Time	4	122.04	30.51	1.46	0.233
Error	36	750.01	20.83		
Total	53	5277.3			

Microwave heating temperature has a significant effect in TPC of coconut water ($p < 0.05$). Evaluated times do not have a significant effect on the TPC ($p = 0.465$). Only the interaction between time and temperature was significant for the TPC ($p < 0.05$). This suggests the evaluation of higher temperatures and longer holding times to evaluate the effect that a severe heat treatment would have on the TPC.

The significant factors of microwave heating in ABTS scavenging capacity of coconut water are shown in Table 7. Again, it is observed that coconut age is a factor for significant differences in ABTS scavenging capacity. Temperature has a significant effect on antioxidant activity. In this case, interaction between Temperature*Time has no significant effect on ABTS scavenging capacity.

The determination of TPC using the Folin-Ciocalteu method is affected by interfering substances (e.g., aromatic amines, Fe^{II}, among others), and can lead to a detection of a greater number of compounds, whereas the ABTS radical is neutralized by antioxidants with a lower redox potential, which makes it a more specific technique [30]. As a result, the temperature*time interaction was significant ($p < 0.05$) for TPC, but not for ABTS.

Table 7. Three-factor ANOVA for ABTS scavenging capacity of two maturity stages of coconut water heated by microwave.

Source	DF	Sum of squares	Mean Square	F value	P value
Age	1	292971	292971	149.69	<0.0001
Temperature	2	43330	21665	11.07	<0.0001
Time	2	2988	1494	0.76	0.474
Age * Temperature	2	5298	2649	1.35	0.271
Age * Time	2	2594	1297	0.66	0.522
Temperature * Time	4	1155	289	0.15	0.963
Age * Temperature * Time	4	1695	424	0.22	0.928
Error	36	70459	1957		
Total	53	420491			

6.4. Conclusion

The effect of microwave heating on the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity of green and mature coconut water has been evaluated. The 9-month coconut water before microwave heating had lower ($p < 0.05$) TPC and ABTS (46.03 GAE/L and 422.31 $\mu\text{mol TE/L}$, respectively) than that of 12-month

coconut water without process (69.16 mg GAE/L and 549.10 μ mol Trolox/L, respectively). The most drastic treatment (90°C, 4 min) increased the TPC of both green and mature coconut water (56.51 mg GAE/L and 66.81 mg GAE/L, respectively). There was also an increase in ABTS radical scavenging capacity in both green and mature coconut water (503.29 μ mol TE/L and 610.63 μ mol TE/L, respectively). The increase in temperature is the factor that most affects the concentration of TPC and antioxidant activity. It should also be noted that differences in temperature*time interactions for TPC and ABTS were due to the specificity of the methods. Phenolic compounds and antioxidant activity in coconut water are stable at high processing temperatures (90 °C) and holding times of up to 4 min, even an increase in these parameters has been observed (23% and 19% for TPC and antioxidant activity, respectively). According to the statistical analysis, there are no significant differences in the concentration of total phenolics and antioxidant activity of coconut water during processing time at temperatures below 80 °C.

6.5. Acknowledgements

We are grateful to CONACyT Mexico for stimulating support.

6.6. References

1. Prades A, Dornier M, Diop N, Pain J-P. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*. 2012;67(2):87–107.
2. Chidambaram S, Singaraja C, Prasanna M V, Ganesan M, Sundararajan M. Chemistry of tender coconut water from the Cuddalore coastal region in Tamil Nadu, India. *Nat Resour Res*. 2013;22(2):91–101.
3. Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan SN. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 2009;14(12):5144.
4. Campos CF, Souza PEA, Coelho JV, Glória MBA. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *J Food Process Preserv*. 1996;20(6):487–500.
5. Maciel MI, Oliveira SL, Da Silva IP. Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. *J Food Process Preserv*. 1992;16(1):13–22.
6. Tan T-C, Cheng L-H, Bhat R, Rusul G, Easa AM. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol

oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chem.* 2014;142:121–8.

7. Matsui KN, Gut JAW, de Oliveira PV, Tadini CC. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *J Food Eng.* 2008;88(2):169–76.

8. Jiménez-Sánchez C, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(3):637–52.

9. Mahnot NK, Kalita D, Mahanta CL, Chaudhuri MK. Effect of additives on the quality of tender coconut water processed by nonthermal two stage microfiltration technique. *LWT-Food Sci Technol.* 2014;59(2):1191–5.

10. Delfiya DSA, Thangavel K. Effect of ohmic heating on polyphenol oxidase activity, electrical and physicochemical properties of fresh tender coconut water. *Int J food Eng.* 2016;12(7):691–700.

11. De Marchi F, Aprea E, Endrizzi I, Charles M, Betta E, Corollaro ML, et al. Effects of Pasteurization on Volatile Compounds and Sensory Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water: Thermal vs. High-Pressure Carbon Dioxide Pasteurization. *Food Bioprocess Technol.* 2015;8(7):1393–404.

12. Cappelletti M, Ferrentino G, Endrizzi I, Aprea E, Betta E, Corollaro ML, et al. High Pressure Carbon Dioxide pasteurization of coconut water: A sport drink with high nutritional and sensory quality. *J Food Eng.* 2015;145:73–81.

13. Augusto PED, Ibarz R, Garvín A, Ibarz A. Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) photo-inactivation in a coconut water model solution using ultraviolet (UV). *Food Res Int.* 2015;74:151–9.

14. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SMA, Askari GR. Comparing the effects of microwave and conventional heating methods on the evaporation rate and quality attributes of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate. *Food Bioprocess Technol.* 2012;5(4):1328–39.

15. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 2005;93(4):713–8.

16. Jaiswal AK, Gupta S, Abu-Ghannam N. Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment. *Food Chem.* 2012;131(1):63–72.

17. Jaiswal AK, Abu-Ghannam N. Degradation kinetic modelling of color, texture, polyphenols and antioxidant capacity of York cabbage after microwave processing. *Food Res Int.* 2013;53(1):125–33.

18. Akpro La, Gbogouri Ga, Konan Br, Issali Ae, Konan Kjl, Brou Kd, et al. Phytochemical compounds, antioxidant activity and non-enzymatic browning of

sugars extracted from the water of immature coconut (*Cocos nucifera* L.). *Sci African*. 2019;e00123.

19. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144 LP – 158.

20. Hernández-Rodríguez G, Espinosa-Solares T, Hernández-Eugenio G, Villa-García M, Reyes-Trejo B, Guerra-Ramírez D. Influence of polar solutions on the extraction of phenolic compounds from capulín fruits (*Prunus serotina*). *J Mex Chem Soc*. 2016;60(2):73–8.

21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9–10):1231–7.

22. Hahn F. An on-line detector for efficiently sorting coconut water at four stages of maturity. *Biosyst Eng*. 2012;111(1):49–56.

23. Siriphanich J, Saradhulhat P, Romphopphak T, Krisanapook K, Pathaveerat S, Tongchitpakdee S. 2 - Coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Yahia EMBT-PB and T of T and SF, editor. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing; 2011. p. 8-35e.

24. Halim HH, Williams Dee E, Pak Dek MS, Hamid AA, Ngalim A, Saari N, et al. Ergogenic Attributes of Young and Mature Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water Based on Physical Properties, Sugars and Electrolytes Contents. *Int J Food Prop*. 2018;21(1):2378–89.

25. Juárez I, Ludwig IA, Huarte E, Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Cid C, et al. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem*. 2016;197:466–73.

26. Sahlin E, Savage GP, Lister CE. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *J Food Compos Anal*. 2004;17(5):635–47.

27. Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lerici CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol*. 2000;11(9):340–6.

28. Gazzani G, Papetti A, Massolini G, Daglia M. Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *J Agric Food Chem*. 1998;46(10):4118–22.

