

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO DE
CAROTENÓIDES E AVALIAÇÃO DO IMPACTO SOBRE A COR EM
SISTEMAS-MODELO SIMULADORES DE SUCO DE CAJU**

Leila Queiroz Zepka

Doutoranda em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Leila Queiroz Zepka** aprovado pela Comissão Julgadora em 30 de abril de 2009.

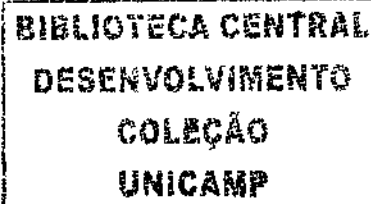
Campinas, 30 de abril de 2009

Adriana Z. Mercadante

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Presidente da Banca

Tese apresentada à comissão examinadora como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade estadual de Campinas.

Campinas 2009



UNIDADE BC
Nº CHAMADA _____
TI/UNICAMP Z 481
V _____
TOMBO BCI 81849
PROC. 16-148-09
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 27/05/09
CÓD. TIT. 441684

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Z48i Zepka, Leila Queiroz
Identificação dos compostos de degradação de carotenóides e
avaliação do impacto sobre a cor em sistemas-modelo simuladores de
suco de caju / Leila Queiroz Zepka. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Caju. 2. Degradação de carotenóides. 3. Cor. 4. Sistemas
modelo. 5. HPLC-PDA-MS/MS. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/foa)

Título em inglês: Identification of degradation compounds of carotenoids and evaluation of the
impact on the color in cashew apple juice model-systems

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cashew apple, Carotenoid degradation, Color, Model
system, HPLC-PDA-MS/MS

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante

Beatriz Rosana Cordenunsi

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva

Florinda Orsatti Bobbio

Renato Atilio Jorge

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

82
P. 05

COMISSÃO EXAMINADORA

Adriana Z. Mercadante

Profa. Dra Adriana Zerlotti Mercadante
(orientadora)

Beatriz Rosana Cordenunsi

Profa. Dra Beatriz Rosana Cordenunsi
(FCF/USP)

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva

Profa. Dra Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva
(FSP/USP)

Prof. Dra Florinda Orsatti Bobbio
(FEA/UNICAMP)

Renato Atílio Jorge

Prof. Dr Renato Atílio Jorge
(IQ/UNICAMP)

Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva

Profa. Dra Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva
(DEPAN/UNICAMP)

Prof. Dr Mário Roberto Maróstica Júnior
(DEPAN/UNICAMP)

Profa. Dra Célia Maria Sylos
(FCF/UNESP)

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

10091211

AGRADECIMENTOS

À Professora Adriana Zerlotti Mercadante, não somente pela orientação eficiente, construtiva e segura, mas também pela amizade dos últimos anos.

À meus pais Carlos Alberto Zepka e Eva Maria Queiroz Zepka, pelo exemplo.

Ao meu querido Eduardo, que ajudou a solidificar a minha existência, e a fazer do amor a razão do meu comportamento.

A professora Maria Isabel Queiroz, pela dedicação incondicional à minha trajetória científica.

Aos Professores Maria Aparecida Azevedo Pereira Da Silva, Claudio Dario Borsarelli, Renato Atílio Jorge e Florinda Orsatti Bobbio pela sempre presente colaboração.

À Professora Veridiana Vera De Rosso pela dedicação incansável durante a realização deste trabalho.

À amizade demonstrada pela colega Gislaine Nogueira na execução da versão final do trabalho.

A equipe de trabalho, Nathalia e Antonio que participaram intensamente deste projeto, amigos queridos que contribuíram na realização da parte experimental.

À Deborah Garruti e Manoel Alves pela colaboração e atenção dispensada na realização dos experimentos com compostos voláteis.

À colaboração e amizade de Chico, Rose e Karla e aos demais funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo auxílio técnico indispensável para realização do projeto.

À minha Família em Campinas, Angélica, Bia, Dani, Hélio, Lucielen, Luzia, Machadinho, Moribe, Otávio, Rosana, Tati, Veri amigos de uma vida inteira, meu sincero agradecimento pela contribuição emocional e acadêmica para realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de química de alimentos Adélia, Gisela, Itaciara, Renata Cury, Lilian, Poliana, Renan, Michele e todos os outros que contribuíram de diferentes formas para elaboração do trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões no sentido de melhorar a qualidade do trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À aquele responsável por tudo.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	XI
RESUMO GERAL	XIII
SUMMARY	XVII
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	7
CAPÍTULO 1	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1. Caju	11
2. Carotenóides.....	12
3. Voláteis.....	16
4. Degradação de carotenóides	20
4.1. Compostos não voláteis.....	21
4.2. Compostos voláteis	25
4.3. Efeito da degradação dos carotenóides na cor.....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 2	45
DEGRADATION COMPOUNDS OF CAROTENOIDS FORMED DURING HEATING OF A SIMULATED CASHEW APPLE JUICE	45
ABSTRACT	47
1. INTRODUCTION.....	48
2. MATERIALS AND METHODS.....	50
2.1. <i>Samples and standards</i>	50

2.2. <i>Simulated cashew apple juice</i>	51
2.3. <i>Carotenoid analysis in the simulated juice</i>	52
3. RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1. <i>Identification of carotenoids</i>	54
3.2. <i>Effect of heating and acid addition on β-cryptoxanthin degradation in an aqueous-based system</i>	59
3.3. <i>Influence of heating on carotenoid degradation in a simulated cashew apple juice</i>	64
4. ACKNOWLEDGEMENTS	69
5. REFERENCES	69
CAPÍTULO 3	75
THERMAL DEGRADATION KINETICS OF CAROTENOIDS IN A CASHEW APPLE JUICE MODEL AND ITS IMPACT ON THE SYSTEM COLOR	75
ABSTRACT	77
INTRODUCTION	78
MATERIALS AND METHODS	79
RESULTS AND DISCUSSION	82
CONCLUSIONS	93
ACKNOWLEDGEMENTS	94
REFERENCES	94
CAPÍTULO 4	99

AROMA COMPOUNDS DERIVED FROM THE THERMAL DEGRADATION OF
CAROTENOIDS IN A CASHEW APPLE JUICE MODEL 99

ABSTRACT 101

1. INTRODUCTION 102

2. MATERIALS AND METHODS 104

 2.1. *Samples and standards* 104

 2.2. *Carotenoid extraction and determination* 105

 2.3. *Cashew apple juice model* 105

 2.4 *Isolation of volatile compounds* 106

 2.5 *GC analysis*..... 106

3. RESULTS AND DISCUSSION 108

 3.1. *Carotenoid degradation in the cashew apple juice-model*..... 108

 3.2. *Volatile compounds derived from the thermal degradation of carotenoids* 111

4. CONCLUSION 118

5. ACKNOWLEDGEMENTS..... 119

6. REFERENCES..... 119

CAPÍTULO 5 125

INFLUÊNCIA DO AQUECIMENTO E ADIÇÃO DE ÁCIDO NA FORMAÇÃO DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS A PARTIR DE COMPOSTOS GLICOSILADOS DO
CAJU 125

RESUMO..... 127

1. INTRODUÇÃO 128

2. MATERIAL E MÉTODOS 130

2.1. Amostra.....	130
2.2. Isolamento dos voláteis livres e compostos glicosilados do caju	130
2.3. Sistemas-modelo com compostos glicosilados de caju	131
2.4. Análise dos voláteis por GC-FID.....	132
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
3.1. Compostos voláteis livres	133
3.2. Compostos voláteis derivados de glicosilados de caju	140
4. REFERÊNCIAS.....	143
CONCLUSÃO GERAL	147

NOMENCLATURA

a^* : coordenada de cor

A_1 : fator pré-exponencial

A_2 : fator pré-exponencial

b^* : coordenada de cor

C^* : croma

ΔE : variação total de cor

E_a : energia de ativação

γ_1 : constante da taxa de reação para etapa rápida

γ_2 : constante da taxa de reação para etapa lenta

h : ângulo hue

k_1 : constante da taxa global de primeira ordem

k_2 : constante da taxa global de primeira ordem

k_3 : constante da taxa global de primeira ordem

L^* : luminosidade

t : tempo

Y_i : concentração de carotenóides ou valor do parâmetro de cor

Y_∞ : concentração de carotenóides ou valor do parâmetro de cor

RESUMO GERAL

Na última década as empresas brasileiras de sucos cresceram intensa e rapidamente, destacando o crescente interesse nacional e internacional com relação aos sucos de frutas tropicais. As características determinantes para a qualidade destes produtos são a cor e o aroma, que sofrem importantes alterações quando submetidos à alta temperatura. Visando avaliar estas alterações foram estudados sistemas-modelo simuladores de suco de caju, constituídos por carotenóides ou compostos glicosilados obtidos de caju, em meio aquoso ácido e submetidos ao aquecimento. Na primeira etapa foi avaliada a influência do tratamento térmico (60 e 90 °C) e ácido orgânico na degradação de carotenóides, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), acoplada aos detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) e de massas (MS). Foram separados 19 carotenóides no sistema simulador de suco de caju não aquecido, sendo os majoritários *all-trans*- β -criptoxantina e *all-trans*- β -caroteno. O aquecimento resultou no desaparecimento de *cis*-neoxantina, neocromo, *cis*-violaxantina e *all-trans*- α -criptoxantina e formação de *cis*-luteína, 15-*cis*- β -caroteno e derivados de 5,8-furanóides (auroxantina, mutatoxantina e 5,8-epóxi- β -caroteno). A 90 °C, a luteína não foi mais detectada e ocorreu a formação de luteoxantina e 12'-apo- β -caroten-12'-al. Neste trabalho, pela primeira vez foi avaliada a degradação térmica da *all-trans*- β -criptoxantina em meio aquoso. Dois produtos de oxidação foram formados (12'-apo- β -caroten-12'-al e 5,6-epoxi- β -criptoxantina) a 90 °C. Este fato indica que a isomeria geométrica e a formação de produtos de oxidação foram as

principais reações que ocorreram no sistema avaliado. No segundo trabalho foi avaliada a cinética de degradação térmica dos carotenóides majoritários e as alterações de cor através dos parâmetros CIELAB no sistema simulador de suco de caju. As curvas de degradação dos carotenóides e das mudanças de cor seguiram um comportamento cinético bifásico, se ajustando a uma equação bi-exponencial. Os diferentes parâmetros cinéticos avaliados revelaram que para as mesmas condições de aquecimento (60 ou 90 °C) similares constantes de taxa para fase rápida (γ_1) e lenta (γ_2) de decaimento da curva foram obtidas tanto para os parâmetros químicos (carotenóides) como para os físicos (cor), indicando que os parâmetros de cor, como por exemplo ΔE^* , podem ser considerados bons parâmetros preditivos para a degradação térmica dos carotenóides. O mecanismo proposto de degradação térmica dos carotenóides envolveu reações irreversíveis e reversíveis acopladas em paralelo, para formação de compostos de isomerização e de oxidação, respectivamente. Na terceira etapa foi estudado o perfil de voláteis obtido a partir da degradação térmica dos carotenóides em sistemas simuladores de suco de caju em função da temperatura (60 a 90 °C), utilizando microextração em fase sólida (SPME) no headspace e cromatografia gasosa (GC) com detectores de ionização de chamas (FID) e de espectrometria de massas (MS). Um total de 35 diferentes compostos voláteis foram separados no sistema sem aquecimento, *p*-cresol foi o composto majoritário, seguido do dodecano. Como consequência do aquecimento, 5-etil-*p*-xileno e 2,5 diisopropilfenol desapareceram, enquanto que os teores da maioria dos

compostos aumentaram com o aumento do tempo e da temperatura. Alguns compostos, como o dimetil-estireno, *p*-cimeno, e *p*-xileno, foram derivados da degradação térmica da cadeia poliênica dos carotenóides. Outro sistema similar constituído de compostos glicosilados de caju com adição de ácido e aquecido a 60 °C foi avaliado, usando como controle o sistema acima sem adição de ácido e como branco o sistema com ácido sem adição de compostos glicosilados. Foram detectados 49 picos, entretanto 5 deles também estavam presentes no branco, e não houve um aumento significativo dos teores relativos de nenhum destes compostos, indicando que provavelmente não ocorreu liberação de novos compostos nas condições avaliada (0,5 M ácido cítrico, aquecimento por 2h a 60 °C).

SUMMARY

In the last decade, the Brazilian juice industries showed a rapid and intense growth, mainly due to the increased national and international interest on the juices from tropical fruits. The important characteristics for the quality of such products are their color and aroma, which can easily be altered by high temperatures. In order to evaluate these modifications, model-systems simulating cashew-apple juice constituted of carotenoids or glycosilated compounds, both obtained from cashew-apple fruits, in acidic aqueous medium and submitted to different temperatures, were studied. In the first stage, the influence of organic acid and heating treatments (60 and 90 °C) on carotenoid degradation were evaluated by high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-PDA-MS/MS). A total of 19 carotenoids were separated in unheated simulated cashew apple juice, with all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene as the major carotenoids. As a consequence of heating, *cis*-neoxanthin, neochrome, *cis*-violaxanthin, and all-*trans*- α -cryptoxanthin disappeared, whereas *cis* isomers (*cis*-lutein and 15-*cis*- β -carotene) and 5,8-furanoid-derivatives (auroxanthin, mutatoxanthin, and 5,8-epoxy- β -carotene) were formed. In addition, lutein was not detected, and luteoxanthin and 12'-apo- β -caroten-12'-al were formed at 90 °C. For the first time, degradation of β -cryptoxanthin in an aqueous-based system was evaluated. Two oxidation products (12'-apo- β -caroten-12'-al and 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin) were formed after β -cryptoxanthin heating at 90 °C. These facts indicated that the geometric

isomerization and formation of oxidation compounds were the main reactions occurring during heating treatment of carotenoids in aqueous-based and juice systems. The kinetics of the thermal degradation of the main carotenoids in a cashew apple juice-model and changes of CIELAB color parameters were studied. The curves for the decay of main carotenoids and color changes showed a biphasic behaviour that was best fitted with the bi-exponential equation. The different kinetic parameters revealed that for the same heating conditions (60 or 90 °C) similar observed rate constants for the fast (γ_1) and slow (γ_2) decays were obtained for both the chemical (carotenoids) and the physical (color) parameters monitored in the present research, indicating that color parameters, such as ΔE^* , are good predictors of both *all-trans*- β -cryptoxanthin and *all-trans*- β -carotene thermal degradation. Similar global isomerization equilibrium constant and activation energy were operating for both *all-trans*- β -carotene and *all-trans*- β -cryptoxanthin. A mechanism for thermal carotenoid degradation was proposed, involving parallel irreversible and reversible coupled degradation reactions to yield isomers and oxidation compounds, respectively. In the third step, the volatile profile derived from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model were studied as a function of temperature (60 and 90 °C). The volatile compounds were obtained by headspace-solid phase microextraction associated to gas chromatography coupled to flame ionization detector (HS-SPME-GC-FID) and further characterized by a mass spectrometry detector (HS-SPME-GC-MS). A total of 35 different volatiles were separated in the fresh cashew apple juice-model,

the major one was *p*-cresol, followed by dodecane. As a consequence of heating, 5-ethyl-*p*-xylene and 2,5 diisopropylphenol disappeared, whereas the amounts of the major compounds increased as time and heating temperature also increased. Some compounds, such as dimethyl-styrene, *p*-cymene, and *p*-xylene, were derived from the thermal degradation of the carotenoid polyene chain. Similar model-systems constituted of glycosilated compounds acidified with citric acid and heated at 60 °C for 2 h were studied, using as control the same system without the addition of acid and the blank system as an acidified system without the addition of glycosilated compounds. Forty-nine peaks were detected, but 5 of them were also present in the blank. There was no significant increase in the relative levels of any of these compounds, indicating that there was probably no release of new compounds under the evaluated conditions (0.5 M citric acid, heating for 2h at 60 °C).

INTRODUÇÃO GERAL

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), família Anacardiaceae, tem origem no Brasil, é especialmente encontrado nas regiões Norte e Nordeste (Valim *et al.*, 2003; Lavinhas, *et al.*, 2008; Michodjehoun-Mestres *et al.*, 2009) e tem se distribuído em muitos países tropicais, como Índia, Nigéria, Tanzânia Moçambique e Vietnam (Michodjehoun-Mestres *et al.*, 2009). O produto mais conhecido e importante economicamente é a castanha, no entanto o processamento da castanha gera como subproduto o pedúnculo ou pseudofruto que pode ser consumido cru, na forma de geléia, doces, sucos e outras bebidas. A produção estimada de caju foi de 30 milhões de toneladas em 2006 (Anonymous, 2007).

Ainda que o suco de laranja industrializado ocupe uma sólida posição junto ao mercado consumidor mundial, o interesse em diversificar produtos tem sido um constante desafio para as indústrias de sucos. Por este motivo nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse nacional com relação aos sucos de frutas tropicais e exóticas. Neste contexto, o suco de caju apresenta grande potencial tanto no âmbito nacional como internacional (Costa *et al.*, 2003).

O Brasil produziu 472.187.000 litros de sucos de frutas em 2007 (Abir, 2008). O mercado interno consome em torno de 40.000 toneladas de suco de caju, quantidade esta ainda considerada pequena em relação à produção e ampliação do mercado exportador, que depende de fatores como a melhoria tecnológica dos processos industriais, além de uma política mercadológica adequada (Cianci, *et*

al., 2005). No entanto, as indústrias que processam o suco de caju enfrentam limitações com relação à aceitação de seu suco junto aos consumidores, em função das modificações que sofrem o aroma e o sabor do suco fresco durante o processamento e estocagem.

Os carotenóides são os compostos responsáveis pela coloração da polpa de caju, porém a sua composição é variável em função de parâmetros como espécie e diferentes regiões de cultivo. Assunção & Mercadante (2003a) relataram que os pseudo-frutos de caju provenientes do nordeste brasileiro apresentaram como carotenóides predominantes o β -caroteno e β -criptoxantina, enquanto que nos caju cultivados na região sudeste, os carotenóides β -caroteno e α -caroteno foram os mais encontrados.

O longo sistema de ligações duplas conjugadas presente na estrutura dos carotenóides é responsável pela absorção de luz na região do visível, porém, devido a esta estrutura, estes pigmentos podem facilmente sofrer isomerização geométrica e oxidação, catalisada pelo calor, luz, dentre outros agentes, resultando em perda ou diminuição do poder corante e atividade biológica. De fato, no suco comercial de caju, foi detectado auroxantina, não encontrada na fruta fresca, formada através do rearranjo dos grupos 5,6-epóxido de violaxantina para o grupo 5,8-furanóide da auroxantina, reação catalisada por ácidos liberados durante o processamento do pseudofruto do caju (Assunção & Mercadante, 2003b).

Além das mudanças de cor, vários compostos voláteis são formados durante aquecimento de carotenóides, tais como *m*-xileno a partir de bixina (Scotter, 1995), diidroactinidiolide (DHA) de β -caroteno (Kanasawud & Crouzet, 1990a) e 5-hexen-2-ona, 2-metil-2-hepten-6-ona, neral e geranial a partir de licopeno (Kanasawud & Crouzet, 1990b). Além disso, um número muito grande de compostos voláteis, alguns aparentemente derivados de carotenóides, tem sido identificado na natureza, e muitos deles desempenham um papel importante como substâncias aromáticas ou de fragrância (Ohloff, 1994). Exemplos reconhecidos de metabólitos de carotenóides são os norisoprenóides β -ionona e β -damascenona, que apresentam um potente aroma de violeta e floral, respectivamente, e que, no entanto, podem ser considerados "off-flavor" em produtos processados, como cenoura liofilizada (Winterhalter & Rouseff, 2002).