29. You B, Yang S, Yu J, Xian W, Deng Y, Huang W, et al. Effect of thermal and dry salt-curing processing on free and bound phenolics and antioxidant activity in *Prunus mume* fruits together with the phenolic bioaccessibility. *LWT [Internet]*. 2021;145:111355. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821005089>

30. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem*. 2005;53(10):4290–302.

7. INACTIVATION OF PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE BY CONVENTIONAL AND MICROWAVE PROCESSING OF COCONUT WATER OBTAINED FROM DIFFERENT FRUIT MATURATION STAGES

Abstract

Coconut water is a beverage with high nutritional value and multiple applications, whose composition varies depending on the maturity stage of coconut fruits. For the processing of this material, the application of emerging technologies such as microwaves could help reduce quality losses. For this reason, the effect of conventional and microwave processing on the inactivation kinetics of peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) in coconut water obtained from different fruit maturation stages was evaluated. Samples in glass tubes were treated at two temperatures (75 and 90 °C) and 5-130 s of holding time. First-order, Weibull and Exponential Decay kinetic models were fitted considering the complete time-temperature profiles. The Weibull model best described the inactivation of the POD enzyme at 75 °C, having the highest fit and the lowest RMSE in both heating processes. However, the enzyme inactivation kinetics in most of the cases evaluated was better described by the Exponential Decay model, with coefficients of determination around 0.7 for 75 °C and higher than 0.98 for 90 °C. Microwave heating generated significantly faster POD and PPO enzyme inactivation than conventional processing at all maturity stages.

Keywords: coconut water; maturity stages; emerging technology; microwaves; enzymatic inactivation

INACTIVACIÓN DE LA PEROXIDASA Y LA POLIFENOLOXIDASA MEDIANTE EL PROCESAMIENTO CONVENCIONAL Y POR MICROONDAS DEL AGUA DE COCO OBTENIDA DE DIFERENTES ETAPAS DE MADURACIÓN DE LOS FRUTOS

Abstract

El agua de coco es una bebida con alto valor nutricional y múltiples aplicaciones, cuya composición varía según el estado de madurez de los frutos de coco. Para el procesamiento de este material, la aplicación de tecnologías emergentes como las microondas podría ayudar a reducir las pérdidas de calidad. Por ello, se evaluó el efecto del procesamiento convencional y por microondas sobre la cinética de inactivación de las enzimas peroxidasa (POD) y la polifenol oxidasa (PPO) en agua de coco obtenida de diferentes estados de maduración del fruto. Las muestras en tubos de vidrio fueron tratadas a dos temperaturas (75 y 90 °C) y 5-130 s de tiempo de mantenimiento. Se ajustaron modelos cinéticos de primer orden, de Weibull y de decaimiento exponencial considerando los perfiles completos de tiempo-temperatura. El modelo de Weibull fue el que mejor describió la inactivación de la enzima POD a 75 °C, teniendo el mayor ajuste y el menor RMSE en ambos procesos de calentamiento. Sin embargo, la cinética de inactivación de la enzima en la mayoría de los casos evaluados fue mejor descrita por el modelo de Decaimiento Exponencial, con coeficientes de determinación alrededor de 0.7 para 75 °C y superiores a 0.98 para 90 °C. El calentamiento por microondas generó una inactivación de las enzimas POD y PPO significativamente más rápida que el procesamiento convencional en todos los estados de maduración.

Palabras clave: agua de coco; etapas de maduración; tecnología emergente; microondas; inactivación enzimática

7.1. Introduction

In addition to being an isotonic beverage, coconut water has nutritional and therapeutic value. It has found applications in the care of health-associated problems and as a suitable growth-promoting medium, providing applications in biotechnological research [1]. Coconut water consists mainly of soluble sugars, while the remaining compounds are proteins, salts and trace amounts of oil and amino acids, all together representing a dry weight of 5 to 6% [2], in addition, coconut water has shown to contain components with potential benefit to human health, such as cytokinins [3].

The composition of coconut water gives it different applications depending on the stage of development of the fruit. Most commercial applications of coconut water are focused on tender fruits [4]. The main applications and uses of green coconut water include natural beverage, medicine, growth medium for microorganisms and plants and as a biocatalyst [2]. However, it also has great potential as a rehydrating beverage when the fruit is over 12 months old [5]. Coconut water has also been blended with lemon juice and other fruits to formulate soft drinks [6] and fermented to produce exopolysaccharide that functions as a biomaterial for use in beverages [7]. Mature coconut is mainly used to obtain copra, a process in which coconut water is discarded or underutilized. Mature coconut water contains sugars and amino acids such as L-valine, L-threonine, L-isoleucine and L-leucine which are essential for humans [8].

The preservation of the properties of coconut water is essential for its commercialization, so it is important to know the factors involved in the process, among which is the enzymatic activity. The activity of oxidase enzymes causes undesirable changes, so their presence is a factor to be considered in industrialization. The main function of peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) enzymes is to oxidize phenolic compounds, causing undesirable changes in the taste and color of coconut water [9]. The POD enzyme, besides being resistant, causes undesirable changes in fresh coconut water [10]. The PPO enzyme is responsible for catalyzing reactions involving molecular oxygen and

phenolic substrates [11]. For this reason, the inactivation of POD and PPO enzymes in coconut water is essential. Different processing technologies have been applied to achieve this aim. Continuous pasteurization achieves the inactivation of POD and PPO [12]. The presence and inactivation of PPO and peroxidase POD enzymes in coconut water has been determined through the application of conventional heat treatments [5,13].

Alternative technologies to conventional heat treatments aim to reduce nutritional and sensory losses by high temperatures and may be less harmful. However, there are many parameters that need to be studied to know the effects of these technologies on foods [14]. Inactivation of PPO in coconut water has been achieved by applying ultraviolet (UV) radiation [11,15,16]. It has also been found that the activity of POD and PPO enzymes decreases with increasing voltage and time in dielectric barrier discharge plasma treatment, and POD is more resistant than PPO with the use of this processing technology [17]. The treatment of coconut water with thermosonication, applying milder temperatures, has achieved an additive effect in the inactivation of POD and PPO enzymes, generating less sensory and nutritional damages [18]. Other alternative technologies employed to reduce enzymatic activity in coconut water are: nonthermal two stage microfiltration technique [19], Ozone and plasma processing [9], High Pressure Carbon Dioxide pasteurization [20], Ohmic Heating [21], and microwave processing [22]. Microwave processing allowed to preserve health potential of food and retains main bioactive components [23]. Microwave processing has also been found to generate an increase in phenolic compounds and antioxidant capacity of coconut water [24]. Inactivation of POD and PPO enzymes has been achieved with microwave application and its effects have been compared with those of conventional heating in green coconut water [25,26].

The effect of heat treatments on enzyme activity has often been described with the application of first-order kinetics [27]. The enzyme inactivation of coconut water has also been described by first-order kinetics [5,11], Weibull model [10,25] and Logistic model [17]. Enzyme inactivation models allow establishing

parameters to ensure product stability [25]. In this sense, the objective of this work is to compare the effect of conventional and microwave processing on the enzymatic activity of POD and PPO at four different maturity stages of coconut fruits, using similar time and temperature profiles, as well as kinetic models, to provide parameters to aid enzyme inactivation.

Some of our results were already presented at the 2nd International Electronic Conference on Foods—"Future Foods and Food Technologies for a Sustainable World" (Foods 2021). We addressed only the Inactivation kinetics of peroxidase by conventional and microwave processing, and only one maturity stage of coconut fruits, namely mature coconut water. In addition, only two kinetic models were analyzed, and it was found that microwave heating inactivates POD faster than conventional heating.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Sample preparation

In this study, coconut water obtained from fruits of four different maturity stages was used. Designations were as follows: 6-month-old coconut water (CW6M), 8-month-old coconut water (CW8M), 10-month-old coconut water (CW10M) and 12-month-old coconut water (CW12M). Coconut fruits were harvested from the farm of a producer from Benito Juárez, Guerrero, Mexico. All fruits were washed with a dilute bleach solution, then water was extracted manually with a special knife by gravity, mixed, filtered and stored at -18 °C until use.