Referências Bibliográficas

- Abir, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não Alcoólicas. www.abir.org.br. Acessado em 12-11-2008.
- Anonymous (2007). Statistical Databases (FAOSTAT) FAO, Roma, Italy.
- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z. (2003a). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): Variety and geographic effects. Food Chem., 81, 495-502.

Assunção, R.B., Mercadante, A.Z. (2003b). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). J. Food Compos. Anal., 16, 647-657.

Cianci, F.C., Silva, L.F.M., Cabral, L.M.C. (2005). Clarification and concentration of cashew apple juice by membrane processes. Ciênc. Tecnol. Aliment., 25, 579-583.

Costa, M.C., Maia, G., Figueiredo, R., Filho, M.S., Brasil, I. (2003). Storage stability of cashew apple juice preserved by hot fill and aseptic processes. Ciênc. Tecnol. Aliment., 23, 1-11.

Kanasawud, P., Crouzet, J.C. (1990a). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -carotene degradation. J. Agric. Food Chem., 38, 237-243.

Kanasawud, P., Crouzet, J.C. (1990b). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2. Lycopene degradation. J. Agric. Food Chem., 38, 1238-1242.

Lavinas, F.C., Miguel, M.A.L., Lopes, M.L.M, Valente Mesquita, V.L. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium Occidentale* L.) juice preservation. J Food Sci, 73, 273-277.

Michodjehoun-Mestres, L., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Boucht, C., Reynes, M., Brillouet, J.M. (2009). Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium Occidentale* L.). Food Chem., 112, 851-857.

Ohloff, G. (1994). Scent and Fragrance - The Fascination of Odours and Their Chemical Perspectives. Berlin: Springer Verlag.

Scotter, M.J. (1995). Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. Food Chem., 53, 177-185.

Valim, F.M., Russel, L., Lin, J. (2003). Gas Chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. J. Agric. Food Chem., 51, 1010-1015.

Winterhalter, P., Rouseff, R. (2002). Carotenoid-derived Aroma Compounds: An Introduction. In P. Winterhalter; R. Rouseff, Carotenoid-derived Aroma Compounds, (pp. 1-17). Washington: ACS Symp

OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi estudar, a partir de sistemas-modelo simuladores de suco de caju, a formação e transformação de compostos responsáveis pelo aroma e cor, durante o aquecimento de extratos de carotenóides e de compostos glicosilados ambos isolados de caju *in natura*. Em face disso, o trabalho teve como objetivos específicos:

1. Avaliar a degradação de compostos de carotenoides formados durante o aquecimento de sistemas-modelo simuladores de suco de caju;
2. Estudar a cinética de degradação térmica dos carotenoides em sistemas-modelo simuladores de suco e o impacto nas propriedades de cor;
3. Determinar os compostos de aroma derivados da degradação térmica de carotenóides em sistema-modelo simulador de suco de caju;
4. Determinar o perfil dos compostos voláteis de sistema simulador com compostos glicosilados de caju.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Caju

O caju (*Anacardium occidentale* L.) deve sua denominação à língua Tupi. Originado das regiões Norte e Nordeste do Brasil, na atualidade, como consequência das colonizações é cultivado na África e na Índia (EMBRAPA, 1999). Na verdade a castanha de caju, mundialmente conhecida, é o fruto propriamente dito, enquanto que o pseudofruto é uma das frutas mais consumida no nordeste brasileiro. O caju é encontrado em três variedades: amarelo, laranja e vermelho, sendo a amarela e vermelha as mais comercializadas.

Uma série de características tem sido utilizada para determinar o ponto ótimo de colheita do caju, notadamente a cor, firmeza, composição e peso específico (Figueiras *et al.*, 1999; Figueiredo *et al.*, 2002). A composição físico-química do pseudofruto em diferentes estádios de maturação foi avaliada por Figueiredo *et al.* (2002) que reportaram que o caju atinge estado de melhor maturação quando apresenta pseudofruto desenvolvido, com polpa firme, livre de coloração verde desprendendo-se facilmente da planta. Estes autores observaram decréscimo de clorofila, cálcio, pectina e aumento contínuo nos teores de antocianinas, sólidos solúveis, taninos, açúcares redutores, vitamina C e carotenóides durante a maturação do pseudofruto. A produção de caju caracteriza-se como importante atividade econômica para muitos países tropicais originando uma variedade de alimentos e produtos industrializados. No Brasil sua contribuição para a economia nacional é registrada a partir de 1940, com início da exploração de compostos fenólicos (Bicalho *et al.*, 2000). Além disso, o pseudofruto vem sendo indicado como importante fonte de vitamina C e

carotenóides (Assunção & Mercadante, 2003a, 2003b; Damasceno et al., 2008; Barreto et al., 2008).

A maior parte da produção de caju de estados brasileiros como o Ceará é destinada ao aproveitamento da castanha, onde os produtos obtidos representam à fração mais rentável do agronegócio do caju (Nascimento et al., 2003). Com o desenvolvimento da produção de castanhas e conseqüente aumento de resíduos, representado em maior parte pelo pseudofruto, viabilidades de aproveitamento destes resíduos foram buscadas. Com isso muitos pesquisadores se direcionaram na otimização de tecnologias para industrialização de derivados de caju (Bicalho et al., 2000; Damasceno et al., 2008; Barreto et al., 2008). O suco é o principal derivado do pseudofruto de caju, com importante representatividade no mercado de frutas tropicais e exóticas (Costa et al., 2003).

2. Carotenóides

Os carotenóides são uma das principais classes de pigmentos naturais de ocorrência em frutas, vegetais, algas e bactérias, tendo sido reportado mais de 700 carotenóides na natureza (Briton et al., 2004). Estes compostos são importantes constituintes dos alimentos devido a sua cor e ao fato de serem precursores de compostos de aroma os quais desempenham importante papel nas propriedades sensoriais dos alimentos (Goff & Klee, 2006; Winterhalter & Roussef, 2002). São amplamente conhecidos por serem importantes micronutrientes biológicos, com grande número de funções benéficas ao ser humano. A atividade

provitamina A de cerca de 50 carotenóides é a função mais reconhecida (Siems *et al.*, 2005).

A estrutura química dos carotenóides é constituída basicamente por tetraterpenóides com cromóforo de ligações duplas conjugadas, que permite a absorção de luz na região do visível. Os carotenóides são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, atributos visuais estes diretamente relacionado com a percepção da qualidade e influenciável na preferência dos consumidores (Meléndez-Martínez *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 1988). Entretanto, por serem estruturas insaturadas são altamente suscetíveis à degradação por agentes externos, como calor, baixa acidez e exposição à luz (Mercadante, 2008a). A configuração de maior incidência é a forma *trans*, embora pequenas quantidades de isômeros *cis* também sejam encontradas em alimentos.

A identificação dos carotenóides tem sido preocupação de muitos pesquisadores. Scheweiggert *et al.* (2005) relataram que muitos métodos de separação e identificação de alcenos, como destilação, cromatografia gasosa e espectrometria de infravermelho tem se demonstrado inadequados para análise de carotenóides em tecidos biológicos, devido à grande similaridade estrutural dos compostos deste grupo, termolabilidade e presença de interferentes. Assim com base nas características dos carotenóides, para sua identificação a literatura propõe alguns critérios como o comprimento de onda de máxima absorção no espectro visível, estrutura espectral fina e intensidade do pico *cis*, os quais deverão estar de acordo com os cromóforos sugeridos. Nestes critérios são

considerados ainda a verificação de propriedades cromatográficas em dois sistemas incluindo a utilização de padrões cromatográficos e o espectro de massas, permitindo no mínimo a confirmação da massa molecular (Britton *et al.*, 2004).

De acordo com Aman *et al.* (2005) a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada a detector de arranjo de diodos (PDA) e a espectrometria de massas (MS), apresenta-se como eficiente método para a separação e caracterização de carotenóides. Os autores reportam ainda que associada à técnica HPLC-PDA-MS, a coluna C₃₀ vem sendo utilizada com superior seletividade na separação de isômeros geométricos (Mercadante, 2008b; De Rosso & Mercadante, 2007a). A fase estacionária desta coluna foi especificamente desenvolvida pelo National Institute of Standards and Technology-USA para separação de carotenóides com excelente aplicação na separação de isômeros *trans-cis* (Sander *et al.*, 1994; Sander *et al.*, 2000). No entanto, a espectrometria de massas não distingue os estereoisômeros sendo utilizado para este propósito a espectroscopia de ressonância magnética (NMR).

Utilizando as técnicas citadas cima, os carotenóides foram identificados em diferentes frutas tropicais, tais como manga (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998a), maracujá (Mercadante *et al.*, 1998b), goiaba (Mercadante *et al.*, 1999), buriti, abricó, marimari, pupunha, physalis e tucumã (De Rosso & Mercadante, 2007a), tamarilho, dovyalis (De Rosso & Mercadante, 2007b), nêspira (Faria *et al.*, 2009). Entretanto, os estudos que identificaram os carotenóides de caju não

utilizaram espectrometria de massas (Assunção & Mercadante, 2003a, 2003b; Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981; Figueiredo *et al.*, 2002).

A distribuição de carotenóides em frutas é complexa e sujeita a variações dependendo do cultivar, grau de amadurecimento, época, local, condições de cultivo, processamento e armazenamento (Assunção & Mercadante, 2003a, 2003b; Figueiredo *et al.*, 2002). Para o pseudofruto do caju a literatura reporta amplas variações no conteúdo de carotenóides totais, na ordem de 98 a 204 µg/100g (Assunção & Mercadante 2003a, 2003b; Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981).

Assunção & Mercadante (2003a) avaliaram a influência da variedade de caju (vermelho e amarelo), bem como da localização geográfica (Piauí e São Paulo) em relação a composição de carotenóides, identificando um total de 9 carotenóides. Do perfil definido para os pseudofrutos oriundos do Piauí foram registrados como majoritários, independentes da variedade: *all-trans*-β-criptoxantina (53,0 e 59,6 µg/100g, para amarelo e vermelho respectivamente), *all-trans*-β-caroteno (51,4 e 67,9 µg/100g para amarelo e vermelho) e *all-trans*-α-caroteno (25,3 e 35,2 µg/100g para amarelo e vermelho). Outros carotenóides identificados nas variedades amarela e vermelha foram 9-*cis*+13-*cis*-β-caroteno, *cis*-β-criptoxantina, zeinoxantina, luteína, zeaxantina e violaxantina. Este comportamento difere para as variedades de caju paulista que apresentaram como majoritários apenas o β-caroteno (38,1 e 66,8 µg/100g para o amarelo e vermelho, respectivamente) e α-caroteno (26,9 e 51,9 µg/100g para amarelo e

vermelho, respectivamente). Os valores de β -criptoxantina para as variedades paulistas foram notadamente inferiores (9,7 e 7,6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ para amarelo e vermelho, respectivamente) quando comparados com as mesmas variedades coletadas no nordeste. Cecchi & Rodriguez (1981) reportaram maiores concentrações de carotenóides em variedades paulistas vermelha em relação à amarela. No entanto, quando comparada às diferentes regiões, ambas as variedades na região mais quente (Piauí) apresentaram concentração em carotenóides totais significativamente superior à região sudeste (São Paulo) (Assunção & Mercadante, 2003a).

3. Voláteis

O aroma característico de uma fruta é função tanto da contribuição individual de cada um dos compostos voláteis nela presentes, como também da proporção em que cada um se apresenta. Os compostos voláteis que compõem o aroma dos alimentos são na sua maioria, substâncias sujeitas a rearranjos, ciclizações e oxidação quando submetidos ao aumento de temperatura, em presença de oxigênio. O entendimento dos mecanismos de formação dos compostos voláteis se torna possível quando associado às técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID) e detector de espectrometria de massas (GC-MS). A cromatografia gasosa (GC) constitui-se na técnica de separação mais indicada para análise dos componentes de aroma dos alimentos, e associada à olfatometria (GC-O), permite determinar a

importância individual de cada odor de um composto aromático. No entanto, um dos maiores problemas no estudo de aromas é a extração representativa dos compostos voláteis da matriz alimentícia. Neste contexto, a técnica de microextração em fase sólida (SPME) apresenta a vantagem de ser simples, rápida e a eliminação de uso de solventes, quando comparada com outras técnicas (Ceva-Antunes *et al.*, 2006; Guillot *et al.*, 2006).

Nas últimas três décadas, pesquisas vêm sendo realizadas, com o objetivo de identificar, quantificar e avaliar a contribuição sensorial dos diferentes componentes voláteis importantes para o aroma e sabor de suco de caju (Bicalho *et al.*, 2000; Garruti *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2000; Maciel *et al.*, 1986; McLeod & Troconis, 1982; Valim *et al.*, 2003).

McLeod & Troconis (1982) foram uns dos primeiros a publicar sobre componentes voláteis do caju. Utilizando a técnica de destilação e extração simultânea (SDE) e espectrometria de massas (GC-MS) para identificação dos voláteis em frutas frescas oriundas da Venezuela, foram identificados 46 compostos. Os voláteis identificados se caracterizaram pela predominância em hidrocarbonetos terpênicos (38%) seguido por aldeídos que corresponderam a 26% dos voláteis totais. Baseando-se nas concentrações presentes e na qualidade do aroma de cada volátil determinada pela técnica de *sniffing* foram eleitos como importantes para o aroma de caju: o hexanal (descrito como “grama”), 3-careno (“frutal”, “enjoativo”), limoneno e *trans*-2-hexanal (os quais

eluíram juntos e foram descritos como “grama verde”) e benzaldeído (“amêndoas verdes frescas” e “caju”).

Entretanto, estes resultados não foram confirmados por Bicalho *et al.* (2000) que isolaram componentes de voláteis de caju da variedade *nanum* na forma livre e ligada através de SDE e adsorção em amberlite XAD-2, respectivamente. Foram identificados 62 compostos voláteis livres sendo 40% ésteres, 20% terpenos, 14% hidrocarbonetos, 9% ácidos graxos, 8% aldeídos, 3% álcoois, 3% lactonas, 1% cetonas, 15 fenóis e 1% norisoprenoides. No entanto, estes autores não realizaram análise olfatométrica dos compostos que eluíram da coluna cromatográfica, não acessando assim a importância de cada um para o aroma do caju.

Os resultados obtidos por Maciel *et al.* (1986) empregando a técnica de *headspace* dinâmico, em sucos de caju cultivados no Brasil processados e *in natura*, também produziram resultados controversos aos reportados por McLeod & Troconis (1982). Dentre 52 compostos identificados, a principal classe registrada foi a dos ésteres, apresentando-se em maior concentração os ésteres etílicos dos ácidos 3-metil butanóico e hexanóico. Os aldeídos e terpenos foram detectados em baixo número e concentração em todas amostras analisadas. A avaliação sensorial dos efluentes cromatográficos atribuiu aos éteres butanoato de metila, butanoato de etila e isovalerato de etila o aroma doce frutal, e aos ácidos isovaléricos e isobutírico o odor pungente e azedo, sugerindo ainda que compostos sulfurados também podem ser importantes para o aroma do caju. Os

compostos sulfurados registrados foram: dimetil sulfeto, dimetil dissulfeto e dimetil trissulfeto.

Vários resultados reportados por Maciel *et al.* (1986) foram confirmados por Garruti *et al.* (2003) que analisaram a composição de voláteis do suco extraído do caju *anão* precoce, proveniente de material clonado (CP76), cultivado pela EMBRAPA. Os autores empregaram técnica de *headspace* para extração dos voláteis, determinando a importância odorífera destes compostos por OSME (McDaniel *et al.*, 1990). A qualidade odorífera dos compostos foi sumarizada em quatro categorias de descritores: 1) ésteres 3-metil butanoato de etila, 3-metil butanoato de metila, butanoato de etila e 3-metil pentanoato de metila, descritos como adocicado, caju, frutal; 2) cis-3-hexenol, 2-metil 2-pentanal e hexanal, responsáveis por diferentes aromas descritos como notas verdes; 3) sesquiterpenos descritos como florais e caju; 4) compostos associados com odores desagradáveis: ácido 2-metil butanóico, 3-metil 1-butanóico, acetato de etila e acetato de isoamila.

Valim *et al.* (2003) analisaram os compostos voláteis do suco de caju processado, utilizando SPME para isolamento dos voláteis odoríferos. A caracterização da importância odorífera dos mesmos foi efetuada mediante a técnica tempo-intensidade de avaliação sensorial aplicada aos efluentes cromatográficos. Foram identificados 36 compostos voláteis para amostras de suco reconstituído e 44 para as de suco pasteurizado. Vários destes foram previamente reportados por outros autores (Garruti *et al.*, 2003; Maciel *et al.*,

1986). Os compostos considerados de maior impacto foram: 3-metil butirato de etileno (descrito como castanha), ácido 2-metil butírico (descrito como adocicado, frutal e tropical), ácido butírico (descrito como adocicado), ácido acético (descrito como azedo, amargo e fruta fermentada), benzaldeído (descrito como plástico, resinoso e frutal), furfural (descrito como açúcar queimado e caramelo), e 2-nonenal (descrito como metálico, frutal e doce).

A importância de ligações glicosídicas de constituintes voláteis tem despertado atenção em muitos trabalhos (Adediji *et al.*, 1992; Boulanger & Crouzet, 2001; Kilic *et al.*, 2005; Winterhalter *et al.*, 1991). Estes compostos são capazes de realçar o aroma de compostos aromáticos livres por clivagem química ou enzimática durante o armazenamento de frutas ou durante o processamento, sendo considerados como precursores de aroma (Boulanger & Crouzet, 2001; Kilic *et al.*, 2005; Varming *et al.*, 2006; Winterhalter *et al.*, 1991).

Os norisoprenóides são metabólicos de carotenóides que podem estar presentes em frutas e vegetais na forma livre ou ligados glicosidicamente (Boulanger & Crouzet, 2001). Um número considerável de compostos derivados de carotenóides tem sido identificados em frutas como: acerola (Boulanger & Crouzet, 2001), maçãs (Stingt *et al.*, 2002), manga (Adedeji, *et al.*, 1992) e caju (Bicalho *et al.*, 2000).

4. Degradação de carotenóides

O mecanismo de degradação de carotenóides vem sendo estudado em sistemas-modelo que possibilitam melhor controle das condições iniciais,

intermediários e finais quando comparado a experimentos realizados em alimentos. A complexidade dos multicomponentes da matriz alimentícia e as possíveis interações que podem ocorrer comprometem o monitoramento da geração dos compostos de degradação. Assim, sistemas-modelo minimizam as condições reais presentes nos alimentos tornando possível o estudo da cinética de formação dos compostos voláteis e não voláteis a partir da degradação de carotenóides (Mercadante, 2008a).