7.2.2. Conventional processing

Samples with 5 mL of mature coconut water were placed in a glass tube. Thermal treatment was conducted by immersion of the glass tube in a stirred hot water bath with temperature control E100 (Lauda, Germany) followed by immersion in ice water bath manually agitated. Combination of two temperatures (75 and 90 °C) and five immersion times (5, 10, 25, 60 and 130 s) were tested [25].

7.2.3. Microwave processing

Microwave heating was conducted in a microwave system (CEM, mod. Discover system, USA, Matthews) at 2450 MHz. Coconut water samples of 5 mL were placed in a glass tube and inserted vertically into the microwave digester cavity under continuous microwave incidence. Temperature-time combinations were the same as conventional processing. Once temperature and holding time were achieved, the tube was quickly inserted into an ice water bath manually agitated.

7.2.4. Time-temperature profiles

Traceable data logging thermocouple probe thermometer (Digi-Sense WD-20250-02, Cole-Parmer, USA) was used to obtain time-temperature profiles. The probe tip was kept at the center of the sample. Data collection was every second.

7.2.5. Determination of enzymatic activity

POD and PPO activities were assayed as described in Augusto et al. (2015) [15], with some modifications, and adapted to microplates using a microplate reader (Synergy 2, BioTek Instruments, USA). POD activity assays were made in triplicate at 25 °C and pH 6.0, ensured using a buffer solution made of citric acid and Na₂HPO₄ (Merck, Germany). Microplates with 96 wells were used, each containing 16 µL of mature coconut water, 225 µL of buffer solution at pH 6.0, 320 µL of 5% (m/v) pyrogallol solution, and 16 µL of 0.147 M H₂O₂ solution (Merck, Germany) to start the reaction. The absorbance value was acquired every 11 s for 5 min.

To evaluate PPO activity, 4-methylcatechol was used as substrate, according to the method described by Augusto et al. (2015) [15] adapted to microplates, using the same microplate reader used to evaluate POD activity. The reactions were performed in 96-well microplates, mixing 200 µL of mature coconut water and 100 µL of 0.01 M 4-methylcatechol in buffer solution at pH 6.0. The absorbance value was acquired every 31 s for 7 min. For both tests, one unit of enzyme activity was

defined as the amount of enzyme extract capable of producing an increase in absorbance at 420 nm at the rate of 0.001 units per minute [13,15].

7.2.6. Enzyme inactivation models

Inactivation of enzymes is usually described using the first-order kinetic model, shown in Equation (1):

$$A/A_0 = a \cdot \exp(-bx) \quad (1)$$

where A/A_0 is relative activity, x is time (s) b is the inactivation rate constant.

Weibull distribution function has been employed as a kinetic model. Equation (2) represents the four parameter of Weibull model [28]:

$$A/A_0 = a \cdot ((c-1)/c)^{(1-c)/c} \cdot (\exp(-abs((x-x_0)/b + ((c-1)/c)^{(1/c))^{c-1}})) \cdot \exp(-abs((x-x_0)/b + ((c-1)/c)^{(1/c))^{c-1}})) \quad (2)$$

where b and c are scale and shape parameters.

Equation (3) is a modified three parameter single exponential decay model, hereinafter called exponential decay [28]:

$$A/A_0 = a \cdot \exp(b/(x+c)) \quad (3)$$

where a is the intercept, b is the relative decay rate, and x is time.

7.3. Results and discussion

7.3.1. Time–temperature profiles

Comparison of time–temperature profiles during conventional heating and microwave processing are shown in Figure 17. The same conditions were programmed in both processes. It can be observed that microwave heating reaches the programmed temperature more quickly. However, as it is an accelerated temperature ramp, the maximum temperature reached is higher than that reached in conventional heating. In general, the heating and cooling process of the microwave treatment was faster than the conventional heating.

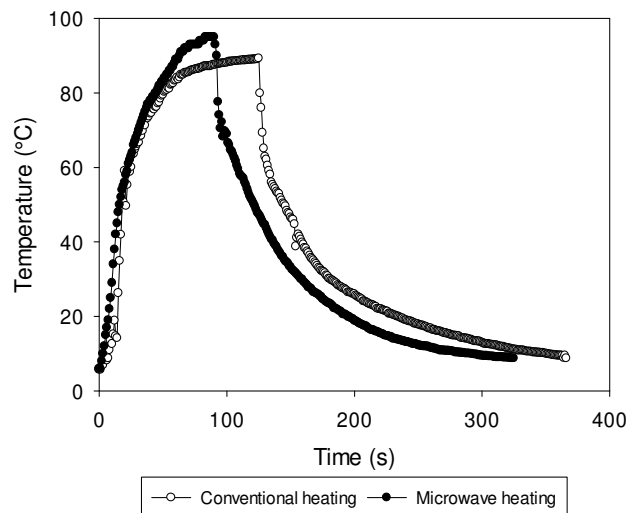


Figure 17. Sample temperature–time profiles for (○) conventional and (●) microwave heating.

7.3.2. Parameter estimation and evaluation of model fitting

In 6-month-old coconut water, the first-order kinetics could not describe the enzyme activity of coconut water subjected to 75 °C with conventional heat treatment ($R^2 < 0.6$), but the fit was better in describing the enzyme activity after microwave heating ($R^2 > 0.6$). The first-order model has been employed to describe the inactivation of POD and PPO in green coconut water by conventional heating [5,13] and microwave heating has also been employed to inactivate POD and PPO in green coconut water [22] and modeled with first-order kinetics. Heating at 90 °C presented higher fits for both enzymes and both treatments, except for POD activity after microwave treatment ($R^2 = 0.303$).

The exponential decay model provided the best fit at the 90 °C processing temperature but was very poor for 75 °C for both enzymes. The Weibull model provided a better description of POD activity than PPO, being superior also for heating at 75 °C ($R^2 > 0.9$). The Weibull model has also been used to describe enzyme inactivation in coconut water, resulting in a better fit than the first-order [25,27,29] model. In this study, for 6-month-old coconut water, all three models

obtained a poor fit for the temperature of 75 °C, whereas at higher temperatures better fits were obtained with all models.

Cuadro 8. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW6M.

Kinetic model		Peroxidase				Polyphenol oxidase			
		Conventional		Microwave		Conventional		Microwave	
		75°	90°	75°	90°	75°	90°	75°	90°
First-order	a	1.260	0.904	1.157	0.984	1.064	0.963	1.153	0.723
	b	0.003	0.057	0.029	0.218	0.001	0.004	0.004	0.004
	SSE	0.105	0.068	0.143	0.047	0.017	0.018	0.083	0.118
	R ²	0.486	0.875	0.864	0.911	0.543	0.865	0.622	0.303
	RMSE	0.162	0.130	0.189	0.108	0.066	0.067	0.144	0.172
Decay	a	0.009	0.104	0.001	0.064	0.769	0.471	0.401	0.513
	b	9025.993	38.660	1690.058	15.887	41.023	47.811	186.166	1.582
	c	1824.049	17.141	223.996	5.784	121.795	62.093	172.644	2.372
	SSE	0.107	0.010	0.138	0.008	0.016	0.004	0.078	0.000
	R ²	0.477	0.983	0.869	0.987	0.586	0.971	0.644	0.999
Weibull	RMSE	0.189	0.057	0.214	0.052	0.072	0.036	0.162	0.009
	a	1.327	20.535	1.389	17.013	3.096	5.932	1.151	5.821
	b	215.340	17.640	18.807	4.592	756.269	238.526	255.376	264.126
	c	1.034	1.001	1.037	1.001	1.001	1.001	1.004	1.001
	x0	7.970	-55.177	0.747	-13.108	-813.177	-435.289	0.936	-552.521
	SSE	0.006	0.068	0.072	0.047	0.017	0.018	0.060	0.118
	R ²	0.972	0.875	0.931	0.929	0.543	0.865	0.729	0.303
	RMSE	0.054	0.184	0.190	0.153	0.093	0.094	0.173	0.243

Cuadro 9. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW8M.

Kinetic model		Peroxidase				Polyphenol oxidase			
		Conventional		Microwave		Conventional		Microwave	
		75°	90°	75°	90°	75°	90°	75°	90°
First-order	a	0.988	0.998	1.048	0.985	1.100	0.639	1.186	0.741
	b	0.040	0.362	0.098	0.224	0.010	0.007	0.007	0.011
	SSE	0.123	0.055	0.101	0.059	0.201	0.202	0.327	0.129
	R ²	0.792	0.915	0.867	0.907	0.667	0.303	0.505	0.582
	RMSE	0.175	0.117	0.159	0.121	0.224	0.224	0.286	0.179
Decay	a	0.124	0.121	0.036	0.086	0.305	0.388	0.205	0.321
	b	60.911	0.377	88.331	10.274	129.782	1.168	141.258	9.065
	c	28.523	0.179	26.127	4.195	91.830	1.232	80.896	8.004
	SSE	0.048	0.001	0.093	0.009	0.289	0.002	0.158	0.007
	R ²	0.919	0.999	0.878	0.987	0.562	0.992	0.739	0.976
Weibull	RMSE	0.126	0.017	0.176	0.053	0.310	0.028	0.229	0.049
	a	15.164	162.479	1.876	16.489	1.234	11.970	1.100	14.021
	b	25.346	2.772	4.556	4.465	105.295	144.704	98.317	93.602
	c	1.001	1.001	1.075	1.001	1.023	1.001	1.001	1.001
	x0	-69.343	-14.117	0.384	-12.606	2.537	-424.821	0.099	-275.643
	SSE	0.123	0.055	0.058	0.059	0.292	0.202	0.195	0.129
	R ²	0.792	0.915	0.924	0.907	0.557	0.303	0.678	0.581
	RMSE	0.248	0.165	0.170	0.171	0.382	0.317	0.312	0.254

It was also observed that the RMSE obtained from the Exponential Decay model for microwave heating was lower than that obtained for conventional heating, while the first-order and Weibull models showed similar RMSE values. The fitted parameters for the first-order, exponential decay and Weibull models are shown in Table 1.

The fit of the kinetic models was better in the 8-month-old coconut water than in the 6-month-old coconut water (Table 2). POD activity was better described by all three models ($R^2 > 0.8$) than PPO activity. The exponential decay model provided the best fit for both POD and PPO, being even superior for heating at 90 °C ($R^2 > 0.97$). The Weibull and first-order models are better at explaining the behavior of POD enzyme activity at high temperatures. Similar results were reported by Cavalcante et al. (2021) [25] for the fit of the first-order and Weibull models for PPO activity after microwave heating. The fit of the models to the enzyme activity of the 10-month coconut water (Table 3) was superior to the fit achieved for the 12-month coconut water (Table 4), and the latter was superior to that of the 6-month coconut water. Again, the best fits were obtained at the highest temperature (90 °C) and POD activity was better described by the models than PPO activity, with the exponential decay model achieving a better explanation of variability in all cases analyzed. The observed differences in enzyme inactivation at different maturity are related to variations in the chemical composition of coconut water [5].

7.3.3. Comparison between conventional and microwave heating

Figure 18 shows the experimental data and the fit of the kinetic models to the enzymatic inactivation produced by conventional processing of 6-month coconut water. It is observed that, for 75 °C, the three models lack fit, as they do not accurately describe the behavior of the data, however, the exponential decay model has the best fit. Likewise, for peroxidase activity at heating temperature of 75 °C, a better fit of the Weibull model to the experimental data is observed, since at this temperature there is an increase in enzyme activity in the first seconds of

heating and then the decay of activity begins. All three models have an acceptable fit to the data behavior for heating at 90 °C.

Cuadro 10. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW10M.

Kinetic model		Peroxidase				Polyphenol oxidase			
		Conventional		Microwave		Conventional		Microwave	
		75°	90°	75°	90°	75°	90°	75°	90°
First-order	a	0.988	0.998	1.048	0.985	1.100	0.639	1.186	0.741
	b	0.040	0.362	0.098	0.224	0.010	0.007	0.007	0.011
	SSE	0.123	0.055	0.101	0.059	0.201	0.202	0.327	0.129
	R ²	0.792	0.915	0.867	0.907	0.667	0.303	0.505	0.582
	RMSE	0.175	0.117	0.159	0.121	0.224	0.224	0.286	0.179
Decay	a	0.124	0.121	0.036	0.086	0.305	0.388	0.205	0.321
	b	60.911	0.377	88.331	10.274	129.782	1.168	141.258	9.065
	c	28.523	0.179	26.127	4.195	91.830	1.232	80.896	8.004
	SSE	0.048	0.001	0.093	0.009	0.289	0.002	0.158	0.007
	R ²	0.919	0.999	0.878	0.987	0.562	0.992	0.739	0.976
Weibull	RMSE	0.126	0.017	0.176	0.053	0.310	0.028	0.229	0.049
	a	15.164	162.479	1.876	16.489	1.234	11.970	1.100	14.021
	b	25.346	2.772	4.556	4.465	105.295	144.704	98.317	93.602
	c	1.001	1.001	1.075	1.001	1.023	1.001	1.001	1.001
	x0	-69.343	-14.117	0.384	-12.606	2.537	-424.821	0.099	-275.643
	SSE	0.123	0.055	0.058	0.059	0.292	0.202	0.195	0.129
	R ²	0.792	0.915	0.924	0.907	0.557	0.303	0.678	0.581
	RMSE	0.248	0.165	0.170	0.171	0.382	0.317	0.312	0.254

Cuadro 11. Adjusted parameters and fitting performance of kinetic models for inactivation of POD and PPO in CW12M.

Kinetic model		Peroxidase				Polyphenol oxidase			
		Conventional		Microwave		Conventional		Microwave	
		75°	90°	75°	90°	75°	90°	75°	90°
First-order	a	1.419	0.927	1.351	0.999	1.142	0.677	1.131	0.642
	b	0.010	0.100	0.035	0.416	0.008	0.004	0.010	0.007
	SSE	0.674	0.162	0.499	0.013	0.327	0.163	0.235	0.197
	R ²	0.505	0.640	0.731	0.982	0.530	0.194	0.650	0.305
	RMSE	0.410	0.201	0.353	0.057	0.286	0.202	0.242	0.222
Decay	a	0.088	0.206	0.000	0.046	0.241	0.485	0.206	0.393
	b	556.565	6.765	4176.187	6.237	148.897	1.083	139.976	1.174
	c	198.203	4.280	335.231	2.022	92.209	1.495	79.161	1.258
	SSE	0.651	0.003	0.511	0.000	0.289	0.004	0.186	0.003
	R ²	0.522	0.993	0.724	0.999	0.585	0.981	0.723	0.991
Weibull	RMSE	0.466	0.032	0.413	0.012	0.310	0.036	0.249	0.029
	a	1.614	28.984	1.458	5.832	1.141	6.022	1.132	10.367
	b	53.994	10.027	15.298	2.410	118.005	280.484	95.598	148.345
	c	1.051	1.001	1.898	1.001	1.001	1.001	1.001	1.001
	x0	3.036	-34.562	5.860	-4.268	0.163	-614.767	0.098	-413.345
	SSE	0.425	0.162	0.049	0.013	0.315	0.163	0.227	0.197
	R ²	0.688	0.640	0.974	0.982	0.547	0.194	0.662	0.305
	RMSE	0.461	0.285	0.156	0.080	0.397	0.285	0.337	0.314

The greatest difference in enzyme inactivation was observed in POD, between conventional heating and microwave heating (Figure 1), mainly at 75 °C, where an increase in activity and a not very significant reduction occurred, contrary to what happened with microwave treatment, where the activity was reduced to 50% in the first 30 s. It is observed that the inactivation rate of the POD enzyme was faster with microwave heating, being inactivated at 90 °C after 130 s of processing. Conventional heat treatment was not able to satisfactorily inactivate the POD enzyme in any of the coconut waters evaluated, achieving only a greater reduction in the 6-month and 8-month coconut water (Figures 1 and 2) ($A/A_0 < 0.2$).