4.1. Compostos não voláteis

A estrutura química insaturada faz dos carotenóides, quando isolados do tecido vegetal, componentes altamente instáveis, propensos a isomerização e oxidação, por influência de fatores ambientais e de processamento (Aman *et al.*, 2005; Crouzet & Boulanger, 2001; Gama & Sylos, 2007; Mendez-Pinto *et al.*, 2004; Mercadante, 2008a). Em geral é aceito que o mecanismo de auto-oxidação dos carotenóides é resultante da formação de radicais livres, começando com a epoxidação e clivagem para apo-carotenóides. Recentemente, os produtos de oxidação dos carotenóides também foram responsabilizados por causarem dano *in vivo*, através da indução oxidativa, exercendo efeitos citotóxicos e genotóxicos inibindo junções intercelulares (Caris-Veyrat, 2008; Hurst *et al.*, 2005; Siems *et al.*, 2005).

A isomerização de carotenóides da conformação *trans* para a *cis* é promovida por fatores como ação de ácidos, exposição à luz e aquecimento. A

liberação de ácidos orgânicos durante o processamento de sucos de fruta é suficiente para catalisar a isomerização *trans*⇌*cis* (Aman *et al.*, 2005) e a transformação de 5,6-epóxido em 5,8-furanóide (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998a). Dependendo da severidade das condições empregadas no processamento de sucos a transformação de carotenóides por oxidação e isomerização pode ser induzida, contribuindo assim para a formação de compostos de degradação voláteis e não voláteis (Damasceno *et al.*, 2008; Crouzet *et al.*, 2001; Dhuique-Mayer *et al.*, 2007).

A estabilidade térmica de carotenóides com ênfase nos processos de isomerização *trans*⇌*cis* foi registrada nos trabalhos pioneiros de Zechmeister (Zechmeister, 1944) e tem sido intensivamente investigada na atualidade (Aman *et al.*, 2005; Bicalho *et al.*, 2000; Dhuiquer-Mayer *et al.*, 2007; Kuki *et al.*, 1991).

Aman *et al.* (2005) avaliaram a influência do tratamento térmico na degradação e isomerização dos carotenóides majoritários (β -caroteno e luteína) de folhas verdes de vegetais, sendo constatada isomerização em ambos carotenóides. O aquecimento aumentou a quantidade de 13-*cis*- β -caroteno e proporcionou a isomerização da luteína com formação de 13-*cis* e 13'-*cis*-luteína. Foi registrada maior estabilidade térmica da luteína quando comparada ao β -caroteno. A literatura reporta, com relação ao alto número de estereoisômeros que podem ser formados por aquecimento a partir do β -caroteno, que o 13-*cis*- β -caroteno é preferencialmente formado em relação ao 9-*cis*- β -caroteno (Mercadante, 2008a; Ueno *et al.*, 2004).

A degradação de carotenóides em sucos pelo efeito da temperatura tem sido registrada por diferentes autores (Cortés *et al.*, 2006; Lee & Coates, 2003) que reportaram perdas significativas ($p < 0,05$) deste pigmento, superiores a 10%, para suco de frutas pasteurizado.

Assunção e Mercadante (2003b) avaliaram o perfil de carotenóides em produtos de caju, tais como néctar e suco concentrado. Os autores não detectaram violaxantina, carotenóide de ocorrência no caju fresco, e a presença de auroxantina foi atribuída aos rearranjos dos grupos 5,6-epóxido da violaxantina para os grupos 5,8-furanóide da auroxantina. Os trabalhos de Dhuque-Mayer *et al.* (2007) e Meléndez-Martínez *et al.* (2005) justificaram o rearranjo do grupo 5,6-epóxido para 5,8-furanóide como resultantes de reações catalisadas por ácidos liberados durante o processamento. Lee & Coates (2003) relataram a perda de 5,6-epóxidos de carotenóides como violaxantina, *cis*-violaxantina e anteraxantina, durante a pasteurização térmica de suco de laranja, acompanhada com o aumento dos respectivos 5,8-furanóides, tais como de luteoxantina e mutatoxantina. Dentre outros compostos gerados nos produtos processados de caju além de auroxantina, Assunção & Mercadante (2003b) observaram a presença de 5,6-, 5,8- e 5',8'-epóxidos de criptoxantina.

Gama & Sylos (2007) estudaram o efeito da pasteurização e da concentração na composição de carotenóides de suco de laranja, verificando que não foi significativa a perda em carotenóides totais em função dos processos considerados. Salientaram, porém, alterações no conteúdo de pigmentos em

especial de violaxantina e luteína, ficando claramente evidenciado que a pasteurização reduziu o conteúdo de violaxantina e luteína em 38% e 20%, respectivamente. O processo de concentração resultou em perdas de luteína de 17% (Gama & Sylos, 2007). Lee & Coates (2003) também reportaram perda de carotenóides para o suco de laranja pasteurizado a 90°C por 30 minutos, principalmente de violaxantina (46,4%) e anteraxantina (24,8%), salientando que com as reduções de violaxantina e anteraxantina, a luteína passou a ser o carotenóide em maior concentração no suco de laranja.

Dhuique-Mayer *et al.* (2007) observaram que, sob o aspecto de processamento térmico, as xantofilas e os hidrocarbonetos apresentam diferente estabilidade e susceptibilidade à oxidação. A luteína e a violaxantina foram mais lábeis quando comparadas a outros carotenóides. Os autores atribuíram a principal causa de perda de carotenóides por efeito da temperatura à degradação oxidativa.

Mortensen & Skibsted (2000) avaliaram o efeito da adição de ácido na degradação de β -caroteno, zeaxantina, cantaxantina e astaxantina, bem como o efeito da presença de oxigênio, verificando que os carotenóides são protonados lentamente em meio ácido, sendo a isomerização induzida pela protonação. Carotenóides que continham grupos carbonila foram preferencialmente protonados neste grupo, ao invés da protonação em átomos de carbono do sistema de ligações duplas, evidenciando, maior estabilidade dos compostos com carbonila quando comparados a xantofilas e caroteno.

4.2. Compostos voláteis

Vários compostos derivados de carotenóides têm sido identificados na natureza, e muitos deles, com importância como substâncias de aroma. Vários são classificados como norisoprenóides. Compostos como β -ionona, β -damacenona e diidroactinidiolida (DHA) estão presentes em produtos como chá, tabaco e frutas, e são considerados produtos de degradação do β -caroteno (Winterhalter & Rouseff, 2002).

A produção de aromas a partir de carotenóides pode ocorrer tanto por via enzimática como não enzimática. Acredita-se que a biodegradação de carotenóides seja catalisada por dioxigenases (Winterhalter, 1996; Wahlberg & Eklund, 1998). A via não enzimática inclui oxidação induzida pela luz (Isoe *et al.*, 1969) ou alta temperatura (Kanasawud & Crouzet, 1990a,b; Scotter, 1995; Scotter *et al.*, 2000), ou ainda por auto-oxidação (Mordi *et al.*, 1993; Lutz-Roder *et al.*, 1999).

Kanasawud & Crouzet (1990a) investigaram o mecanismo de formação de compostos voláteis por degradação térmica do β -caroteno em meio aquoso. Os autores constataram a influência da temperatura na geração de produtos de degradação, evidenciando que o primeiro composto produzido durante o tratamento térmico do β -caroteno foi o diidroactinidiolide (DHA), o qual pode ser formado através do 5,6-epoxi- β -ionona. Ao considerar o incremento na concentração de DHA, em função do tempo ao qual o sistema-modelo era submetido à temperatura de 97°C, os pesquisadores sugeriram que outros

compostos não voláteis, como o mutacromo, aurocromo e possivelmente luteocromo, atuassem como precursores na formação de DHA. Neste mesmo estudo usando cromatografia gasosa associada à técnica de espectrometria de massas, foram tentativamente identificados os voláteis decanal, 4-etil-benzaldeído, 2,6,6-trimetil-2-ciclohexano-1-ona, 2,6-dimetildecahidronaftaleno, 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. Foi observado claramente, através de reação de desidratação, a formação de 2,6,6-trimetil-2-ciclohexano-1-ona a partir de 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona e de β -ciclocitral a partir de 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexano-1-carboxaldeído. Foi proposto ainda, que a geração de 2,6,6-trimetilciclohexanona pode ser originada a partir de diferentes compostos como β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona ou 2,6,6-trimetil-2-ciclohexano-1-ona.

Segundo Waché *et al.* (2003) os produtos de degradação do β -caroteno como β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona e DHA, são importantes fontes de aroma e sabor, podendo ser obtidos pela ação de enzimas geradoras de radicais livres e clivagem da ligação C₉-C₁₀. Os resultados evidenciaram que a clivagem na posição lateral do β -caroteno na conformação *trans* e na conformação 9-*cis* foi favorecida. Para o all-*trans*- β -caroteno a clivagem favoreceu a formação de β -ciclocitral e β -apo-8'-carotenal e para 9-*cis*- β -caroteno, formação de β -ionona e 10-apo- β -carotenal. Foi observada alta degradação da β -ionona formando elevadas concentrações de DHA na etapa inicial de reação, concluindo que altos níveis de 9-*cis*- β -caroteno resultaram no aumento de DHA, mediante a

transformação do isômero 9- β -*cis*-caroteno em 5,8-epóxi- β -caroteno e 5,6-epóxi- β -ionona seguido de clivagem, formando DHA.

O aumento da concentração de 2-metil-2-hepta-6-ona e de geranil acetona após o processamento de tomate foi descrito por alguns autores (Schereirer & Drawert, 1977; Sieso & Crouzet, 1977). Acredita-se que estas cetonas sejam provenientes da degradação térmica de licopeno, pois após aquecimento de licopeno em solvente orgânico a 220°C, foi registrada formação em grandes quantidades de 2-metil-2 hepten-6-ona (Drawet *et al.*, 1981).

Kanasawud & Crouzet (1990b) trataram termicamente licopeno em temperaturas variando de 30 a 97°C por 3 h em meio aquoso. Nestas condições, 5 compostos não voláteis foram isolados por TLC e 2 identificados (*all-trans*- e *cis*-licopeno), enquanto que dos 18 compostos voláteis separados 8 foram identificados (5-hexen-2-ona, 2-metil-2-hepten-6-ona, 6-metil-3,5-heptadieno-2-ona, hexan-2,5-diona, neral, geranial, geranial acetato e pseudoionona).

Nonier *et al.* (2004) avaliaram a influência da degradação de luteína e β -caroteno como fator na alteração de aroma de madeiras, empregadas na confecção de barris para armazenamento de vinhos. Foram propostos dois tipos de reações oxidativas para simulação da degradação do β -caroteno, oxidação pelo cobre e por radicais livres, ambos resultando na formação de norisoprenóides. No primeiro caso, foram indicados como produto de degradação os norisoprenóides β -ciclocitral, β -ionona, DHA, 3-oxo- β -ionona, 6-hidroxi- α -ionona

e *trans*-5,6-epóxi- β -ionona. No segundo caso, os mesmos compostos foram caracterizados, além do 3-oxo- β -ionol.

Lactonas responsáveis pelo aroma de “quince” (*Cydonia oblonga* Mill) foram formadas após aquecimento de extrato metanólico de marmelo, em pH 3,7 natural da fruta, parcialmente purificado por resina XAD-2 (Winterhalter *et al.*, 1991).

Stingl *et al.* (2002) ressaltaram que norisoprenoides podem ser precursores de “off-flavor”, mais especificamente, 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), que possui aroma de querosene. Este componente foi formado com outros voláteis, a partir de 3,4-dihidróxi-7,8-dihidro- β -ionona-3-O- β -glucopiranosídeo sob aquecimento em pH 3,2.

Foi avaliada a formação de β -damascenona a partir de 9'-*cis*-neoxantina em sistema modelo contendo ácido peróxi-acético submetido ao tratamento térmico de 60°C por 90 minutos e a 90°C por 20 minutos (Bez man *et al.*, 2005). A maior formação de β -damascenona foi observada em pH 5.

4.3. Efeito da degradação dos carotenóides na cor

Os tratamentos térmicos são alternativas tecnológicas convencionalmente utilizadas no processamento de sucos de frutas, visando o aumento da vida útil, no entanto com detrimento de sua qualidade sensorial (Lee & Coates, 1999; Lee & Coates, 2003; Cortés *et al.*, 2006). A transformação de pigmentos é considerada uma das maiores causas deste problema, particularmente no que se refere a cor dos alimentos (Cortés *et al.*, 2006).

A cor é um dos atributos mais importantes dos sucos de frutas e dependendo da estabilidade dos pigmentos e severidade do tratamento, a alteração destes componentes pode gerar mudanças na cor. As mudanças de cor em sucos de frutas ricas em carotenóides são devido ao rearranjo ou formação de produtos de degradação, tais como: *cis*-isômeros, epóxidos, produtos de cadeia curta e em alguns casos compostos voláteis.

As alterações de cor podem ser medidas por diferentes métodos, entre eles mediante a aplicação das coordenadas do sistema espacial CIELAB através de um diagrama tridimensional de cores (L^* , a^* , b^*), onde L^* indica a luminosidade, a^* cromaticidade tendendo do verde (-) até vermelho (+) e b^* cromaticidade que varia do azul (-) ao amarelo (+). Os valores numéricos de a^* e b^* podem ser calculados em ângulo hue (h), que é o valor em graus correspondente ao diagrama tridimensional de cores: 0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul) (Damasceno *et al.*, 2008; Francis & Clydesdale, 1975; Lee & Coates, 1999; Lee & Coates, 2003; Cortés *et al.*, 2006; Meléndez-Martínez *et al.*, 2005; Meléndez-Martínez *et al.*, 2006).

Meléndez-Martínez *et al.* (2006) relacionaram a cor de vários carotenóides com suas respectivas estruturas químicas, considerando as coordenadas do sistema CIELAB. Os resultados deste estudo revelaram que diferentes carotenóides podem ser agrupados no plano a^* x b^* em função do número de ligações conjugadas.

A diferença de cor registrada entre o suco de laranja fresco e pasteurizado foi avaliada por Lee & Coates (2003), através dos parâmetros de cor (L^* a^* b^*). Foi verificada mudança na direção positiva dos valores de L^* a^* e b^* , indicando a presença de mais amarelo, mais vermelho e um sutil clareamento da solução analisada.

Ahmed *et al.* (2002) avaliando o efeito térmico da degradação visual da cor e de carotenóides em purê de mamão, testaram diferentes relações entre os valores das coordenadas a^* e b^* (a^*/b^* ; $a^*\times b^*$; b^*/a^*). Foi demonstrado que a combinação $a^*\times b^*$ foi a que melhor descreveu a cinética de degradação de carotenóides e mudança visual da cor.

Cortés *et al.* (2006) avaliaram a cor e a concentração de carotenóides de suco de laranja pasteurizado, registrando redução na concentração de carotenóides e alterações de cor indicada por reduções de 60% do valor de a^* e aumento em 14% do valor de b^* em relação ao suco fresco.

De acordo com Lee & Coates (1999) a diferença total de cor (ΔE^*) indica a magnitude de diferença de cor entre dois tratamentos e é matematicamente definido pela raiz do somatório dos quadrados de ΔL^* , Δa^* e Δb^* . Francis & Clydesdale (1975) reportaram que um ΔE^* igual a 2 pode ser considerado como a diferença perceptível entre dois tratamentos. O efeito da temperatura na degradação visual da cor foi nitidamente observado no trabalho de Chutintrasri & Noomhorm (2007), estudando purê de abacaxi com intervalo de temperatura de 70

a 110°C. Foi observado um comportamento linear, com variações de ΔE^* de 0,87 a 12,90.

Lee & Coates (2003), avaliando a influência da pasteurização em suco de laranja obtiveram valores de ΔE^* superiores a 2, atribuindo a alteração de cor indicada por ΔE^* à transformação de 5,6-epóxi- para 5,8-epóxi- β -caroteno constatada durante o processo de pasteurização. Lee & Coates (1999) também encontraram valores de ΔE^* de 2,5 a 4,8 para 15 amostras de suco de toranja pasteurizado a 91°C. Muitas amostras apresentaram pequeno aumento nos valores de luminosidade (L^*), o que indica ligeiro clareamento na superfície do suco, atribuído à precipitação de partículas suspensas. Similar observação a respeito de pequenas reduções nos valores de L^* , atribuídas à precipitação parcial de partículas instáveis em suspensão em suco pasteurizado, foi descrita posteriormente por Lee & Coates (2003), para suco de laranja, bem como para o suco de toranja (Lee & Coates, 1999). No entanto, Cortés *et al.* (2006) não observaram variação significativa dos valores de L^* em suco de laranja pasteurizado.

A cinética de degradação visual da cor e de carotenóides de produtos alimentares são fenômenos complexos e dependentes de modelos preditivos experimentais que podem ser usados em cálculos de engenharia. A cinética de degradação de cor e de pigmentos em sistemas-modelo ou em frutas e vegetais tem sido objetivo de estudo de várias pesquisas (Ahmed *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2005; Chutintrasri & Noomhorm, 2007; Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Mortensen

& Skibsted, 2000, Rios *et al.*, 2005). A otimização para aperfeiçoar o processo térmico de um produto, requer dados cinéticos de degradação de cor tais como constante de velocidade (k) a uma determinada temperatura, e a energia de ativação (E_a) do processo. Modelos cinéticos de zero e primeira ordem tem sido aplicados para a avaliação da degradação da cor (Ahmed *et al.*, 2002; Chutintrasri & Noomhorm, 2007; Damasceno *et al.*, 2008; Dhuique-Mayer *et al.*, 2007).

A cinética de degradação térmica da cor em purê de abacaxi foi investigada por Chutintrasri & Noomhom (2007) utilizando temperatura no intervalo de 70 a 110° C. Foi verificando um acréscimo nos valores de a^* e de ΔE^* , durante o aquecimento nas diferentes condições avaliadas. Os dados obtidos para ambas variáveis ajustaram-se a um modelo de ordem zero para qualquer temperatura estudada. Ahmed *et al.* (2002) avaliaram a cinética de degradação visual da cor e de carotenóides em purê de mamão processado a 70 a 105°C. Foi constatando que o processo seguiu um modelo cinético de reação de primeira ordem com relação linear entre a degradação de pigmentos e cor visual. Recentemente, Dhuique-Mayer *et al.* (2007) avaliando a cinética de degradação térmica e da concentração de oxigênio dissolvido em sucos de frutas cítrico também sugeriram um modelo de primeira ordem para a degradação dos carotenóides. No entanto, Rios *et al.* (2005) avaliando a cinética de degradação da bixina em sistema modelo aquoso no intervalo de temperatura de 70 a 125°C verificaram que para a alta temperatura o comportamento cinético de degradação se ajustou a um modelo bi-exponencial.

5. Referências Bibliográficas

- Adedeji, J., Hartman, G.T., Lech, J. Ho, C-T. (1992). Characterization of glycosidically bound aroma compounds in the african mango (*Mangifera indica* L.). J. Agric. Food Chem., 40,659-661.
- Ahmed, U.S., Shivare, U.S., Sandhu, K.S. (2002). Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. J. Food Scie., 67, 2692-2695.
- Aman, R., Schieber, A., Carle, R. (2005). Effects of heating and illumination on trans-cis isomeration and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. J. Agric. Food Chem., 48, 484-488.
- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z. (2003a). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. Food Chem., 81, 495-502.
- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z. (2003b). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). J. Food Compos. Anal., 16, 647-657.
- Barreto, G. P. De M., Souza, A. C. R., Azeredo, H. M. C., Mercadante, A. Z. (2008). Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. Alimentos e Nutrição, 18, 207-213.
- Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C., Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. Food Res. Int., 38, 989-994.