The activity of PPO in 6-month-old coconut water (Figure 2) remained at high levels for both thermal treatments, being microwave heating the one that produced the highest inactivation of this enzyme ($A/A_0=0.52$). It is noticeable that microwave heating has a greater effect in reducing the activities of both enzymes (POD and PPO), and it is also more effective for the inactivation of POD, causing its activity to decline in the first 60 s at 75 °C and 20 s at 90 °C. Microwave heating at 90 °C generates a rapid decrease in residual POD activity, whose behavior can be accurately described by the three models. In all coconut waters of different ages, enzyme inactivation was faster for POD than that for PPO during the first seconds of heating (Figures 18-21).

The activity of PPO in 6-month-old coconut water (Figure 18) remained at high levels for both thermal treatments, being microwave heating the one that produced the highest inactivation of this enzyme ($A/A_0=0.52$). It is noticeable that microwave heating has a greater effect in reducing the activities of both enzymes (POD and PPO), and it is also more effective for the inactivation of POD, causing its activity to decline in the first 60 s at 75 °C and 20 s at 90 °C. Microwave heating at 90 °C generates a rapid decrease in residual POD activity, whose behavior can be accurately described by the three models. In all coconut waters of different ages, enzyme inactivation was faster for POD than that for PPO during the first seconds of heating (Figures 18-21).

It has been shown that the activity of POD and PPO enzymes is affected by fruit maturity, as in the case of cocoa pods [30], apple [31], medlar [32,33] and coconut water [5]. Furthermore, in coconut water, native enzymes are more resistant than commercial enzymes [22] and PPO has been found to be more heat resistant than POD [13], even when subjected to microwave heating [22].

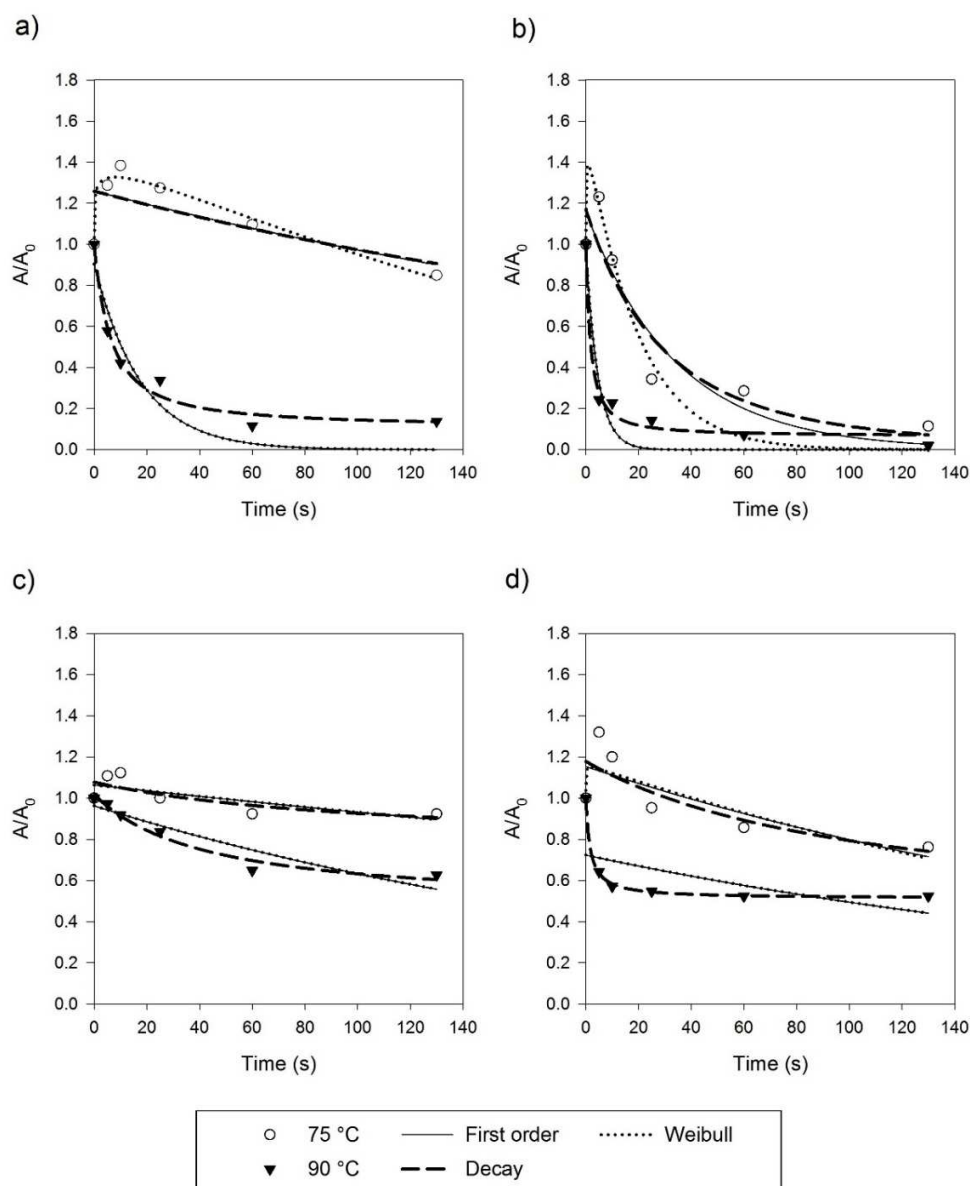


Figure 18. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 6-month-old coconut water.

However, some studies show that the activity of POD was higher than that of PPO at temperatures below 90 °C, which can be explained by the content of dissolved salts [26]. In Figures 18-21, it is observed that, with fruit maturity, the sensitivity of POD is higher, agreeing with Tan et al. (2014) [5], furthermore, no significant difference was observed in the sensitivity of POD depending on the age of the fruit. In all cases evaluated, including fruit maturity, temperature and processing time, microwave heating promotes the greatest reduction of enzyme activity, both POD and PPO.

It has been shown that the activity of POD and PPO enzymes is affected by fruit maturity, as in the case of cocoa pods [30], apple [31], medlar [32,33] and coconut water [5]. Furthermore, in coconut water, native enzymes are more resistant than commercial enzymes [22] and PPO has been found to be more heat resistant than POD [13], even when subjected to microwave heating [22]. However, some studies show that the activity of POD was higher than that of PPO at temperatures below 90 °C, which can be explained by the content of dissolved salts [26]. In Figures 18-21, it is observed that, with fruit maturity, the sensitivity of POD is higher, agreeing with Tan et al. (2014) [5]; furthermore, no significant difference was observed in the sensitivity of POD depending on the age of the fruit. In all cases evaluated, including fruit maturity, temperature and processing time, microwave heating promotes the greatest reduction of enzyme activity, both POD and PPO.