- Bezman, Y., Bilkis, I., Winterhalter, P., Fleischmann, P., Rouseff, R., Baldermann, S., Naim, M. (2005). Thermal oxidation of 9'-cis-neoxantina in a model system containing peroxyacetic acid leads to the potent odorant β -damascenone. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9199-9206.
- Bicalho, B., Pereira, A.S., Aquino Neto, F.R., Pinto, A.C., Rezende, C.M. (2000). Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L, Var, nanum) volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1167-1174.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (2004). *Carotenoids Handbook*. Basel: Birkhäuser.
- Caris-Veyrat, C. (2008). Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. 177-192). Boca Raton: CRC Press.
- Cecchi, H.M., Rodriguez-Amaya, D.B. (1981). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *J. Food Sci.* 46, 147-149.
- Ceva-Antunes, P.M.N., Bizzo, H.R., Silva, A.S., Carvalho, C.P.S., Antunes, O.A.C. (2006). Analysis of volatile of siriquela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *Lebensm. - Wiss. U -Technol.*, 39, 436-442.

- Chutintrasri, B., Noomhorm, A. (2007). Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *Lebensm. - Wiss.U -Technol.*, 40, 300-306.
- Cortés, C., Esteve, M.J., Rodrigo, D., Torregrosa, F., Frigola, A. (2006). Changes colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1932-1939.
- Costa, M.C.; Maia, G., Figueiredo, R., Filho, M.S., Brasil, I. (2003). Storage stability of cashew apple juice preserved by hot fill and aseptic processes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23, 1-11.
- Crouzet, R.; Boulanger, R. (2001). Identification of the aroma components of acerola (*malphigia glabra* L.): free and bound flavour compounds. *Food Chem.*, 74, 209-216.
- Damasceno, L.F., Fernandes, F.A.N, Magalhães, M.M.A., Brito, E.S. (2008). Non-enzymatic browning in clarified cashew Apple juice during thermal treatment kinetics and process control. *Food Chem.*, 106, 172-179.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z. (2007a). Identification and quantification of carotenoids by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5062-5072.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z. (2007b). HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9135-9141.

- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M.J. (2007) Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4209-4216.
- Drawert, F., Schreier, P., Bhiwapurkar, S., Heindze, I. (1981). Chemical-technological aspects for concentration of plant aromas. In *Flavour*: Schreier, P. (ed.), 649-63.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa (1999). *Revista Guia da Terra*, 3,1-17.
- Faria, A.F.; Hasegawa, P.N.; Chagas, E.A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A.Z. (2009). Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. *J. Food Compos. Anal.*, in press (doi:10.1016/j.jfca.2008.10.014).
- Figueiras, H.A.C., Mosca, J.L., Alves, R.E., Menezes, J.E. (1999). Cashew apple for fresh consumption: research and post-harvest handling technology in Brazil. *Acta Horticult.*, 485,155-160.
- Figueiredo, R.W.; Lajolo, F.M.; Alves, E.R.; Figueiras, C.A.H. (2002). Physical-chemical changes in dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. *Food Chem.*, 77, 343-347.
- Francis, J.F., Clydesdale, F.M. (1975). *Food colorimetry, theory and application*. New York: Van Nostrand Reinhold/AVI.

- Gama, J.J.T., Sylos, C.M. (2007). Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem.*, 100, 1686-1690.
- Garruti, D.S., Franco, M.R.B., Da Silva, M.A.A.P., Janzantti, N.S.; Alves, G.A. (2003). Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by Osme gas chromatography/olfactometry technique. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1455-1462.
- Goff, S., Klee, H.J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 311, 815-819.
- Guillot, S., Peytavi, L., Bureau, S., Boulanger, R., Lepoutre, J-P., Crouzet, J., Schorr-Galindo, S. (2006). Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.*, 96, 147-155.
- Hurst, J. S., Saini, M. K., Jin, G.-F., Awasthi, Y. C., & van Kuijk, F. J. G. M. (2005). Toxicity of oxidized β -carotene to cultured human cells. *Exp. Eye Res.*, 81, 239-243.
- Isoe, S., Hyeon, S.B., Sakan, T. (1969). Photo-oxygenation of carotenoids. I. The formation of dihydroactinidiolide and β -ionone from β -carotene. *Tetrahedron Lett.*, 10, 279-281.

- Kanasawud, P., Crouzet, J.C. (1990a). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 237-243.
- Kanasawud, P., Crouzet, J.C. (1990b). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2. Lycopene degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1238-1242.
- Kilic, A., Kollmannsberger, H., Nitz, S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *laurus nobilis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2231-2235.
- Kuki, M., Koyama, Y., Nagae, H. (1991). Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis, and 15-cis isomers of β -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state. *J. Phys. Chem.*, 95, 7171-7180.
- Lee, H.S., Coates, G.A. (1999). Thermal pasteurization effects on color of red grape fruit juice. *J. Food Sci.*, 64, 663-666.
- Lee, H.S., Coates, G.A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensm. - Wiss.U -Technol.*, 36, 153-156.
- Lutz-Roder, A., Jezussek, M., Winterhalter, P. (1999). Nickel peroxide induced oxidation of canthaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1887-1891.
- MacDaniel, R.R., Miranda-Lopez, B., Watson, M., Libbey, L.M. (1990). Pinot Noir Aroma: a Sensory/gas chromatographic Approach. In: *Flavors and off Flavors*. Charalambous, G. Ed. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 23-36.

- Maciel, M.I., Hansen, T.J., Aldinger, S.B., Labows, J.N. (1986). Flavor chemistry of cashew apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 923-927.
- Macleod, A.J., Troconis, N.G. (1982). Volatile flavour components of cashew "apple" (*Anacardium Occidentale*). *Phytochem.* 21, 2527- 2530.
- Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B. (2000). Volatile Constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J. Food Compos. Anal.* 13, 227-232.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G.; Vicário, M.I., Heredia, J. (2005). Identification of zeinoxanthin in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6362-6367.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicário, M.I., Heredia, J. (2006). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.*, 101, 177-174.
- Mendes-Pinto, M.M., Ferreira, S.C.A., Oliveira, P.P.B.M., Pinho, P.G. (2004). Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed- and normal-phase liquid chromatography: a qualitative analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3182-3188.
- Mercadante, A.Z. (2008a). Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. 213-240). Boca Raton: CRC Press.
- Mercadante, A.Z. (2008b). Analysis of carotenoids. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. p. 447-478). Boca Raton: CRC Press.

- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B. (1998a). The effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 128-130.
- Mercadante, A.Z., Britton, G., Rodriguez-Amaya, D.B. (1998b). Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chem.* 46, 4102-4106.
- Mercadante, A.Z., Steck, A.; Pfander, H. (1999). Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 145-151.
- Mordi, R., Walton, J., Burton, G., Hughes, L., Ingold, K., Lindsay, D., Moffatt, D. (1993). Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8-carotenal. *Tetrahedron*, 49, 911-928.
- Mortensen, A., Skibsted, L. H. (2000). Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 279-286.
- Nascimento, R.F., Aquino, F.W.B., Amorim, A.G.N, Prata, L.F. (2003). Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 217-221.
- Nonier, F.M., De Gaulejac, V.N., Vivas, N., Vitry, C. (2004). Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood. *C.R. Chimie*, 7, 689-698.

- Pérez-Galvez, A., Rios, J.J., Mínguez-Mosquera, M.I. (2005). Thermal degradation products formed from carotenoids during a heat-induced degradation process of paprika oleoresins (*Capsicum annuum* L.). J. Agric. Food Chem., 53, 4820-4826.
- Rios, A. de O., Borsarelli, C., Mercadante, A.Z. (2005). Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. J. Agric. Food Chem., 53, 2307-2311.
- Roth, H.A., Adle, L., Gifford, S.R., Clydesdale, F.M. (1988). Psychophysical relationships between perceived sweetness and color in lemon and lime flavored beverages. J. Food Sci., 53, 1116-1162.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Craft, N.E., Wise, S.A. (1994). Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoids isomers. Anal. Chem., 66, 1667-1674.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M. (2000). C₃₀ stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. J. Chromatogr. A., 880, 189-202.
- Schereirer, P., Drawert, F. (1977). Quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. 4. Enzymic and thermal-reaction products formed during processing of tomatoes. Zeitesch. Lebensm.-Unters. Forsch., 165, 23-27.
- Scheweiggert, U., Kammerer, D.R., Carle, R., Schieber, A. (2005). Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pods (*Capsicum*

- annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 19, 2617-2628.
- Scotter, M.J. (1995). Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chem.*, 53, 177-185.
- Scotter, M., Wilson, L.A., Appleton, G.P., Castle L. (2000). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 2. Determination of aromatic hydrocarbon thermal degradation products by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 484-488.
- Siems, W., Wieswedel, I., Salerno, C., Crifò, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C., Sommerburg, O. (2005). β -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions potential side effects of high-dose β -carotene supplementation. *J. Nutr. Biochem.*, 16, 385-397.
- Sieso, V., Crouzet, J. (1977). Tomato volatile components: effect of processing. *Food Chem.*, 2, 241-251.
- Stingl, C., Knapp, H., Winterhalter, P. (2002). 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- β -ionone-3-O- β -D-glucopyranoside and other glycosidic constituents from apple leaves. *Nat. Prod. Lett.* 16, 87-93.

- Ueno, T., Masuda, H., Ho, C. (2004). Formation mechanism of p-methylacetophenone from citral via a tert-alkoxy radical intermediate. J. Agric. Food Chem., 52, 5677-5684.
- Valim, F.M., Russel, L., Lin, J. Gas Chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. J. Agric. Food Chem. 51, 1010-1015, 2003.
- Varming, C., Andersen, M.L., Poll, L. (2006). Volatile monoterpenes in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice: effects of heating and enzymatic treatment by β -glucosidase. J. Agric. Food Chem., 54, 2298-2302.
- Waché, Y., Bosser-Deratuld, A., Lhuguenot, J. C., Belin, J. M. (2003). Effect of *cis/trans* isomerism of β -carotene on the rations of volatile compounds produced during oxidative degradation. J. Agric. Food Chem. 51, 1984-1987.
- Wahlberg, I., Eklund, A.M. (1998). Degraded Carotenoids. In: Carotenoids, vol 3: Biosynthesis and Metabolism, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.). Birkhäuser, Basel, 195-216.
- Winterhalter, P., Lutz, A., Schreider, P. (1991). Isolation of a glucosidic precursor of isomeric marmelo lactones from quince fruit. Tetrahedron Lett., 32, 3660-3670.
- Winterhalter, P. (1996). Biotechnology for Improved Foods and Flavors. Takeoda, G., Teranish, R., Kobayashi, A. (Eds). ACS Symp., 295-308.

Winterhalter, P., Rouseff, R. (2002). Carotenoid-derived Aroma Compounds: An Introduction. In: Carotenoid-derived Aroma Compounds, P. Winterhalter; R. Rouseff (eds.). ACS Symp. Ser. 802, Washington, 1-17.

Zechmeister, L. (1944). Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. Chem. Rev., 34, 267-34

CAPÍTULO 2

DEGRADATION COMPOUNDS OF CAROTENOIDS FORMED DURING HEATING OF A SIMULATED CASHEW APPLE JUICE

Submetido para publicação na revista *Food Chemistry*

ABSTRACT

The influence of organic acid and heating treatments on carotenoid degradation on a simulated cashew apple juice was assessed by high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array and mass spectrometry detectors. A total of nineteen *carotenoids* were separated in unheated simulated cashew apple juice, with all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene as the major ones. As a consequence of heating, five xanthophylls disappeared, whereas two new *cis* isomers and five epoxide or furanoid-derivatives were formed and the levels of all *cis* isomers increased. In addition, 12'-apo- β -carotenal was formed at 90 °C. Two oxidation compounds (12'-apo- β -carotenal and 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin) were formed after β -cryptoxanthin heating at 90 °C in an aqueous-based system. In all systems, the amounts of total carotenoids lost were not compensated by those formed. These facts indicated that isomerization and oxidation to both coloured and non-coloured compounds were the main reactions occurring during heating of carotenoids in aqueous-based and juice systems.

Keywords: carotenoids, degradation compounds, cashew apple juice, HPLC-PDA-MS/MS, *Anacardium occidentale* L.

1. INTRODUCTION

In the last decade, the Brazilian juice industry showed rapid and intensive growth, mainly due to the increasing national and international interests in fruit juices, since these products have been strongly associated to health benefits. The global juice market registered a growth of about 8%, which is the equivalent of US\$ 2 billions in sales in 2006-2007 (ACNielsen, 2008; Cooper, 2004), with Brazil producing 472,187,000 L of fruit juice in 2007 (Abir, 2008).

The cashew apple is a tropical fruit native to Brazil, principally grown in the North and Northeast regions. The pseudo-fruit, known as cashew apple, is the part of the tree that connects it to the cashew nut, the real fruit, a well-known product worldwide. The pseudo-fruit is commercially exploited mainly as frozen pulp, juice, and nectar. Carotenoids are the main pigments responsible for the colour of cashew apple fruits and juices, the major ones being β -cryptoxanthin in red and yellow cashew apple fruits from the hottest Northeast region of Brazil, and β -carotene in the same fruits from the Brazilian Southeast region (Assunção & Mercadante, 2003a, 2003b).

Carotenoids are highly susceptible to degradation by external agents, such as heat, low pH, and light exposure, promoting changes of colour due to the rearrangement or formation of degradation compounds such as *cis*-isomers, epoxides, short chain products, and in some cases, volatile compounds (Mercadante, 2008a). Besides colour fate, carotenoid oxidation compounds are also supposed to have detrimental effects *in vivo*, through the induction of oxidative

stress, exertion of cytotoxic and genotoxic effects, and inhibition of gap junction intercellular communications (Caris-Veyrat, 2008; Hurst, Saini, Jin, Awasthi, & van Kuijk, 2005; Siems et al., 2005).

References to thermal instability of carotenoids are found in the pioneering work of Zechmeister (1944), with emphasis on the *trans*- to *cis*- isomerization. This topic has been intensively investigated and striking examples are found in literature (Aman, Schieber & Carle, 2005; Dhuique-Mayer, Tbatou, Carail, Caris-Veyrat, Dornier & Amiot, 2007; Doering, Sotiriou-Leventis & Roth, 1995; Kuki, Koyama & Nagae, 1991; Rios, Borsarelli & Mercadante, 2005).

On the contrary, the effect of acid on carotenoids was reported in fewer studies. Carotenoids were found to be mono and diprotonated by nitric acid and moderately strong acids, such as trichloroacetic and trifluoroacetic acids (Mortensen & Skibsted, 2000). Organic acids liberated during the processing of fruit juices are strong enough to promote rearrangements of 5,6-epoxide groups to 5,8-furanoid groups of carotenoids (Assunção & Mercadante, 2003a; Dhuique-Mayer et al., 2007; Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia, 2007a).

In a food system, the mechanisms involved in the nutrient degradation are complex, and therefore, insights into the mechanism of carotenoid thermal degradation can be derived from model systems, which are more easily controlled than foods and the formation of initial, intermediate, and final compounds can be more easily monitored (Mercadante, 2008a). In addition, considering that *cis* isomers are expected to be formed, analysis should be done by high performance liquid chromatography (HPLC) connected at least to a photodiode array detector

(PDA). The carotenoid separation should be carried out on a C₃₀ column, since among reversed-phase columns, the C₃₀ is the only one capable of resolving peaks of geometrical isomers at the same position but at opposite ends of asymmetrical carotenoids, such as β -cryptoxanthin (Emenhiser, Sander, & Schwartz, 1995; Mercadante, 2008b).

Thus, the objectives of this study were: (1) to separate and identify, by HPLC-PDA connected to mass spectrometry (MS/MS), the non-volatile degradation compounds derived from carotenoids during the heating of a simulated cashew apple juice; (2) to verify the influence of organic acid, at the same concentration as that found in a juice, on the carotenoid degradation; and (3) to indicate the main carotenoid thermal degradation pathways in such systems. In addition, for the first time, thermal degradation of β -cryptoxanthin in an aqueous-based system was evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples and standards

Red cashew apple fruits (*Anacardium occidentale* L.), from the Petrolina region (Pernambuco State, Northeast region, Brazil), were acquired in a supermarket in Campinas city (São Paulo State, Brazil), during their harvest season (October, 2006) and kept frozen at -18 °C until carotenoid extraction.

Standards of all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*- β -cryptoxanthin,

all-*trans*- β -carotene, 9-*cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- α -carotene, β -apo-8'-carotenal, β -apo-10'-carotenal, and β -apo-12'-carotenal were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland), with purities ranging from 95.0 to 99.9 %, as determined by HPLC-PDA.

2.2. Simulated cashew apple juice

The carotenoids were extracted with acetone, transferred to petroleum ether/diethyl ether, saponified overnight at room temperature with 10% methanolic KOH, followed by alkali removal and concentration in a rotary evaporator (< 35 °C). Due to the high oil content in the cashew apple peel, it was necessary to physically remove the oil, as follows: prior to ether transference, the carotenoid extract was kept in the freezer at -18 °C for 2h, followed by filtration using cold glassware and washing with cold acetone (De Rosso & Mercadante, 2007a). The dried cashew apple carotenoid extract was flushed with nitrogen (99.0 %) and kept at -35 °C.

The cashew apple extract, containing about 200 μ g carotenoid in 5 mL of ethanol, was added to 25 mL of Milli-Q water (Millipore, Billerica, USA) acidified at pH 3.8 with ca. 300 μ L of 0.5 M citric acid (simulated juice). The acid concentration allowed the addition of less than 1% of the total system volume to achieve the pH value found in commercial cashew apple juice.

The simulated cashew apple juice was distributed in glass tubes, sealed and heated for 1, 2, and 4 h at 60 °C and 90 °C in a water bath. After each time, tubes were taken from the bath and immediately cooled in current water.

In order to confirm whether the thermal degradation compounds were derived from β -cryptoxanthin or β -carotene, 100 μ g of synthetic *all-trans*- β -cryptoxanthin was used to elaborate systems as described above, with and without acid. These systems were monitored by HPLC-PDA-MS/MS and by a UV-visible diode array spectrophotometer (Agilent, model 8453, Palo Alto, USA). In addition, UV-vis spectra of the β -cryptoxanthin acidified system were recorded at room temperature during 120 min.

2.3. Carotenoid analysis in the simulated juice

The carotenoids were exhaustively extracted from the simulated juice with ethyl acetate, by vortexing (Phoenix, model AP 56, Araraquara, Brazil) during 1 min. The organic phases were transferred to a separatory funnel, washed with water until neutral pH, and dried under a N_2 stream. Prior to HPLC-PDA-MS/MS analysis, the carotenoid extract was completely solubilized in methanol/methyl *tert*-butyl ether (MeOH/MTBE) (70:30) and filtered through Millipore membranes (0.22 μ m).

The carotenoids were analyzed in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) equipment connected in series to a PDA detector (Shimadzu, model SPD-M20A) and a mass spectrometer with an ion-trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source from Bruker Daltonics, model Esquire 4000 (Bremen, Germany). The UV-visible spectra were obtained between 250 and 600 nm, and the chromatograms were processed at 286, 347, and 450 nm. The MS

parameters were set as previously reported (De Rosso & Mercadante, 2007a). For all samples, carotenoid separation was carried out on a C₃₀ YMC column (3 µm, 250 x 4.6 mm id.) (Waters, Wilmington, USA) using as mobile phase a linear gradient of MeOH/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, to 50:50 in 20 min. To verify the presence of degradation compounds with low molecular weight which may elute in the dead volume using the mobile phase described above, another linear gradient of MeOH/MTBE/H₂O from 85:5:10 to 95:5:0 in 30 min, to 89:11:0 in 25 min, to 75:25:0 in 40 min, to 50:50:0 in 60 min was used. Independent of the mobile phase, the flow rate was set at 0.9 mL/min and column temperature was kept at 22 °C.