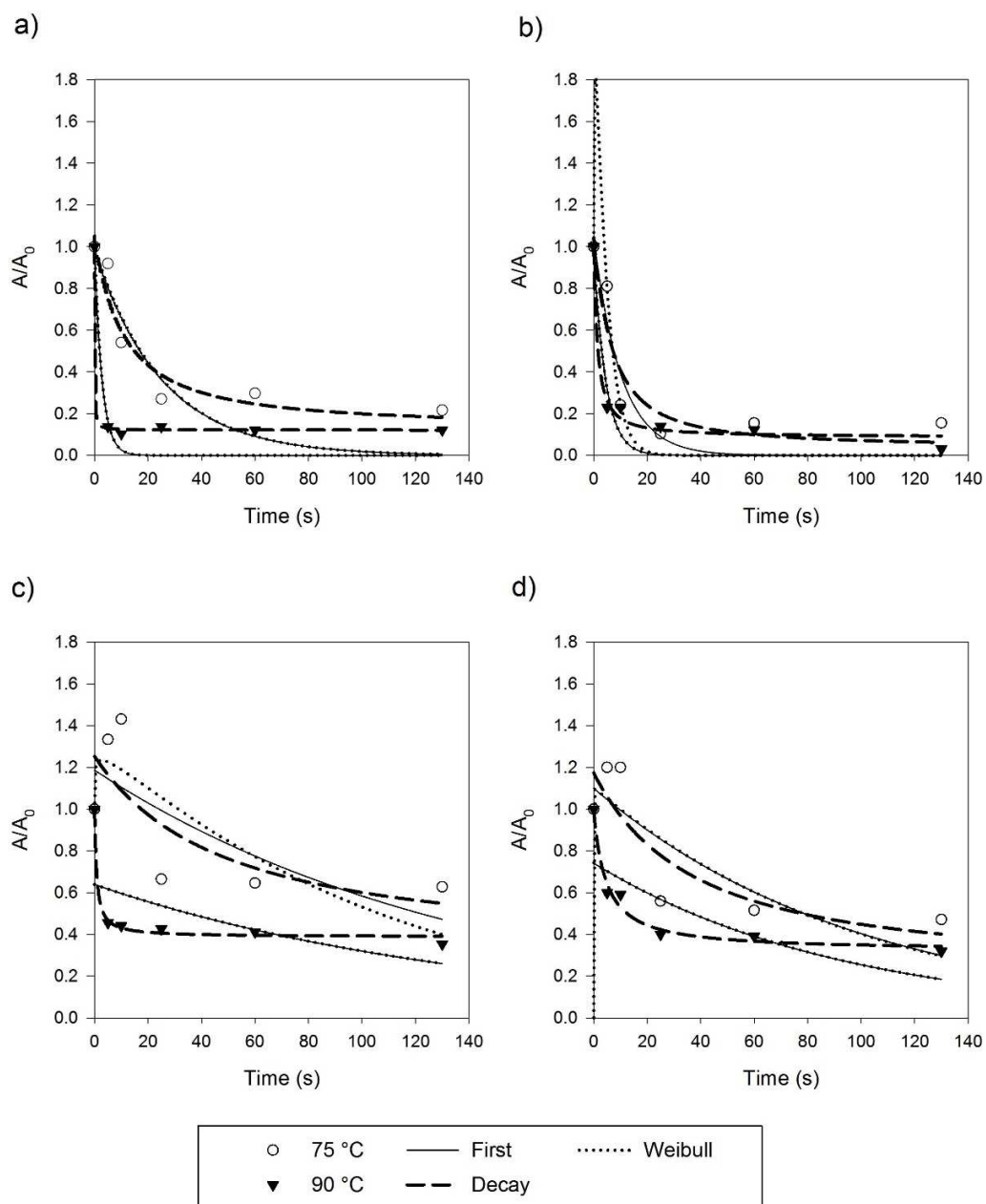


Figure 19. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 8-month-old coconut water.

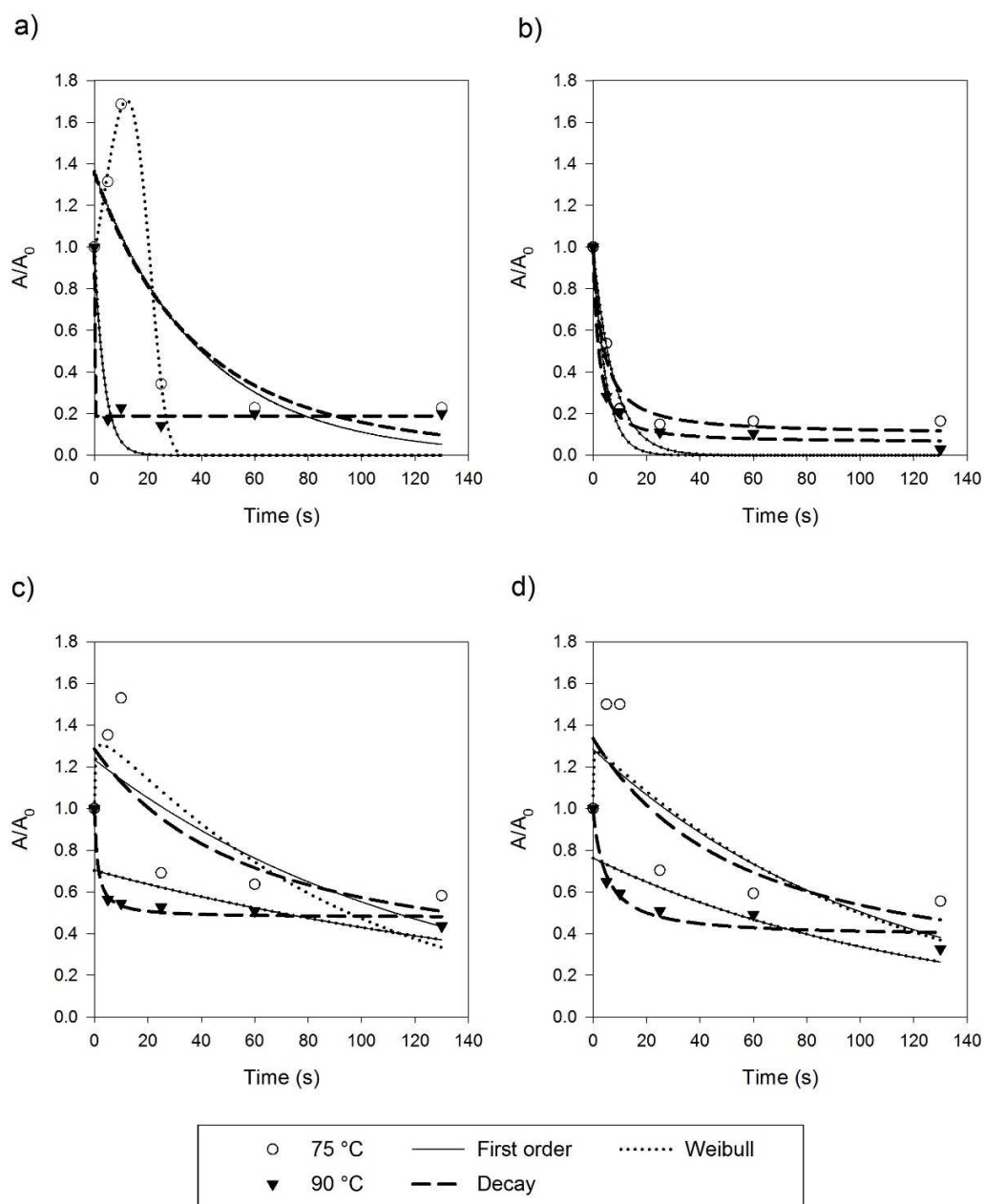


Figure 20. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 10-month-old coconut water.