The carotenoids were identified considering the combined information obtained from the following parameters: elution order on the C₃₀ HPLC column, co-chromatography with authentic standards, UV-visible spectrum characteristics (λ_{max} , spectral fine structure (% III/II), and *cis* peak intensity (% A_B/II)), and mass spectrum (molecular ion and fragments) compared to standards and data available in the literature (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007a, 2007b; Enzell & Back, 1995; Mercadante, Steck, & Pfander, 1999).

The carotenoids were quantified using external calibration curves for all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*- β -cryptoxanthin, all-*trans*- β -carotene, and all-*trans*- α -carotene with a minimum of five concentration levels. Neoxanthin, neochrome, antheraxanthin, mutatoxanthin, *cis*-violaxanthin, luteoxanthin, and auroxanthin were quantified using the curve of lutein; the β -cryptoxanthin epoxides,

12'-apo- β -carotenal, using the curve of all-*trans*- β -cryptoxanthin; α -cryptoxanthin and zeinoxanthin by the curve of all-*trans*- α -carotene; β -carotene epoxides by the curve of all-*trans*- β -carotene; and the *cis*-isomers of lutein, β -cryptoxanthin and β -carotene using the curve of the corresponding all-*trans*-isomers. Total carotenoid content was calculated considering all identified peak areas.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of carotenoids

The carotenoids separated in all systems were identified based on the combined information obtained from chromatographic elution, co-chromatography with standards, UV/visible and mass spectra characteristics (Table 1). Since a detailed description of carotenoid identification using the above information was already reported by De Rosso and Mercadante (2007a, 2007b), only considerations regarding the carotenoids not identified in the previous reports were discussed below.

Peak 1 was identified as 12'-apo- β -caroten-12'-al, considering the lack of spectral fine structure and λ_{max} at 423 nm, early elution order (7.8 min), protonated molecule at m/z 351, and co-elution with authentic standard. The MS/MS spectrum showed fragments at m/z 333, due to the loss of water from the protonated molecule, and at m/z 227 resulting from the combined elimination of water and xylene. The 12'-apo- β -caroten-12'-al was detected in both simulated cashew apple juice and all-*trans*- β -cryptoxanthin systems only after 1h of heating at 90 °C,

suggesting that this apocarotenoid derived from the thermal degradation of all-*trans*- β -cryptoxanthin (peak 18).

Peak 4 was identified as auroxanthin by its characteristic λ_{max} and high spectral fine structure and protonated molecule at m/z 601. The second order tandem MS spectrum showed fragments due to consecutive losses of one (583 u), two (565 u), and three (547 u) water molecules, elimination of toluene (509 u), and toluene plus water (491 u). The presence of an epoxide and/or furanoid group in a 3-hydroxy- β -ring was confirmed by the presence of a fragment at m/z 221.

Antheraxanthin (peak 7) was identified considering the UV-visible and the highest intensity of the protonated molecule ion (585 u) as compared to that from the loss of water (567), as observed in the MS of zeaxanthin. As cited above for auroxanthin, the presence of an epoxide and/or furanoid group in a 3-hydroxy- β -ring was confirmed by the fragment at m/z 221. Peak 8 showed the same MS features as peak 7, but an hypsochromic shift of 20 nm, being identified as mutatoxanthin.

Table 1

Chromatographic, UV-Vis and mass spectra characteristics of carotenoids detected in the β -cryptoxanthin system and in the simulated cashew apple juice

peak ^a	carotenoids	t _R range (min) ^b	λ_{max} (nm) ^c	III/II (%)	A _B /II (%)	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	12'-apo- β -caroten-12'-al	7.8-7.8	421-423	0	0	351	333 [M + H - 18], 295, 227 [M + H - 18 - 106], 209, 177, 119
2	cis-neoxanthin	8.4-8.4	326, 415, 437, 468	72	0	601	583 [M + H - 18], 565 [M + H - 18 - 18], 547 [M + H - 18 - 18 - 18], 509 [M + H - 92], 221
3	neochrome	9.6-10.0	399, 421, 447	80	0	601	583 [M + H - 18], 565 [M + H - 18 - 18], 547 [M + H - 18 - 18 - 18], 221
4	auroxanthin	11.1-11.7	380, 401, 425	99	0	601	583 [M + H - 18], 565 [M + H - 18 - 18], 547 [M + H - 18 - 18 - 18], 509 [M + H - 92], 491 [M + H - 18 - 92], 221
5	cis-violaxanthin	12.2-12.3	326, 411, 434, 463	64	24	601	583 [M + H - 18], 565 [M + H - 18 - 18], 509 [M + H - 92], 491 [M + H - 18 - 92], 221
6	luteoxanthin – type carotenoid	12.1-12.8	396-400, 417-423, 442-443	30-60	0	601	583 [M + H - 18], 509 [M + H - 92], 491 [M + H - 18 - 92], 221
7	antheraxanthin	13.1-13.9	419-426, 443-445, 469-472	25	0	585	567 [M + H - 18], 549 [M + H - 18 - 18], 493 [M + H - 92], 221
8	mutatoxanthin	14.1-15.2	405, 426, 451	40	0	585	567 [M + H - 18], 549 [M + H - 18 - 18], 493 [M + H - 92], 221

Cont. Table 1

Chromatographic, UV-Vis and mass spectra characteristics of carotenoids detected in the β -cryptoxanthin system and in the simulated cashew apple juice

peak ^a	carotenoids	tR range (min) ^b	λ_{max} (nm) ^c	III/II (%)	AB/II (%)	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
9	all- <i>trans</i> -lutein	14.6-15.4	420, 444, 472	60	0	569	551 [M + H - 18], 533 [M + H - 18 - 18]
10	<i>cis</i> -lutein	14.9-15.5	330-332, 415-417, 435-439, 467-469	n.c. ^d	0	569	551 [M + H - 18], 533 [M + H - 18 - 18]
11	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	15.6-16.7	424, 449, 472	20	0	569	551 [M + H - 18], 533 [M + H - 18 - 18]
12	5,6-epoxy- β - cryptoxanthin	16.9-17.9	420, 444, 470	n.c.	0	569	551 [M + H - 18], 533 [M + H - 18 - 18], 463 [M + H - 106], 221
13	15- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^f	16.5-18.0	337, 420, 447, 477	12	55	553	535 [M + H - 18], 497 [M + H - 56], 461 [M + H - 92]
14	13- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^g	18.1-19.2	337, 418, 442, 468	13	46	553.	535 [M + H - 18], 497 [M + H - 56], 461 [M + H - 92], 339
15	13'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin	18.5-19.6	337, 418, 443, 470	13	48	553	535 [M + H - 18], 497 [M + H - 56], 461 [M + H - 92], 339
16a	phytofluene	19.6-20.7	331, 347, 367	94	n.de.	543	461, 406 [M + H - 137], 338 [M + H - 205]
16b	zeinoxanthin	19.6-20.7	418, 444, 472	60	n.d.	553	535 [M + H - 18]
17	all- <i>trans</i> - α -cryptoxanthin	22.0-22.8	420, 442, 470	60	0	553	535 [M + H - 18]
18	all- <i>trans</i> - β -cryptoxanthin	23.4-24.8	421, 451, 477	20	0	553	535 [M + H - 18], 495, 461 [M + H - 92]
19a	phytofluene	25.2-25.8	332, 347, 367	55	0	543	461, 406 [M + H - 137], 338 [M + H - 205]

Cont. Table 1

Chromatographic, UV-Vis and mass spectra characteristics of carotenoids detected in the β -cryptoxanthin system and in the simulated cashew apple juice

peak ^a	carotenoids	tR range (min) ^b	λ_{max} (nm) ^c	III/II (%)	AB/II (%)	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
19b	15- <i>cis</i> - β -carotene	25.2-25.8	337, 420, 449, 470	10	60	537	444 [M - 92]
20	5,8-epoxy- β -carotene	25.8-26.5	403, 429, 451	n.c.	0	553	535 [M + H - 18], 461 [M + H - 92], 205
21	13- <i>cis</i> - β -carotene	26.1-27.5	337, 420, 444, 470	17	50	537	481 [M + H - 56], 444 [M - 92]
22	9- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^h	27.1-28.1	339, 420, 445, 471	20	15	553	535 [M + H - 18], 460 [M - 92]
23	9'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^h	27.7-28.6	339, 420, 445, 471	28	12	553	535 [M + H - 18], 460 [M - 92]
24	all- <i>trans</i> - α -carotene	28.2-29.6	420, 445, 473	55	0	537	481 [M + H - 56], 444 [M - 92]
25	all- <i>trans</i> - β -carotene	33.0-34.5	421, 451, 478	25	0	537	444 [M - 92]
26	9- <i>cis</i> - β -carotene	35.6-37.2	338, 427, 447, 472	25	21	537	444 [M - 92]

^a numbered according to Figures 1 and 2.

^b retention time on the C₃₀ column.

^c linear gradient of MeOH/MTBE.

^d not calculated

^e not detected.

^f Tentatively identified as 15-*cis*- β -cryptoxanthin or 15'-*cis*- β -cryptoxanthin.

^g Tentatively identified as 13-*cis*- β -cryptoxanthin or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin.

^h Tentatively identified as 9-*cis*- β -cryptoxanthin or 9'-*cis*- β -cryptoxanthin.

3.2. Effect of heating and acid addition on β -cryptoxanthin degradation in an aqueous-based system

Figure 1 presents the chromatograms obtained for non-heated and heated synthetic all-*trans*- β -cryptoxanthin systems.

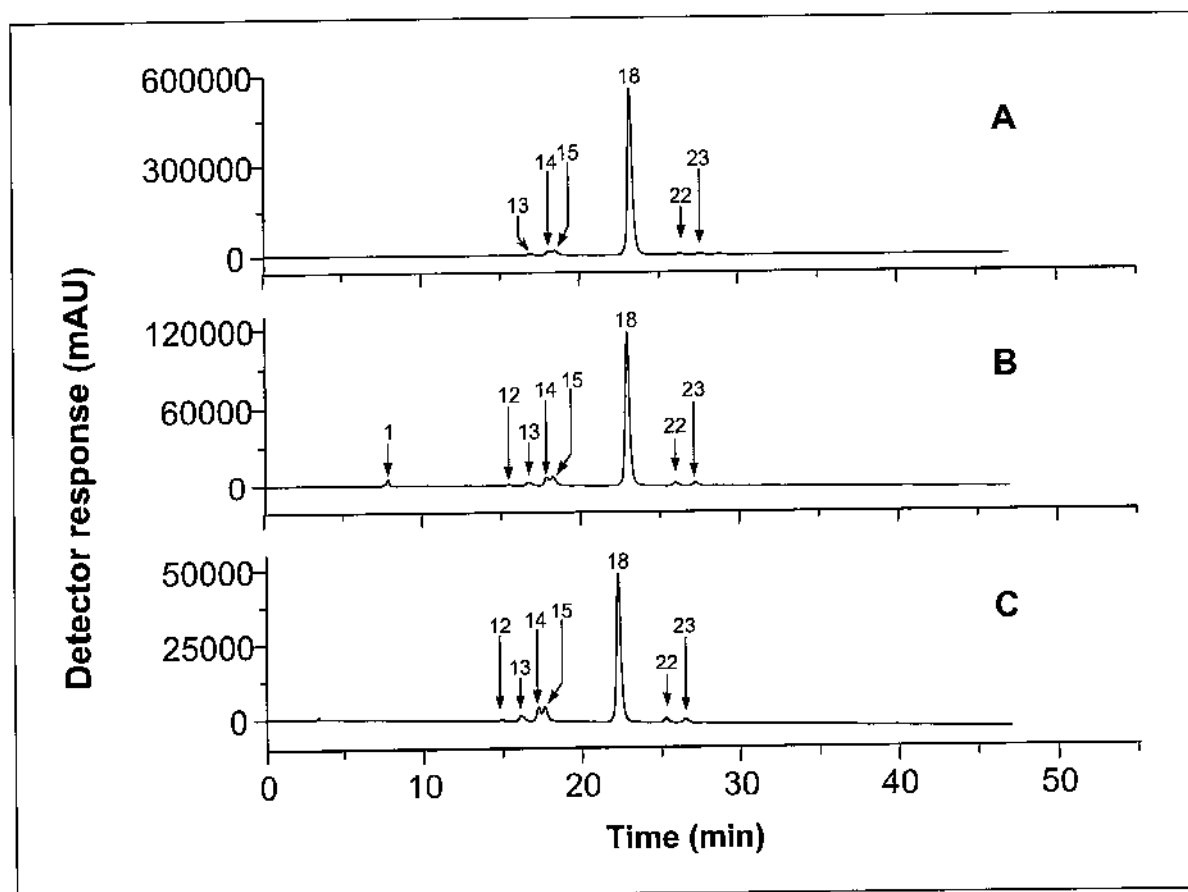


Fig. 1. Chromatogram processed at 450 nm, obtained by HPLC-PDA-MS/MS, of the synthetic β -cryptoxanthin in an aqueous-based acidified system, unheated (A), after 1 h heated at 90 °C (B), and after 2 h heated at 90 °C (C). See text for chromatographic conditions, peak characterization is given in Table 1.

The initial systems were found to contain 94.7% of *all-trans*- β -cryptoxanthin, along with 5 isomers in small amounts (5.3%), as shown in Table 2.

Table 2

Carotenoid changes ($\mu\text{g/mL}$) in β -cryptoxanthin systems heated at 90 °C

carotenoids	unheated system ^a	non-acidified heated system ^a		acidified heated system ^a	
		1 h	2 h	1 h	2 h
12'-apo- β -caroten-12'-al	n.d. ^b	1.5 $\pm$ 0.4	n.d.	1.6 $\pm$ 0.5	n.d.
5,6-epoxy- β -cryptoxanthin	n.d.	1.3 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.3
15- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^c	0.8 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.2
13- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^d	1.3 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.3
13'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^d	1.4 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.4
<i>all-trans</i> - β -cryptoxanthin	94.8 $\pm$ 2.0	54.2 $\pm$ 1.4	26.2 $\pm$ 1.3	57.2 $\pm$ 1.8	27.6 $\pm$ 2.1
9- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^e	0.9 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.3
9'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^e	0.9 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.4
total	100.1 $\pm$ 0.9	71.7 $\pm$ 2.0	45.2 $\pm$ 0.6	75.1 $\pm$ 0.6	46.0 $\pm$ 2.5

^a Mean and standard deviation of two independent experiments.

^b n.d. not detected.

^c Tentatively identified as 15-*cis*- β -cryptoxanthin or 15'-*cis*- β -cryptoxanthin.

^d Tentatively identified as 13-*cis*- β -cryptoxanthin or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin.

^e Tentatively identified as 9-*cis*- β -cryptoxanthin or 9'-*cis*- β -cryptoxanthin.

In the non-acidified system, the total amounts of *cis* isomers increased from 5.3 to 14.7 $\mu\text{g/mL}$ and further to 17.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively, after 1 and 2 h of heating at 90 °C. As a result of citric acid addition to the system, similar amounts of

cis isomers of β -cryptoxanthin were detected, namely 14.9 $\mu\text{g/mL}$ after 1 h and 16.1 $\mu\text{g/mL}$ after 2 h heating. Di-*cis* isomers of β -cryptoxanthin were not detected in these systems.

Two oxidation compounds (peaks 1 and 12, Figure 1), not previously detected in the unheated system, were formed in small amounts after heating all-*trans*- β -cryptoxanthin in both non- and acidified systems at 90 °C (Table 2). Although the levels of 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin increased with heating time, especially in the acidified system, the amount of citric acid added was not strong enough to induce epoxy to furanoid rearrangement. In fact, the detection of 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin in this system after 2 h of heating is surprising, considering that 5,6-epoxides of carotenoids are easily rearranged to their corresponding 5,8-furanoids during thermal processing of foods (Dhuique-Mayer et al., 2007; Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia, 2007b) and that small amounts of 5,8-epoxy- β -cryptoxanthin were detected in some cashew apple processed products (Assunção & Mercadante, 2003a). Di-epoxides of β -cryptoxanthin were not detected. The apocarotenoid, 12'-apo- β -carotenal, was only formed after heating at 90 °C for 1 h; however, it was not detected anymore after 2 h of heating. Other apocarotenoids with lower molecular weight or higher polarity containing the 3'-hydroxy β -end-group of β -cryptoxanthin were not detected, although another mobile phase with water was used (chromatogram not shown).

In addition, in the present study, a high stability of all-*trans*- β -cryptoxanthin was observed in a system at room temperature in the presence of citric acid. The

absorptions in red (700 nm) and near red infrared (950 nm) regions, corresponding respectively to mono and diprotonated carotenoids (Mortensen & Skibsted, 2000), were not observed (Figure 2S from Supplementary Data). This fact was not a surprise, since only strong and moderately strong acids, such as nitric and trifluoroacetic acids, were able to form protonated carotenoids (Mortensen & Skibsted, 2000). When all-*trans*- β -cryptoxanthin was heated in a non-acidified system at 90 °C, a decrease was also observed in the visible region at 440-520 nm with concomitant formation of soft coloured products in the near visible (~ 400 nm) and non-coloured compounds at UV region (< 360 nm) (inset of Figure 3S from Supplementary Data). These facts clearly indicated that heat was responsible for the major route of all-*trans*- β -cryptoxanthin degradation in an aqueous-based system.

Since similar quali and quantitative carotenoid profiles were found in both systems, with the absence and presence of citric acid in a similar concentration as that found in commercial tropical fruit juices, addition of acid did not affect the type of compounds formed during thermal degradation of all-*trans*- β -cryptoxanthin. In addition, the results from Table 2 showed that heating all-*trans*- β -cryptoxanthin for 60 min yielded the same *trans/cis* ratio values, 79:21, in non-acidified and acidified systems. Further heating for 120 min changed this isomeric proportion to 60:40 in non-acidified and to 63:37 in acidified systems.

Taking into account the structures of the thermal degradation products formed in both β -cryptoxanthin heated aqueous systems, isomerization from *trans*

to *cis* configurations, epoxidation and cleavage were the main degradation reactions observed in the present study (Figure 2).