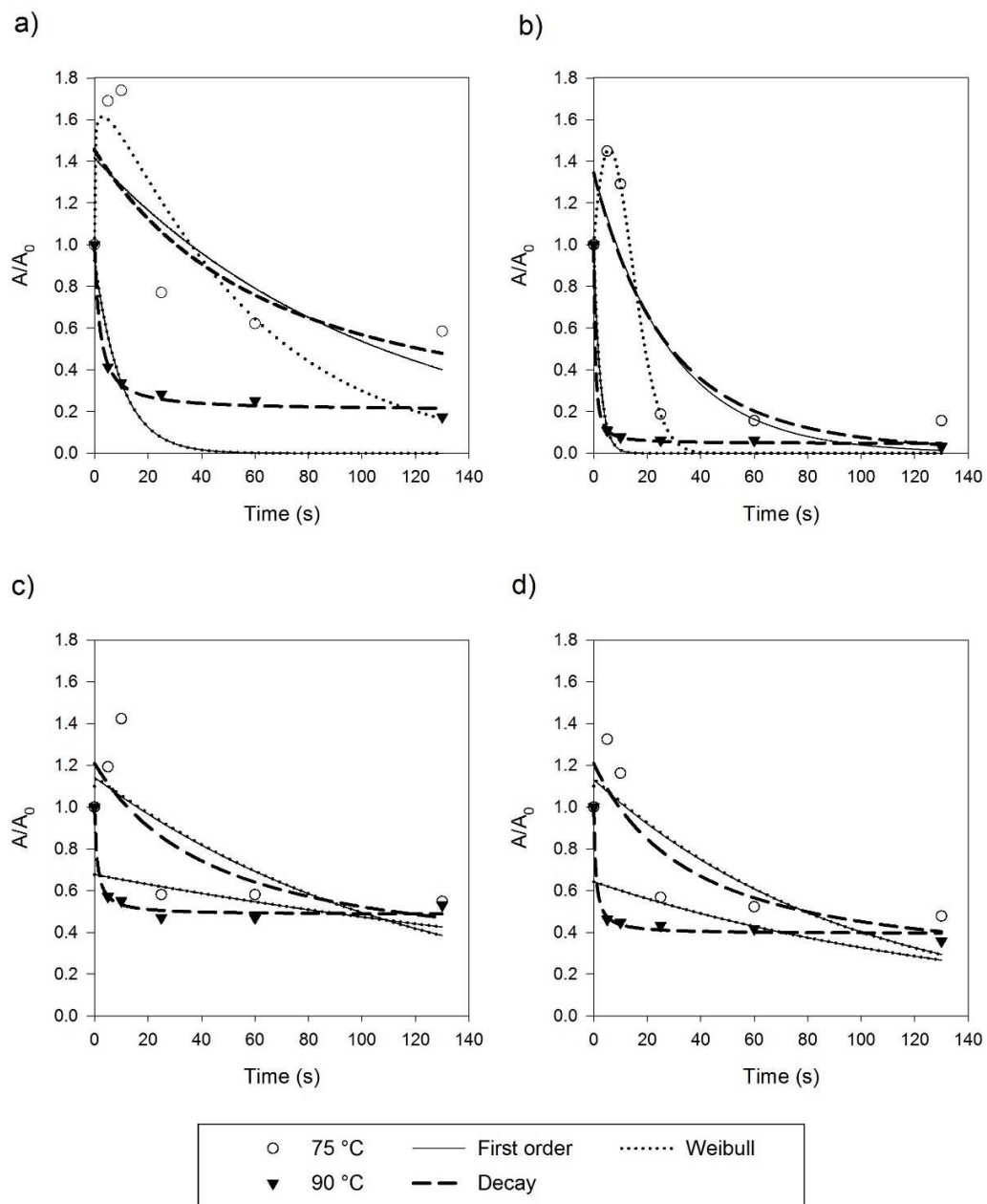


Figure 21. Relative activity (A/A_0) of Peroxidase [a) after conventional and b) microwave heating] and Polyphenol oxidase [c) after conventional and d) microwave heating] of 12-month-old coconut water.

7.4. Conclusions

The processing of mature coconut water by conventional and microwave heating showed a behavior not reported by the literature at 75 °C, described as an increase in the first seconds, followed by the progressive reduction of the enzymatic activity of both POD and PPO enzymes. For temperatures of 75 °C and 90 °C, Weibull model was the one that best described the inactivation of the POD enzyme, having the highest fit and lowest RMSE in both heating processes. The kinetics of enzyme inactivation in most of the cases evaluated was best described by the exponential decay model, with coefficients of determination around 0.7 for 75 °C and higher than 0.98 for 90 °C. The activity of POD and PPO enzymes was variable depending on the ripening stage of the fruit, with PPO being more thermoresistant in all cases. Microwave heating generated the inactivation of the POD and PPO enzyme significantly faster than conventional processing in coconut water at all stages of fruit maturity.

7.5. Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Mexico (CONACyT).

7.6. References

1. Naik, M.; CK, S.; Rawson, A. Tender Coconut Water: A Review on Recent Advances in Processing and Preservation. *Food Reviews International* 2020, 1–22.
2. Prades, A.; Dornier, M.; Diop, N.; Pain, J.-P. Coconut Water Uses, Composition and Properties: A Review. *Fruits* 2012, 67 (2), 87–107.
3. Yong, J.; Ge, L.; Ng, Y. F.; Tan, S. N. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water. *Molecules* 2009, 14 (12), 5144.
4. Walter, E. H. M.; Kuaye, A. Y.; Hoorfar, J. 26 - Case Study on the Safety and Sustainability of Fresh Bottled Coconut Water. In *Global Safety of Fresh Produce*; Hoorfar, J., Ed.; Woodhead Publishing, 2014; pp 367–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781782420279.5.367>.
5. Tan, T.-C.; Cheng, L.-H.; Bhat, R.; Rusul, G.; Easa, A. M. Composition, Physicochemical Properties and Thermal Inactivation Kinetics of Polyphenol

- Oxidase and Peroxidase from Coconut (*Cocos Nucifera*) Water Obtained from Immature, Mature and Overly-Mature Coconut. *Food Chemistry* 2014, 142, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.040>.
6. Chauhan, O. P.; Archana, B. S.; Singh, A.; Raju, P. S.; Bawa, A. S. A Refreshing Beverage from Mature Coconut Water Blended with Lemon Juice. *Journal of Food Science and Technology* 2014, 51 (11), 3355–3361. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0825-6>.
 7. Guo, Y.; Li, W.; Chen, H.; Chen, W.; Zhang, M.; Zhong, Q.; Chen, W. Optimization and Rheological Study of an Exopolysaccharide Obtained from Fermented Mature Coconut Water with *Lipomyces Starkeyi*. *Foods* 2022, 11 (7), 999.
 8. Chen, W.; Zhang, G.; Chen, W.; Zhong, Q.; Chen, H. Metabolomic Profiling of Matured Coconut Water during Post-Harvest Storage Revealed Discrimination and Distinct Changes in Metabolites. *RSC Adv* 2018, 8 (55), 31396–31405.
 9. Porto, E.; Alves Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Fonteles, T. V.; do Nascimento, R. B. R.; Fernandes, F. A. N.; de Brito, E. S.; Rodrigues, S. Ozone and Plasma Processing Effect on Green Coconut Water. *Food Research International* 2020, 131, 109000.
 10. Rojas, M. L.; Trevilin, J. H.; dos Santos Funcia, E.; Gut, J. A. W.; Augusto, P. E. D. Using Ultrasound Technology for the Inactivation and Thermal Sensitization of Peroxidase in Green Coconut Water. *Ultrason Sonochem* 2017, 36, 173–181.
 11. Falguera, V.; Pagán, J.; Garza, S.; Garvín, A.; Ibarz, A. Inactivation of Polyphenol Oxidase by Ultraviolet Irradiation: Protective Effect of Melanins. *Journal of Food Engineering* 2012, 110 (2), 305–309.
 12. de Barcelos Costa, H. C.; Cavalcante, T. A. B. B.; Gut, J. A. W.; de Oliveira Silva, D.; Vieira, L. G. M. An Experimental and Numerical Evaluation of Continuous Pasteurization of Açaí Pulp with Plate Heat Exchangers on the Inactivation of Peroxidase and Polyphenol Oxidase. *Journal of Food Engineering* 2022, 314, 110799.
 13. Campos, C. F.; Souza, P. E. A.; Coelho, J. V.; Glória, M. B. A. CHEMICAL COMPOSITION, ENZYME ACTIVITY AND EFFECT OF ENZYME INACTIVATION ON FLAVOR QUALITY OF GREEN COCONUT WATER¹. *Journal of Food Processing and Preservation* 1996, 20 (6), 487–500. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00761.x>.
 14. Jiménez-Sánchez, C.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Alternatives to Conventional Thermal Treatments in Fruit-Juice Processing. Part 2: Effect on Composition, Phytochemical Content, and Physicochemical, Rheological, and Organoleptic Properties of Fruit Juices. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017, 57 (3), 637–652.
 15. Augusto, P. E. D.; Ibarz, R.; Garvín, A.; Ibarz, A. Peroxidase (POD) and