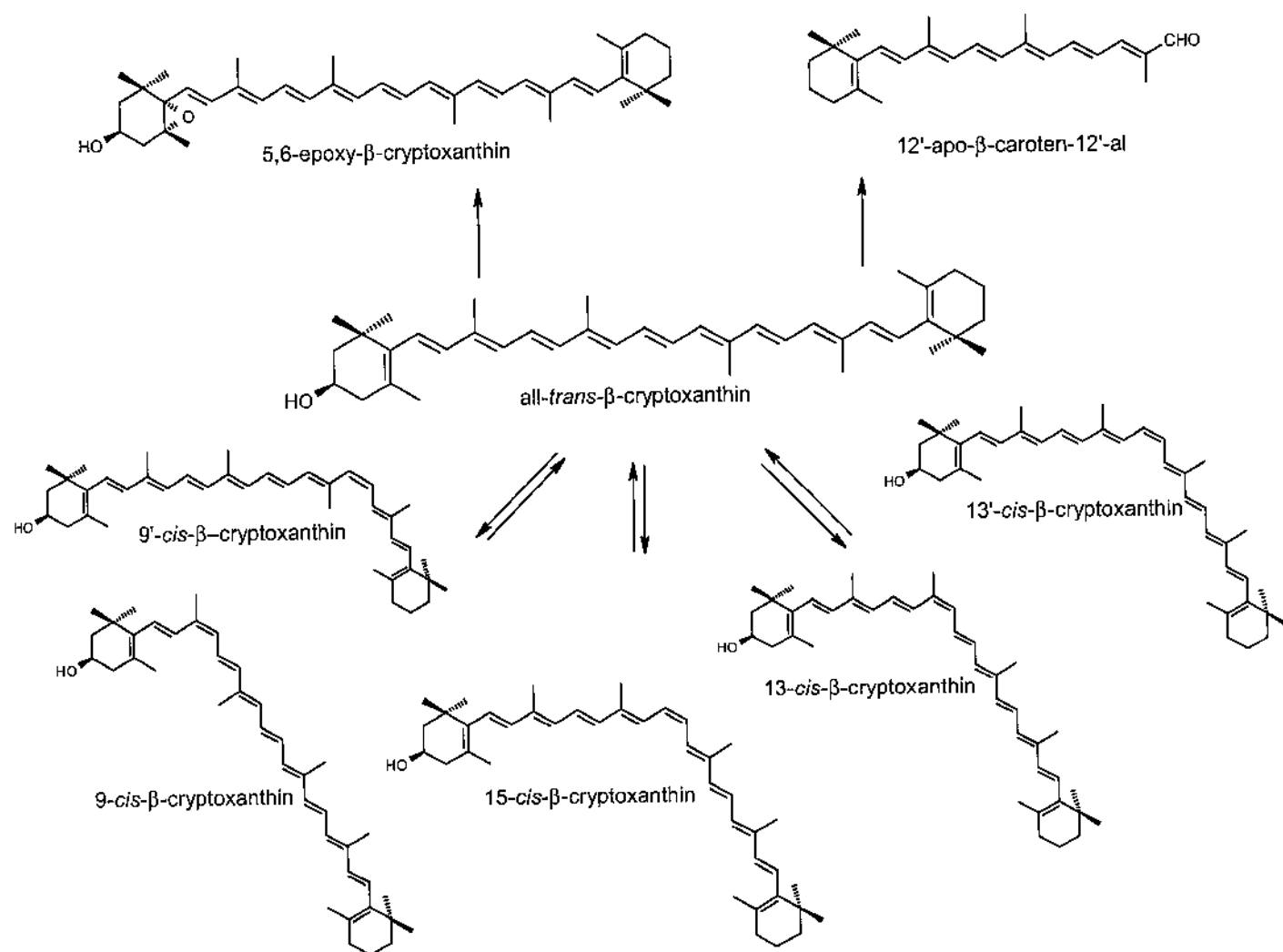


Fig. 2. Proposed mechanism for thermal degradation of all-*trans*- β -cryptoxanthin to coloured compounds in aqueous-based systems.

Moreover, degradation to non-coloured compounds was also observed since the amounts of β -cryptoxanthin degraded was not compensated by the

amounts of products formed (Table 2). In fact, Kanasawud and Crouzet (1990) proposed a reaction mechanism with mono- and di-epoxides of β -carotene as intermediates for formation of carotenoid-derived volatiles from β -carotene in a heated aqueous medium.

The predominant *cis* isomers formed were 13-*cis*- + 13'-*cis*- β -cryptoxanthin, 7.0 and 7.3%, followed by smaller amounts of 9-*cis*- + 9'-*cis*- isomers (5.3 and 5.9%) and 15-*cis*- or 15'-*cis*- β -cryptoxanthin (2.9 and 3.1%), respectively in non- and acidified aqueous systems after heating for 1 h at 90 °C (Table 2). The predominance of β -cryptoxanthin isomers with *cis* double bonds closer to the molecule centre is explained by the lower activation energy for *trans* to *cis* isomerization about the central double bond as compared to those about the other double bonds, as previously reported for β -carotene (Zechmeister, 1944).

3.3. Influence of heating on carotenoid degradation in a simulated cashew apple juice

The impact of thermal treatment on the composition of carotenoids in a simulated cashew apple juice can be seen in Figure 3 and Table 3. In general, as expected, the levels of all-*trans* carotenoids decreased with concomitant increased amounts of *cis* isomers and oxidation products, as time and heating temperature increased. Moreover, breakdown non-coloured compounds were also formed since the increased levels of *cis* isomers and oxidation compounds did not compensate losses of total carotenoid contents.

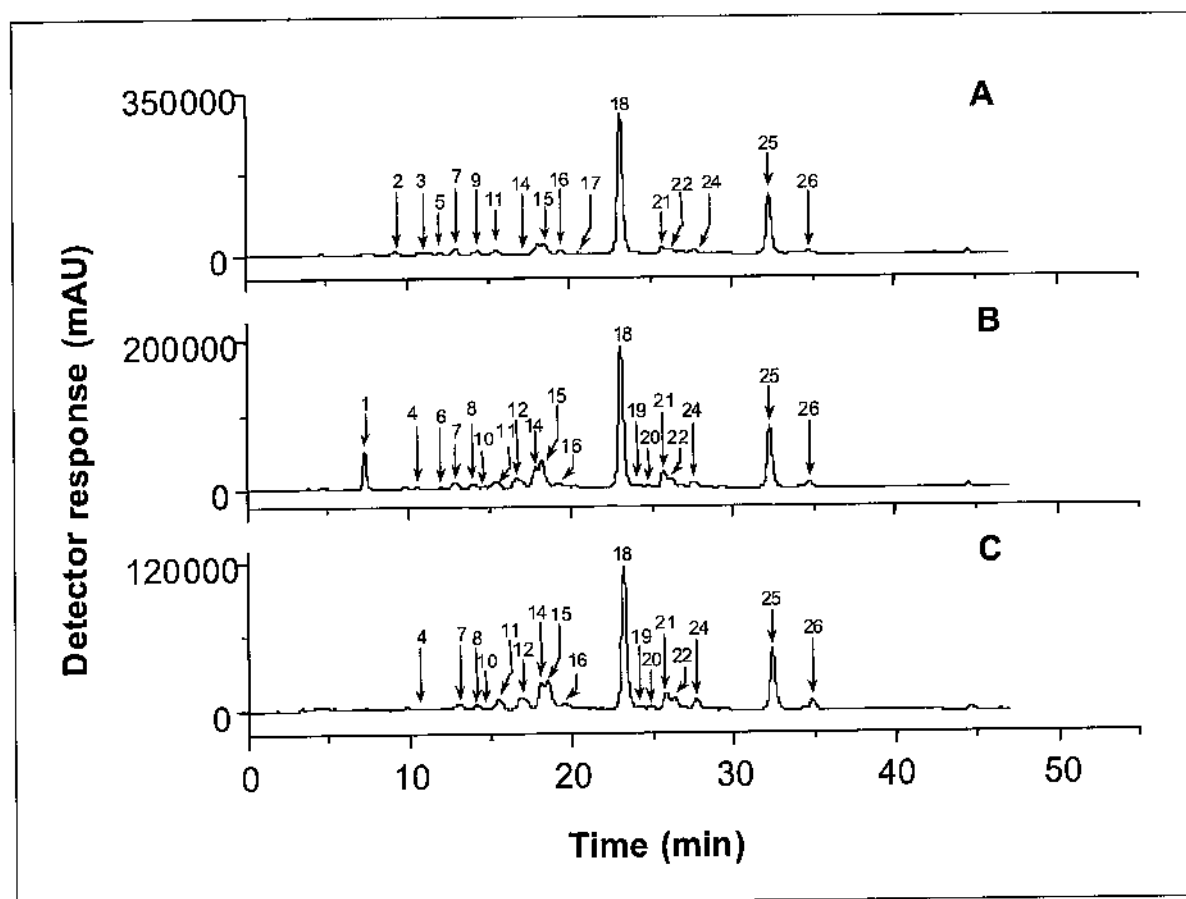


Fig. 3. Chromatogram processed at 450 nm, obtained by HPLC-PDA-MS/MS, of carotenoids from simulated cashew apple juice, unheated (A), after 1 h heated at 90 °C (B), and after 4h heated at 90 °C (C). See text for chromatographic conditions, peak characterization is given in Table 1.

A total of 19 different carotenoids were separated in the simulated cashew apple juice not submitted to heat (Figure 3A), all-*trans*- β -cryptoxanthin was the major carotenoid (57.7%), followed by all-*trans*- β -carotene (22.1%). As a consequence of the heat treatment at both 60 and 90 °C, *cis*-neoxanthin, neochrome, *cis*-violaxanthin, lutein and all-*trans*- α -cryptoxanthin disappeared,

whereas two *cis* isomers (*cis*-lutein and 15-*cis*- β -carotene) and four epoxide-derivatives (auroxanthin, mutatoxanthin, 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin and 5,8-epoxy- β -carotene) were formed (Table 3). Additional luteoxanthin and one short-chain product 12'-apo- β -carotenal were only formed at 90 °C (Table 3, Figure 3B).

These facts indicated that the geometric isomerization and formation of oxidation compounds already observed in the β -cryptoxanthin systems also occurred for the major carotenoids in the simulated cashew apple juice. However, epoxy-furanoid rearrangement was verified to occur in the simulated cashew apple juice at both heating temperatures. Despite the high number of stereoisomers of β -carotene and β -cryptoxanthin that can be formed by heating, our experiments confirmed that the 13-*cis*- isomers of both carotenoids were preferentially formed, as previously reported (Dhuique-Mayer et al., 2007; Doering et al., 1995; Kuki et al., 1991; Mercadante, 2008a).

Similar *trans/cis* ratio values were found for β -cryptoxanthin and β -carotene in all the simulated cashew apple juice systems, changing respectively from 93:7 to 80:20 and from 92:8 to 79:21 after 1 h of heating at 90°C. Further heating for 4 h changed the ratio values to 68:32 for β -cryptoxanthin and 69:31 for β -carotene.

Table 3

Carotenoid changes (µg/mL) in simulated cashew apple juice during heating

carotenoid	unheated ^a	60 °C ^a		90 °C ^a	
		1 h	4 h	1 h	4 h
12'-apo-β-caroten-12'-al	n.d. ^b	n.d.	n.d.	3.0±0.3	n.d.
cis-neoxanthin	2.1±1.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
neochrome	1.2±0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
auroxanthin	n.d.	0.3±0.4	0.4 ±0.3	1.0±0.4	0.9±0.3
cis-violaxanthin	3.4±0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
luteoxanthin-type carotenoid	n.d.	n.d.	n.d.	0.9±0.2	n.d.
antheraxanthin	2.8±0.7	3.0±0.4	2.5 ±0.5	2.9±0.6	3.0 ±0.5
mutatoxanthin	n.d.	n.d.	0.8 ±0.4	1.0±0.2	0.6±0.4
lutein	2.0±0.5	1.6±0.4	n.d.	n.d.	n.d.
cis-lutein	n.d.	n.d.	0.6±0.5	0.7±0.2	0.8±0.3
zeaxanthin	1.7±0.5	1.5±0.7	1.3±0.2	1.3±0.2	1.1±0.3
5,6-epoxy-β-cryptoxanthin	n.d.	2.3±0.3	2.4±0.8	2.0±0.3	4.5±0.8
13-cis-β-cryptoxanthin ^c	1.9±0.4	2.7±0.6	3.0±0.6	4.1±0.9	4.6±0.5
13'-cis-β-cryptoxanthin ^c	1.6±0.7	2.4±0.8	3.8±0.8	3.4±1.0	4.8±0.4
zeinoxanthin	0.7±0.4	0.6±0.3	0.5±0.6	0.9±0.4	0.9±0.4
all-trans-α-cryptoxanthin	0.4 ±0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
all-trans-β-cryptoxanthin	61.4±2.5	50.0±2.0	36.3±1.8	40.5±2.0	25.5±1.8
15-cis-β-carotene	n.d	0.5±0.3	0.6±0.7	0.6±0.3	0.9±0.3
5,8-epoxy-β-carotene	n.d	0.4±0.6	0.6±0.5	0.6±0.3	1.1±0.3
13-cis-β-carotene	1.3±0.4	2.5±0.5	2.8±0.5	2.1±0.5	2.5±0.5
9-cis-β-cryptoxanthin ^d	1.0±0.4	2.3±0.3	2.1±0.6	2.4±0.3	2.6±0.6
9'-cis-β-cryptoxanthin ^d	n.d.	n.d.	1.0±0.8	n.d.	n.d.
α-carotene	0.6±0.3	0.4±0.3	0.5±0.5	0.4±0.3	0.5±0.5
all-trans-β-carotene	23.5±1.6	20.3±0.6	14.1±1.4	17.0±0.6	12.0±1.4
9-cis-β-carotene	0.8±1.7	0.9±0.3	1.1±0.3	1.7±0.3	2.1±0.3
total	106.4±3.8	91.7±1.98	74.4±3.2	86.5±4.8	68.4±5.6

^a Mean and standard deviation of two independent experiments.

^b n.d. not detected.

^c Tentatively identified as 13-cis-β-cryptoxanthin or 13'-cis-β-cryptoxanthin.

^d Tentatively identified as 9-cis-β-cryptoxanthin or 9'-cis-β-cryptoxanthin.

Heating at both temperatures also caused loss of lutein, along with formation of *cis*-lutein. Violaxanthin thermal degradation followed the epoxy-furanoid rearrangement, through two sequential transformations of 5,6-epoxy to 5,8-furanoid end-groups, giving rise respectively to luteoxanthin and auroxanthin. It is known that violaxanthin easily undergoes this type of rearrangement, based on the example of the reported losses of 46.4% of violaxanthin and 19.7% of *cis*-violaxanthin after pasteurization of Valencia orange juice (Lee & Coates, 2003). In addition, violaxanthin was found in fresh cashew apples; however, in commercially processed cashew juice, violaxanthin was not detected while auroxanthin, not present in the fruits, appeared at a detectable level, due to the conversion of the 5,6-epoxide groups of violaxanthin to the 5,8-furanoid groups of auroxanthin (Assunção & Mercadante, 2003a, 2003b).

Since neochrome was the only 5,8-epoxide found in unheated systems, probably the epoxy-furanoid rearrangement of *cis*-neoxanthin had already occurred during extraction or system preparation. It is interesting to note that in twenty-two of twenty-five genotypes of orange, whenever neoxanthin was found, neochrome was also detected (Fanciullino, Dhuique-Mayer, Luro, Casanova, Morillon & Ollitrault, 2006).

In summary, the overall results show losses of non-detected low molecular weight degradation compounds, isomerization of *trans* to *cis*-configuration, accompanied by epoxide to furanoid rearrangement and formation of oxidation compounds during carotenoid heating in aqueous-based systems. All reactions

were induced mainly by heat in both synthetic β -cryptoxanthin and simulated cashew juice systems. It is important to consider that in the fruit, carotenoids are part of a much more complex system, and are in close proximity to other components such as protein and lipids, frequently in organized and ordered structures such as membranes and vesicles (Britton, 1995). However, heat treatment can facilitate the interaction between acids and carotenoids in the real juice.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Brazilian Funding Agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for its financial support.

REFERENCES

- Abir, Associação brasileira das indústrias de refrigerantes e bebida não alcoólicas. www.abir.org.br. accessed on 12/11/2008.
- ACNielsen, Arthur Charles Nielsen (2008). www.acnielsen.com.br. accessed on 12/11/2008.
- Aman, R., Schieber, A., & Carle, R. (2005). Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomeration and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9512-9518.

- Assunção, R. B., & Mercadante, A. Z. (2003a). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 647-657.
- Assunção, R. B., & Mercadante, A. Z. (2003b). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81, 495-502.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*, 9, 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids Handbook. Basel: Birkhäuser.
- Caris-Veyrat, C. (2008). Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. 177-192). Boca Raton: CRC Press.
- Cooper, D. A. (2004). Carotenoids in health and disease: Recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*, 134, 221S-224S.
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007a). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062-5072.

- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007b). HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9135-9141.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., & Amiot, M. J. (2007). Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4209-4216.
- Doering, W. von E., Sotiriou-Leventis, C., & Roth, W. R. (1995). Thermal interconversions among 15-*cis*-, 13-*cis*-, and all-*trans*- β -carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-*trans*- β -carotene. *Journal of American Chemical Society*, 117, 2747-2757.
- Emenhiser, C., Sander L. C., & Schwartz, S. J. (1995). Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve *cis-trans* carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 707, 205-216.
- Enzell, C. R., & Back, S. (1995). Mass Spectrometry. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy (pp. 261-320). Basel: Birkhäuser.
- Fanciullino, A.-L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J, Morillon R., Ollitrault, P. (2006). Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4397-4406.

- Hurst, J. S., Saini, M. K., Jin, G.-F., Awasthi, Y. C., & van Kuijk, F. J. G. M. (2005). Toxicity of oxidized β -carotene to cultured human cells. *Experimental Eye Research*, 81, 239-243.
- Kanasawud, P., Crouzet, J. C. (1990). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 237-243.
- Kuki, M., Koyama, Y., & Nagae, H. (1991). Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-*trans*, 7-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*, and 15-*cis* isomers of β -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state. *Journal of Physical Chemistry*, 95, 7171-7180.
- Lee, H. S., & Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, 36, 153-156.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007a). Geometrical isomers of violaxanthin in orange juice. *Food Chemistry*, 104, 169-175.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007b). Carotenoids, color, and ascorbic acid content of a novel frozen-marketed orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1347-1355.
- Mercadante, A. Z. (2008a). Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. 213-240). Boca Raton: CRC Press.

- Mercadante, A. Z. (2008b). Analysis of carotenoids. In C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, (pp. 447-478). Boca Raton: CRC Press.
- Mercadante, A. Z., Steck, A., & Pfander, H. (1999). Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 145-151.
- Mortensen, A., & Skibsted, L. H. (2000). Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 279-286.
- Rios, A. de O., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2307-2311.
- Siems, W., Wieswedel, I., Salerno, C., Crifò, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C., & Sommerburg, O. (2005). β -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions potential side effects of high-dose β -carotene supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 385-397.
- Zechmeister, L. (1944). *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. *Chemical Reviews*, 34, 267-344.

CAPÍTULO 3

THERMAL DEGRADATION KINETICS OF CAROTENOIDS IN A CASHEW APPLE JUICE MODEL AND ITS IMPACT ON THE SYSTEM COLOR

Submetido para publicação na *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

ABSTRACT

The thermal degradation kinetics of the main carotenoids of cashew apple in a juice model system was studied and related to the changes of its CIELAB color parameters. Similar isomerization equilibrium constants and activation energies were operating for both all-*trans*- β -carotene and all-*trans*- β -cryptoxanthin. The curves for the decay of the main carotenoids and color changes showed a biphasic behaviour that was best fitted by a bi-exponential equation. For the same heating conditions (60 or 90 °C), similar rate constants for the fast (γ_1) and slow (γ_2) decays were obtained for both the chemical (carotenoids) and the physical (color) parameters monitored in the present research. This fact indicates that color parameters, such as (ΔE^*), are good predictors of both all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene thermal degradation. A mechanism for thermal carotenoid degradation was proposed, involving parallel irreversible and reversible coupled degradation reactions of both the initial all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene to yield, respectively, oxidation and/or breakdown compounds and mono-*cis* isomers.

KEY-WORDS: carotenoids; color; kinetics; thermal degradation; cashew apple juice model; *Anacardium occidentale*.

INTRODUCTION

The *Anacardium occidentale* L. is a tropical tree native of the North and Northeast regions of Brazil. Its pseudo-fruit, known as cashew apple, is very popular and highly consumed as ready-to-drink juice, concentrate, and nectar, among other thermally processed products.

As widely known, the thermal treatments usually applied to extend the shelf life of fruit products affect their quality, leading to consumer dissatisfaction. Pigment transformations are one of the major causes for such problems, since these compounds are usually responsible for the food color. Depending on the severity of the thermal treatment, the degradation of carotenoids, for instance, causes color changes in several fruit juices (1, 2). In cashew apple juice, due to the abundant presence of carotenoid pigments, notably β -cryptoxanthin and β -carotene (3), controlling such degradations is particularly important, as color is one of the most important attributes of the beverage.

The rate of pigment degradation depends on several conditions, such as medium composition, pH, temperature, UV exposure, and dissolved oxygen content (2, 4-6); therefore, the kinetics of pigment degradation is rather complex in food systems. Nonetheless, when pigment degradation resulting from thermal processing needs to be minimized, kinetics studies capable to determine parameters such as reaction order, constant rates, etc., are required, being equally important to establish the impact of the compounds' degradation on the food color.

Thus, the goals of this work were to determine the degradation kinetics of the cashew apple main carotenoids in a juice model heated at 60 and 90 °C, and to relate this degradation kinetic with mathematically predictive models associating CIELAB color parameters with heating time. For cashew apple products, this information is fundamental to predict quality loss resulting from thermal processes; nonetheless, it is rare to find it in related literature.

MATERIALS AND METHODS

Samples and standards. Red cashew apple fruits (*Anacardium occidentale* L.) from the Petrolina region (State of Pernambuco, Northeast region, Brazil) were acquired in a supermarket of the city of Campinas (State of São Paulo, Brazil), during their harvest season (October, 2006) and kept frozen at -18 °C until carotenoid extraction.

The carotenoid standards *all-trans*-lutein, *all-trans*-zeaxanthin, *all-trans*- β -cryptoxanthin, *all-trans*- β -carotene, and *all-trans*- α -carotene, with purity degree between 95 and 99 % determined by HPLC-PDA, were provided by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland).

Methanol (MeOH), methyl *tert*-butyl ether (MTBE), ethyl acetate (EtOAc), and acetonitrile for HPLC were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) or from Mallinckrodt Baker (Philipsburg, NJ). The other reagents were all of analytical grade from Labsynth (Diadema, Brazil). The distilled water was purified by a Milli-Q Plus system (Millipore, Billerica, MA). The carotenoid extracts and solvents were filtered through Millipore membranes (0.22 and 0.45 μ m) prior to their HPLC analysis.

Cashew apple juice model systems. The carotenoids were extracted with acetone, transferred to petroleum ether (b.p. 30-70 °C)/diethyl ether, saponified overnight at room temperature with 10% methanolic KOH, followed by alkali removal. Due to the high oil content in the cashew apple peel, it was necessary to

physically remove the oil, as follows: prior to ether transference, the carotenoid extract was kept in the freezer at -18 °C for 2h, followed by filtration using cold glassware and washing with cold acetone (7). The dried cashew apple carotenoid extract was flushed with pure N₂ (99.0 %) and kept at -35 °C.

The cashew apple extract, containing ca. 200 µg carotenoid, was first dissolved in 5 mL of ethanol, which was further added to 25 mL of Milli-Q water previously acidified at pH 3.8 with 0.5 M of citric acid (8).

The cashew apple juice model was distributed in sealed glass tubes and heated at 60 °C and 90 °C in a water bath at different heating times: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420, 480, and 540 min at 60 °C, and 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 120, 180, and 240 min at 90 °C. After each heating time, the tubes were removed from the water bath, immediately cooled under running tap water and analyzed. All samples, including the non-heated cashew apple juice model, were submitted to HPLC and color analysis as described below.

HPLC analysis. The carotenoids were exhaustively extracted from the juice model system with ethyl acetate, by vortexing during 1 min (Phoenix, model AP 56, Araraquara, Brazil); following that, the extract was transferred to a separation funnel, washed with water until neutral pH, and dried under N₂ stream. Prior to HPLC-PDA analysis, the carotenoid extract was completely solubilized in MeOH/MTBE (70:30) and filtered through Millipore membranes (0.22 µm).

The carotenoids were analyzed in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) equipped with

quaternary pumps (model LC-20AD), on-line degasser, and Rheodyne injection valve with a 20 μ L loop (Rheodyne LCC, Rohnert Park, CA). The equipment also included, connected in series, a PDA detector (Shimadzu, model SPD-M20A). For all samples, carotenoid separation was carried out on a C₃₀ YMC column (3 μ m, 250 x 4.6 mm id.) (Waters, Wilmington, MA) using as mobile phase, a linear gradient of MeOH/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, to 50:50 in 20 min at 0.9 mL/min.

The carotenoids were identified by HPLC-PDA and tandem mass spectrometry, as previously described (8). The carotenoids were quantified by HPLC, using external calibration curves for *all-trans*-lutein, *all-trans*-zeaxanthin, *all-trans*- β -cryptoxanthin, *all-trans*- β -carotene, and *all-trans*- α -carotene with a minimum of five concentration levels. Neoxanthin, neochrome, antheraxanthin, mutatoxanthin, *cis*-violaxanthin, luteoxanthin, and auroxanthin were quantified using the curve of lutein; the β -cryptoxanthin epoxides, α -cryptoxanthin, and zeinoxanthin using the curve of *all-trans*- β -cryptoxanthin; β -carotene epoxides by the curve of *all-trans*- β -carotene; and the *cis* isomers of lutein, β -cryptoxanthin and β -carotene using the curve of the corresponding *all-trans*-isomers. Total carotenoid content was calculated considering all identified peak areas.

Color analysis. Color changes due to heating of the cashew apple juice model were quantified through CIELAB parameters (L^* , a^* , and b^*) obtained by a spectrophotometer (Hunter, model Color Quest XE, Reston, VA), equipped with

D65 as the light source, and using observation angle of 10°. Additionally, values of ΔE^* (total color difference), C^* (chrome) and h (hue) were calculated using the equations 1, 2 and 3, respectively.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$h = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

Statistical analysis. All experiments were performed in duplicate and the kinetic models were obtained by fitting the data on non-linear regression models using Microcal Origin™ 7.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Heating effect on carotenoid composition. Figure 1 shows the HPLC chromatogram profiles of the cashew apple juice model before and after 4 h of heat treatment at 90 °C.

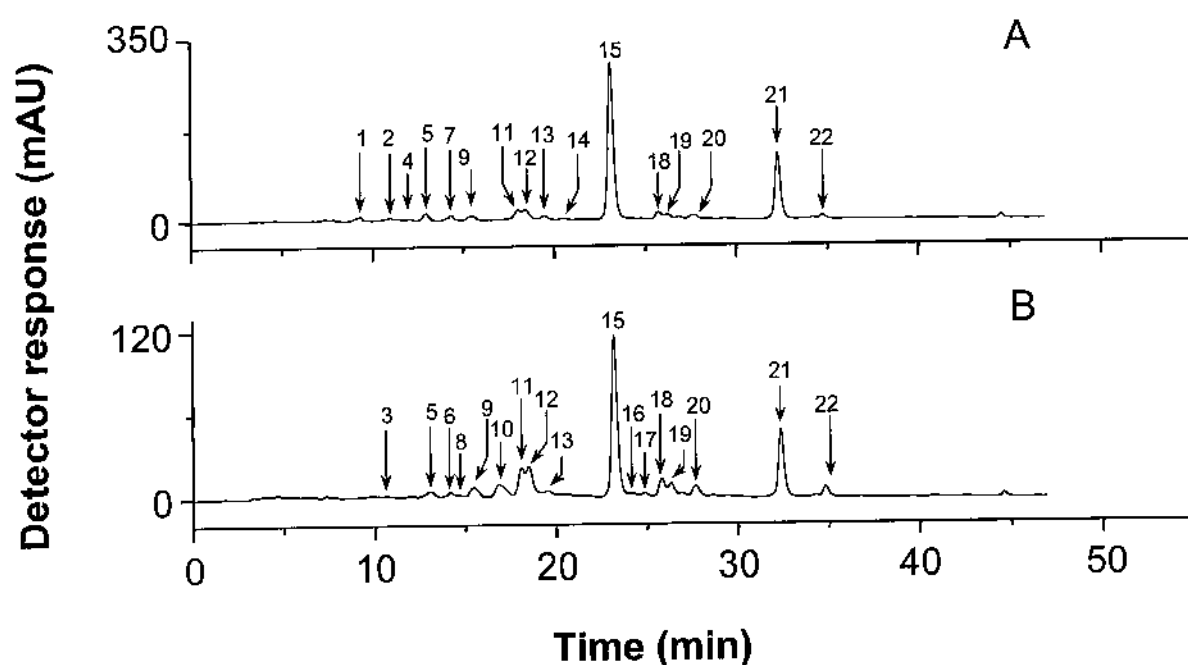


Figure 1. Chromatogram (processed at 450 nm), obtained by HPLC-PDA, of carotenoids from cashew apple juice model, (1A) unheated, (1B) 4 h heated at 90 °C. See text for chromatographic conditions. Peak identification according to increasing retention time: (1) *cis*-neoxanthin, (2) neochrome, (3) auroxanthin, (4) *cis*-violaxanthin, (5) antheraxanthin, (6) mutatoxanthin, (7) lutein, (8) *cis*-lutein, (9) zeaxanthin, (10) 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin, (11) 13-*cis*- β -cryptoxanthin or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin, (12) 13-*cis*- β -cryptoxanthin or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin, (13) zeinoxanthin, (14) all-*trans*- α -cryptoxanthin, (15) all-*trans*- β -cryptoxanthin, (16) 15-*cis*- β -carotene, (17) 5,8-epoxy- β -carotene, (18) 13-*cis*- β -carotene, (19) 9-*cis*- β -cryptoxanthin or 9'-*cis*- β -cryptoxanthin, (20) α -carotene, (21) all-*trans*- β -carotene, (22) 9-*cis*- β -carotene.

Before heating, at least sixteen carotenoids (total carotenoids) were identified, **Figure 1A**. The relative abundance of peaks indicated that all-*trans*- β -cryptoxanthin (57.4%) and all-*trans*- β -carotene (22.0%) were the main components, similar to those previously reported for cashew apple juice (3) and fresh fruits (9). The complementary ca. 20% was constituted by traces of other all-*trans* carotenoids (e.g. lutein, α -carotene, and zeaxanthin) and mono-*cis* isomers (mainly 9-, 9'-, 13-, or 13'-) of both β -cryptoxanthin and β -carotene.

After 4 h of heating at 90 °C, the HPLC analysis indicated a pronounced degradation of both main all-*trans*-carotenoids, accompanied by the increment of *cis* isomers (including 15-*cis*) and oxidation products, such as 5,6- epoxides and 5,8-furanoids, **Figure 1B**. However, degradation of the main all-*trans* carotenoids did not yield exclusively these isomerization and/or oxidation products, since the comparison of the total carotenoid contents before and after heating, at 60 °C for 9 h and at 90 °C after 4h, shows a loss of ca. 35% (**Table 1, Supporting Information**). The disappearance of carotenoids can be attributed to the generation of both volatile and low molecular weight compounds not detected by HPLC-PDA. In fact, recent CG-MS study involving the heating of cashew apple carotenoids reported the generation of more than 10 volatile compounds, including low molecular weight aromatic volatiles such as *p*-xylene, *p*-cymene, *p*-cresol and naphthalene, as well as non-aromatic volatiles such as *n*-dodecane and 1-tetradecene (10).

The initial overall isomeric *trans/cis* ratio of both β -cryptoxanthin and β -carotene was found to be ca. 92:8, changing to a stable value of 70:30 and 75:25 after 3 h and 8 h of heating at 90 °C and 60 °C, respectively. These results indicate that a steady-state equilibrium of β -cryptoxanthin and β -carotene isomers was reached in the cashew apple juice model after those conditions. In addition, the stable isomeric ratio of 65:35 reported for β -carotene standard diluted in toluene was achieved after 1 h heating at 98 °C (11). These results reveal that for the all-*trans* $\rightleftharpoons$ *cis* isomerization process, similar global equilibrium constant $K_{e,iso}$ and activation energy $E_{a,iso}$ are operating for both main carotenoids in aqueous solvent. By applying the isomeric percentage change between the initial ($t = 0$) and the final ($t = \infty$) time, an estimation of $K_{e,iso} \approx 0.50$ at 90 °C and $K_{e,iso} \approx 0.17$ at 60 °C were obtained.

Heating effect on color parameters. As shown in **Figure 2**, the thermal treatment of the juice model reduced the redness (a^*) and yellowness (b^*) of the system at both 60 and 90 °C, with simultaneous darkening of the solution, as demonstrated by the reduction of the L^* parameter. In the first 60 minutes of heating, the decreasing of the b^* parameter (yellowness) occurred at a higher rate than the a^* values (redness). This phenomenon can be attributed to the fact that β -carotene and β -cryptoxanthin, the most abundant pigments present in the juice model, are yellowish carotenoids (12), as a consequence, their degradation produced higher impact in the b^* as compared to the a^* values. The calculated chrome (C^* , eqn. 2)

and hue (h , eqn. 3) parameters also changed during heating due to the degradation of carotenoids (Table 1, Supporting Information).

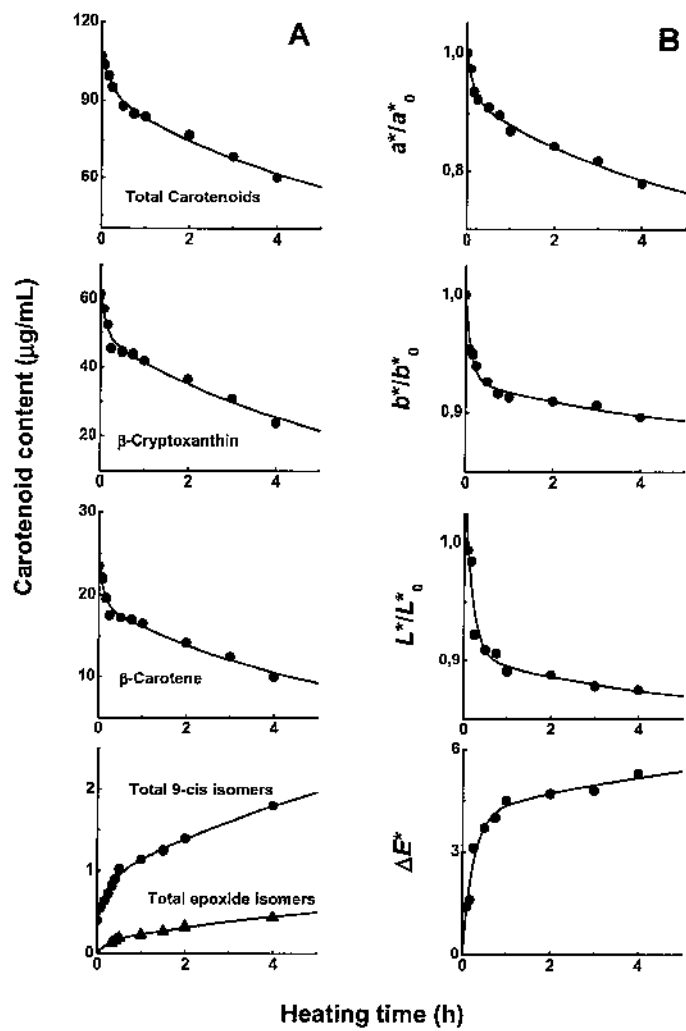


Figure 2: Bi-exponential fitting with eqn. 4 of the experimental data obtained for cashew apple juice model heating at 90 °C, (A) HPLC (carotenoid concentration); and (B) color parameters.

Figure 2 also shows that the total color change ΔE^* increased up to ca. 5 after 4 h of heating at 90 °C and similar changes were observed after 9 h of heating at 60 °C. According to Lee and Coates (13), a value of $\Delta E^* \approx 2$ represents a noticeably color difference and, for many products $\Delta E^* > 3$ is unacceptable by the consumers. In fact, $\Delta E^* = 2$ was already verified after the first 15 min of cashew apple juice model heating at 90 °C. This deep variation of total color can be mostly associated to the transformation of the main *all-trans* carotenoids in *cis* isomers, oxidation compounds, volatiles, and other non-detectable low molecular weight compounds. Thus, the total color change (ΔE^*) observed in Figure 2 for the heated cashew apple juice model is expected to negatively impact the consumers color perception of the sample.

Kinetics of thermal degradation. **Figure 2** also shows that both carotenoid levels and color parameter changes followed a biphasic behavior that was best fitted by the bi-exponential equation 4. The same kinetics was also observed at 60 °C.

$$Y_t = A_1 \exp(-\gamma_1 t) + A_2 \exp(-\gamma_2 t) + Y_{\infty} \quad (4)$$

In equation 4, Y_t and Y_{∞} are carotenoid concentration or color parameter values at real time and infinite time, respectively. A_1 and A_2 are the pre-exponential factors, while γ_1 and γ_2 are the observed rate constants for the fast and slow decay, respectively.

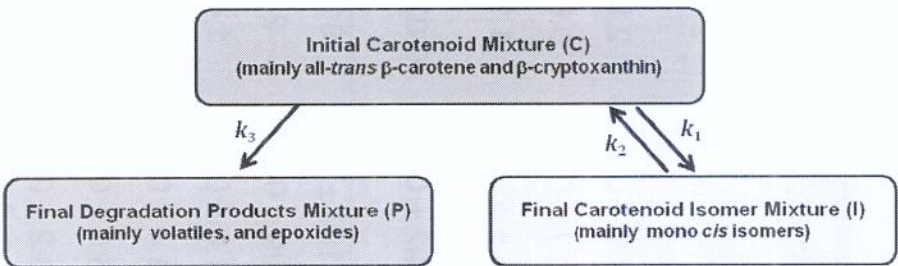
Table 1 shows the calculated kinetic parameters obtained by fitting the data with eqn. 4. It reveals that similar γ_1 and γ_2 values were obtained for both the chemical (carotenoids) and the physical (color) parameters at the same heating temperature. **Table 1** also indicates that the extrapolation of the total carotenoid concentration at infinite time $[\text{Car}]_\infty$ was larger than the sum of those for all-*trans*- β -carotene and all-*trans*- β -cryptoxanthin, because under this condition the kinetic evaluation of total carotenoids included the formation of *cis* isomers and epoxides, which were the main products detected by HPLC analysis.

Table 1. Kinetic parameters obtained by fitting HPLC and color data, using eq. 4, for degradation of carotenoids and color changes during thermal treatment of a cashew apple juice model.