Polyphenol Oxidase (PPO) Photo-Inactivation in a Coconut Water Model Solution Using Ultraviolet (UV). *Food Research International* 2015, 74, 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.04.046>.

16. Beristaín-Bauza, S.; Martínez-Niño, A.; Ramírez-González, A. P.; Ávila-Sosa, R.; Ruíz-Espinosa, H.; Ruiz-López, I. I.; Ochoa-Velasco, C. E. Inhibition of *Salmonella Typhimurium* Growth in Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water by Hurdle Technology. *Food Control* 2018, 92, 312–318.
17. Chutia, H.; Kalita, D.; Mahanta, C. L.; Ojah, N.; Choudhury, A. J. Kinetics of Inactivation of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Tender Coconut Water by Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Lwt* 2019, 101, 625–629.
18. de Matos Ribeiro, M.; Valdramidis, V. P.; Nunes, C. A.; de Souza, V. R. Synergistic Effect of Thermosonication to Reduce Enzymatic Activity in Coconut Water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2017, 41, 404–410.
19. Mahnot, N. K.; Kalita, D.; Mahanta, C. L.; Chaudhuri, M. K. Effect of Additives on the Quality of Tender Coconut Water Processed by Nonthermal Two Stage Microfiltration Technique. *LWT - Food Science and Technology* 2014, 59 (2), 1191–1195. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.06.040>.
20. Cappelletti, M.; Ferrentino, G.; Endrizzi, I.; Aprea, E.; Betta, E.; Corollaro, M. L.; Charles, M.; Gasperi, F.; Spilimbergo, S. High Pressure Carbon Dioxide Pasteurization of Coconut Water: A Sport Drink with High Nutritional and Sensory Quality. *Journal of Food Engineering* 2015, 145, 73–81.
21. Delfiya, D. S. A.; Thangavel, K. Effect of Ohmic Heating on Polyphenol Oxidase Activity, Electrical and Physicochemical Properties of Fresh Tender Coconut Water. *International journal of food engineering* 2016, 12 (7), 691–700.
22. Matsui, K. N.; Gut, J. A. W.; de Oliveira, P. V.; Tadini, C. C. Inactivation Kinetics of Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Green Coconut Water by Microwave Processing. *Journal of Food Engineering* 2008, 88 (2), 169–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.003>.
23. Paulsen, E.; Moreno, D. A.; Periago, P. M.; Lema, P. Influence of Microwave Bag vs. Conventional Microwave Cooking on Phytochemicals of Industrially and Domestically Processed Broccoli. *Food Research International* 2021, 140, 110077.
24. Arzeta-Ríos, A. J.; Guerra-Ramírez, D.; Reyes-Trejo, B.; Ybarra-Moncada, M. C.; Zuleta-Prada, H. Microwave Heating Effect on Total Phenolics and Antioxidant Activity of Green and Mature Coconut Water. *International Journal of Food Engineering* 2020, 16 (12).
25. Bulhões Bezerra Cavalcante, T. A.; Santos Funcia, E. dos; Wilhelms Gut, J. A. Inactivation of Polyphenol Oxidase by Microwave and Conventional Heating: Investigation of Thermal and Non-Thermal Effects of Focused Microwaves. *Food Chemistry* 2021, 340, 127911.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127911>.

26. 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* 2007, 40 (5), 852–859.
27. Wohlt, D.; Schwarz, E.; Schieber, A.; Bader-Mittermaier, S. Effects of Extraction Conditions on Banana Peel Polyphenol Oxidase Activity and Insights into Inactivation Kinetics Using Thermal and Cold Plasma Treatment. *Foods* 2021, 10 (5), 1022.
28. Systat, S. SigmaPlot 8.0 Programming Guide; Point Richmond, CA, USA, 2002.
29. Chourio, A. M.; Salais-Fierro, F.; Mehmood, Z.; Martinez-Monteagudo, S. I.; Saldaña, M. D. A. Inactivation of Peroxidase and Polyphenoloxidase in Coconut Water Using Pressure-Assisted Thermal Processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2018, 49, 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.07.014>.
30. Sakharov, I. Y.; Ardila, G. B. Variations of Peroxidase Activity in Cocoa (*Theobroma Cacao* L.) Beans during Their Ripening, Fermentation and Drying. *Food Chemistry* 1999, 65 (1), 51–54.
31. Abbasi, N. A.; Kushad, M. M.; Endress, A. G. Activities of Free-Radical Scavenging Enzymes during Apple Fruit Maturity, Ripening, and Senescence. *HortScience* 1997, 32 (3), 458D – 458.
32. Aydin, N.; Kadioglu, A. Changes in the Chemical Composition, Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities during De-velopment and Ripening of Medlar Fruits (*Mespilus Germanica* L.). *Bulg. J. Plant Physiol* 2001, 27 (3–4), 85–92.
33. Ayaz, F. A.; Demir, O.; Torun, H.; Kolcuoglu, Y.; Colak, A. Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) and Total Phenolic Contents in Medlar (*Mespilus Germanica* L.) Fruit during Ripening and over Ripening. *Food Chem* 2008, 106 (1), 291–298.

8. CONCLUSIONES GENERALES

El efecto de los tratamientos térmicos (convencional y microondas) sobre las propiedades químicas del agua de coco fue evaluado mediante resonancia magnética nuclear y quimiometría. Para lograr la comparación de los efectos fue necesario llevar a cabo una caracterización del agua de coco en sus componentes disueltos y los volátiles. Con el análisis quimiométrico fue posible evaluar las diferencias de los tratamientos térmicos y de las características en fresco. También se demostró que la capacidad antioxidante del agua de coco, a pesar de ser baja, se mantuvo después de la aplicación del calentamiento con microondas. Finalmente, la actividad enzimática del agua de coco, relacionada con la peroxidasa fue modelada (ajuste del 98.4% con el modelo de Weibull) para obtener parámetros que ayuden a la determinación de la combinación de temperatura y tiempo óptimos para inactivar la enzima sin perder las propiedades del agua de coco. De los tratamientos probados, el calentamiento con microondas mostró ser más eficiente, al afectar en menor medida las propiedades químicas, además de inactivar las enzimas en menor tiempo (i.e., a 90°C se tiene la mayor reducción en un tiempo no mayor a 30 s) y favorecer la conservación de las propiedades antioxidantes del agua de coco maduro (i.e., 97% en fenoles totales y 111% de capacidad antioxidante).