Parameter ^a	Total		β - carotenoids	β - cryptoxanthin	β - carotene	a^*	b^*	L^*	ΔE^*	C^*	h
	carotenoids	cryptoxanthin									
60 °C	Y_0	107 ± 1	61 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	7.7 ± 3.5	28 ± 9	32 ± 9	0	29 ± 9	77 ± 8
	Y_∞	49 ± 0.2	21 ± 0.3	12 ± 0.4	12 ± 0.4	-0.8 ± 2.0	20 ± 5	21 ± 3	18 ± 2	2 ± 3	18 ± 10
	A_1	4.6 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.3 ± 2.0	2.8 ± 1.8	-3.1 ± 2	15 ± 3	15 ± 9
	γ_1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2
	A_2	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	6.1 ± 2.0	7 ± 4	8.4 ± 5.0	-15 ± 2	12 ± 30	51 ± 25
	γ_2	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02
90 °C	Y_0	107 ± 1	61 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	7.7 ± 3.5	30 ± 18	32 ± 10	0	31 ± 10	76 ± 19
	Y_∞	29 ± 0.1	2 ± 0.1	2 ± 0.1	2 ± 0.1	5.0 ± 1	16 ± 3	27 ± 9	6.3 ± 5.9	26 ± 3	79 ± 4
	A_1	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.8	2 ± 2	4.9 ± 5	-4.0 ± 7.0	2.1 ± 2.3	-0.2 ± 0.1
	γ_1	4.4 ± 0.9	7.7 ± 2.3	8.1 ± 3.2	8.1 ± 3.2	7.1 ± 2.0	7.7 ± 1.4	11 ± 7	4.0 ± 1.0	5 ± 2	6 ± 4
	A_2	6.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.2 ± 1.0	16 ± 5	1.7 ± 3.0	-2.3 ± 1.0	2.1 ± 4.7	-3.3 ± 2.0
	γ_2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1

^a γ_1 and γ_2 in h^{-1} ; Y_0 , Y_∞ , A_1 and A_2 in $\mu g.mL^{-1}$ for carotenoid concentration. All values are average and standard deviation of duplicated experiments.

The bi-exponential decay behavior verified for the initial *all-trans*-carotenoids and products formed, showed in all cases the same observed fast and slow lifetimes at each temperature, confirming the occurrence of a common overall degradation mechanism, **Scheme 1**, which involves parallel irreversible and reversible coupled degradation reactions. In this overall mechanism, three main types of chemical compounds are involved, *i.e.* the initial main *all-trans*- β -cryptoxanthin and *all-trans*- β -carotene, the reversibly equilibrated *mono-cis* isomers (9-, 9'-, 13-, 13'-, 15-, 15'-), and degradation products, such as epoxides, apo-carotenals and volatiles (*p*-xylene, *p*-cresol and dodecane) produced by irreversible oxidation and/or breakdown reactions (8, 10). Degradation of the *mono-cis* isomers was not kinetically detected, as observed for the time evolution of 9-*cis* carotenoid mixture in **Figure 2**. A similar mechanism for the thermal degradation of bixin in a water/ethanol (8:2) solution, studied by HPLC as a function of temperature (70 to 125 °C) was also reported (5).



Scheme 1. Proposed overall mechanism for the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model.

The simplest mathematical solution of the differential equations that describe the mechanism proposed can be obtained assuming that the initial concentration of *cis* isomers and epoxides are negligible as compared with the concentration of the precursors all-*trans* carotenoids, i.e. $[C]_0 \neq 0$, and $[I]_0 = [P]_0 = 0$ (14). In the present case, both all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene represent ca. 90% of the initial mixture, satisfying the above assumption. Thus, according to Scheme 1, the integrated equation for the carotenoid degradation is given by eqn. 5.

$$\frac{[C]_t}{[C]_0} = \left(\frac{k_2 - \gamma_1}{\gamma_2 - \gamma_1} \right) e^{-\gamma_1 t} + \left(\frac{k_2 - \gamma_2}{\gamma_1 - \gamma_2} \right) e^{-\gamma_2 t} \quad (5)$$

This equation contains also two exponential terms supporting the use of the operative fitting equation 4. In this framework, the meaning of γ_1 and γ_2 is as follow:

$$\begin{aligned} \gamma_1 &= \frac{1}{2}(p+q); & \gamma_2 &= \frac{1}{2}(p-q) \\ p &= k_1 + k_2 + k_3; & q &= \sqrt{p^2 - 4k_2k_3} \end{aligned} \quad (6)$$

In the set of eqn. 6, k_1 and k_2 represent the overall first order rate constants for the direct and reverse isomerization reactions, respectively; and k_3 is the overall first order rate constant for the irreversible reaction to both volatile and non-volatile degradation compounds. According to **Scheme 1**, $K_{e,iso} = k_1/k_2$, and the values of

k_1 , k_2 , and k_3 can be calculated by combination of eqns. 6, using the average values of the fast and slow observed rate constants, *i.e.* $\langle \gamma_1 \rangle$ and $\langle \gamma_2 \rangle$, **Table 2**.

Table 2. Kinetic parameters calculated according to the proposed mechanism shown in Scheme 1, for the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model.

Rate constant (h ⁻¹)	$\langle \gamma_1 \rangle$	$\langle \gamma_2 \rangle$	k_1	k_2	k_3
60 °C	0.58 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.003 ± 0.001	0.021 ± 0.004	0.555 ± 0.040
90 °C	6.8 ± 2.2	0.22 ± 0.04	0.11 ± 0.020	0.22 ± 0.05	6.67 ± 0.80
E_a (kcal/mol)			27.3 ± 4.5	18.7 ± 2.5	19.8 ± 2.0

From this calculation it is notorious that k_3 was one-order of magnitude larger than k_1 and k_2 , indicating that the formation of degradation compounds is much faster than the isomerization processes. The analysis of the activation energy $E_{a,i}$ of each individual steps by using the classical Arrhenius equation support this result, **Table 2**. From this calculation it is clear that the irreversible formation of degradation compounds needs to overcome a lower barrier (*ca.* 20 kcal/mol) than that for direct formation of mono-*cis* isomers (*ca.* 27 kcal/mol), favoring this degradation pathway of the all-*trans* carotenoids with the consequent strong change of the total color (ΔE^*). It is interesting to note that the activation energy values of the irreversible

degradation reaction and the *cis*→*trans* back isomerization reaction are almost the same, i.e. $E_{a,3} \approx E_{a,2}$. However, the $k_3/k_2 \approx 30$ indicates that the formation of degradation compounds is a highly entropic process, probably due to breakdown of the large all-*trans* molecules into shorter chain derivatives. In addition, the present mechanism allows the calculation of the overall activation energy for the thermal degradation of the main all-*trans* carotenoids in the cashew apple juice model as $E_{a,1} - E_{a,2} + E_{a,3} = 28.4$ kcal/mol. This value is close to those reported for thermal degradation of all-*trans*- β -carotene (26.2 kcal/mol) in safflower seed oil (15), and for astaxanthin in dichloromethane (25.3 kcal/mol) (16). Although a similar E_a value was also reported by Dhuique-Mayer et al. (2) for the thermal degradation of β -carotene (26.3 kcal/mol) in orange juice, in their study β -cryptoxanthin was less affected by temperature ($E_a = 37.3$ kcal/mol), contrary to that found in the present study.

CONCLUSIONS

Although carotenoid degradation kinetics and visual color changes in model and food systems submitted to heating processes are a complex phenomena, the simplest mechanism with two parallel reactions proposed in our study (**Scheme 1**) adequately explains the thermal degradation of cashew apple carotenoids in a juice model. Furthermore, the close relationship between carotenoid degradation and color change suggests that color monitoring (a physical property) could be an useful approach to control in real-time the quality of cashew apple juice during

thermal process. In particular, determination of ΔE^* can be a good predictor of both all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene losses during the thermal processing of cashew apple juice. In fact, monitoring of both ΔE^* and L^* values has been reported to be the most sensitive measurement of color change during thermal treatment of pineapple puree (17), and together with other tri-stimulus color parameters have already been suggested as good estimators of carotenoid contents in ultrafrozen orange juices (18).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Brazil and CICYT-UNSE (Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Santiago del Estero) and CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina for financial support.

REFERENCES

- (1) Brito, E.; Damasceno, L.; Fernandes, F.; Magalhães, M. Non-enzymatic browning in clarified cashew apple juice during thermal treatment: kinetic and process control. *Food Chem.* **2008**, *106*, 172-179.

- (2) Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, M. J. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4209-4216.
- (3) Assunção, R. B.; Mercadante, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *J. Food Compos. Anal.* **2003**, *16*, 647-657.
- (4) Mortensen, A.; Skibsted, L. H. Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 279-286.
- (5) Rios, A. de O.; Borsarelli, C. D.; Mercadante, A. Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2307-2311.
- (6) Barbosa, M. I. M. J.; Borsarelli, C. D.; Mercadante, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 989-994.
- (7) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5062-5072.
- (8) Zepka, L. Q.; Mercadante, A. Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chem.* **2009** (accepted).

- (9) Assunção, R. B.; Mercadante, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chem.* **2003**, 81, 495-502.
- (10) Zepka, L. Q.; Mercadante, A. Z.; Da Silva, M. A. A. P. Aroma compounds generated from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice system. **2009** (data not published).
- (11) Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9512-9518.
- (12) Meléndez-Martínez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.* **2007**, 101, 1145-1150.
- (13) Lee, H. S.; Coates, G. A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensm. - Wiss. U -Technol.* **2003**, 36, 153-156.
- (14) Capellos, C.; Bielski, B. H. J. *Kinetic Systems. Mathematical Description of Chemical Kinetics in Solution*; Wiley-Interscience: New York, 1972.
- (15) Henry, L. K.; Catignani, G.; Schwartz, S. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and all-*trans*- β -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75, 823-829.
- (16) Yuan, J.-P.; Chen, F. Kinetics for the reversible isomerization reaction of *trans*-astaxanthin. *Food Chem.* **2001**, 73, 131-137.

- (17) Chutintrasri, B.; Noomhorm, A. Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *Lebensm. - Wiss. U -Technol.* **2007**, *40*, 300-306.
- (18) Melendez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Application of Tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7266-7270.

Supplemental Table 1. Color parameters and carotenoid contents ($\mu\text{g/mL}$) in cashew apple juice model, heated at 60 °C and 90 °C.

time (min)	L^*	a^*	b^*	C^*	h	ΔE^*	all- <i>trans</i> - β - carotene	all- <i>trans</i> - β - cryptoxanthin	total carotenoids
temperature 60°C									
0	31.5	6.8	28.4	29.3	76.5	0.0	23.5	61.4	107.0
30	30.7	6.6	28.3	29.0	76.9	0.8	22.1	55.7	97.8
60	29.7	6.4	27.8	28.6	77.0	1.9	20.3	50.0	94.4
90	29.4	6.2	27.5	28.2	77.3	2.4	18.0	43.8	84.4
120	29.1	6.1	27.1	27.8	77.3	2.8	16.8	41.0	79.4
150	28.9	6.0	27.0	27.7	77.5	3.0	15.0	38.9	77.3
180	28.8	5.9	26.9	27.6	77.6	3.2	14.3	36.5	75.2
210	28.4	5.8	26.8	27.5	77.8	3.6	14.2	36.4	74.5
240	28.2	5.4	26.7	27.3	78.6	4.0	14.1	36.3	74.4
300	28.1	5.3	25.8	26.4	78.4	4.5	13.4	33.8	73.1
360	28.0	5.2	25.5	26.0	78.5	4.8	13.0	33.6	72.5
420	27.9	5.1	25.4	25.9	78.6	5.0	12.8	33.4	70.8
480	27.8	5.0	25.1	25.6	78.7	5.2	12.7	32.9	70.4
540	27.6	4.9	25.0	25.5	78.9	5.3	12.6	32.0	69.9
temperature 90°C									
0	32.0	7.7	29.8	30.8	75.5	0.0	23.5	61.4	107.0
5	31.8	7.5	28.4	29.3	75.2	1.4	22.0	57.0	104.9
10	31.5	7.2	28.3	29.2	75.7	1.6	19.6	52.3	100.5
15	29.5	7.1	28.0	28.9	75.8	3.1	17.5	45.4	96.0
30	29.1	7.0	27.6	28.5	75.8	3.7	17.2	44.5	88.9
45	29.0	6.9	27.3	28.2	75.8	4.0	17.1	43.8	86.0
60	28.5	6.6	27.2	28.0	76.4	4.5	17.0	40.5	86.8
120	28.4	6.4	27.1	27.9	76.7	4.7	14.2	36.5	78.9
180	28.1	6.3	27.0	27.7	76.9	4.8	12.5	30.9	72.9
240	28.0	6.0	26.7	27.4	77.3	5.3	12.0	25.5	68.7

Values are average of duplicated experiments.

CAPÍTULO 4

AROMA COMPOUNDS DERIVED FROM THE THERMAL DEGRADATION OF CAROTENOIDS IN A CASHEW APPLE JUICE MODEL

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Food Chemistry*

ABSTRACT

The volatile compounds derived from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model were studied as a function of temperature (60 and 90 °C). The profile of volatile compounds was obtained by headspace-solid phase microextraction associated to gas chromatography coupled to flame ionization detector (HS-SPME-GC-FID) and further characterized by a mass spectrometry detector (HS-SPME-GC-MS). High performance liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-PDA-MS/MS) was used to establish the composition of carotenoids in the cashew apple juice model. A total of 35 different volatiles were separated in the fresh cashew apple juice model, the major one was *p*-cresol, followed by dodecane. As a consequence of heating, 5-ethyl-*p*-xylene and 2,5-diisopropylphenol disappeared, whereas the amounts of the major compounds increased with time and heating temperature (60 and 90 °C). Some compounds, such as dimethyl-styrene, *p*-cymene, and *p*-xylene, were probably derived from the thermal degradation of the carotenoid polyene chain. On the other hand, β -ionone was not detected, although all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene were found as the major carotenoids in heated cashew apple juice model.

Keywords: Volatile compounds; Carotenoids; Thermal degradation; Cashew apple juice model; SPME-GC-FID; SPME-GC-MS

1. INTRODUCTION

During the concentration of cashew apple juice, the exotic and appreciated aroma and flavour of this beverage loose sensory quality, decreasing the juice acceptability by the consumers. Among the factors contributing to the undesirable changes occurring in the juice sensory attributes, the formation of aroma volatiles from the thermal degradation of carotenoids is a non-explored but feasible possibility.

A large range of total carotenoid contents, from 8.2 to 197.8 µg/100 g, were reported in cashew apple commercial products, such as nectar, frozen pulp, concentrated juice, as well as ready-to-drink juice (Assunção & Mercadante, 2003a). Independently of the product, the major carotenoids were all-*trans*-β-carotene and all-*trans*-β-cryptoxanthin, followed by α-carotene, and *cis* isomers of β-carotene and β-cryptoxanthin. Of the 60 samples analyzed by Assunção & Mercadante(2003a), 10 also contained auroxanthin, 5,8-epoxy-cryptoxanthin, 5,8-epoxy-lutein, ζ-carotene and 2 unidentified carotenoids.

Studies involving the formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids during heat treatment can be traced to the classical and pioneering work of Kuhn & Winterstein (1932). For a long time, toluene, *m*-xylene, and 2,6-dimethyl-naphthalene have been known to be formed during the thermal degradation of β-carotene (Day & Erdman, 1963; Madder, 1964; Rios, Fernández-García, Mínguez-Mosquera & Pérez-Gálvez, 2008). In fact, the studies concerning

the influence of temperature on the generation of volatile compounds by β -carotene degradation usually report the formation of the three mentioned hydrocarbons. According to Madder (1964), toluene, *m*-xylene, and 2,6-dimethylnaphthalene are most likely formed by cyclization of the polyene chain of carotenoids. In fact, toluene and *m*-xylene were found in oleoresins of marigold, tomato and paprika, after heating at 50, 100 and 150 °C (Rios *et al.*, 2008). Once more, intramolecular cyclization was proposed as the main reaction mechanism in the formation of this volatile, activated by the thermal process, followed by elimination reaction from the chain or by heterolytic fragmentation reaction. The presence of other compounds, such as several methyl-benzaldehydes were only detected in marigold and paprika oleoresins, and indicated the concurrence of carotenoid oxidation reactions that affected either the central polyene chain or the cyclic end-groups (β or ϵ rings) (Rios *et al.*, 2008).

Additionally, thermal degradation compounds of carotenoids, such as citral (a mixture of neral and geranial), easily degraded on mild thermal treatment (40 °C) under acidic conditions by a series of cyclization and oxidation reactions, generating a variety of secondary degradation compounds, such as *p*-cresol, *p*-cymene, α -*p*-dimethyl-styrene, *p*-methyl-acetophenone (Ueno, Masuda & Ho, 2004). Among these compounds formed from citral degradation, *p*-cresol and *p*-methyl-acetophenone were reported to be the most potent off-odorants (Ueno *et al.*, 2004).

The above-mentioned studies in fact support, at least partially, that the undesirable changes in the sensory attributes of cashew apple juice might be due to aroma volatiles generated from the thermal degradation of carotenoids occurred during the juice thermal treatment.

Thus, the objective of the present work was to study the formation of volatile compounds derived from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples and standards

Red cashew apple fruits (*Anacardium occidentale* L.), from Petrolina region (Pernambuco State, Northeast region, Brazil), were acquired in a supermarket in Campinas city (São Paulo State, Brazil), during their harvest season (October, 2007). The cashew apple fruits were homogenized, the Brix degree value was measured, and the pulp was kept frozen at -35 °C until carotenoid extraction.

Standards of β -ionone, β -damascenone, β -cyclocitral, 5-hydroxy-methyl-2-furaldehyde, 2-butanol, octanol, methyl-caproate, linalool, methyl-butyrate, geranyl-acetate, ethyl-butyrate, 1-hexanol, 2,2,6-tri-methyl-cyclo-hexanone, limonene, nonyl-aldehyde were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The paraffin homologues (C₇ to C₃₀) were obtained from Polyscience (Chicago, USA).

Standards of all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*- β -cryptoxanthin,

all-trans- β -carotene, and *all-trans*- α -carotene were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland), with purities ranging from 95.0 to 99.9 %, as determined by HPLC-PDA.

2.2. Carotenoid extraction and determination

The carotenoids were extracted with acetone, transferred to petroleum ether (b.p. 30-70 °C)/diethyl ether, saponified overnight at room temperature with 10% methanolic KOH, followed by alkali removal. Due to the high oil content in the cashew apple peel, it was necessary to physically remove the oil, as follows: prior to ether transference, the carotenoid extract was kept in the freezer at -18 °C for 2h, followed by filtration using cold glassware and washing with cold acetone (De Rosso & Mercadante, 2007). The dried cashew apple carotenoid extract was flushed with nitrogen (99.0 %) and kept at -35 °C.

The experimental conditions for analysis of carotenoids by high performance liquid chromatography-photodiode array detector-mass spectrometry detector (HPLC-PDA-MS/MS) were the same as previously described by the De Rosso & Mercadante (2007). These conditions were already applied for identification and quantification of carotenoids in a simulated cashew apple juice (Zepka & Mercadante, 2009).

2.3. Cashew apple juice model

The cashew apple extract, containing ca. 200 μ g carotenoid, was dissolved

in 5 mL of ethanol, which was further added to 25 mL of Milli-Q water (Millipore, Billerica, USA) acidified at pH 3.8 with 0.5 M of citric acid (juice model), as previously described by Zepka & Mercadante (2009).

The juice model-system was distributed in sealed glass tubes and heated at 60 °C and 90 °C in a water bath at different heating times (1 and 2 h). After this period, the tubes were taken from the bath and immediately cooled in current water.

A similar protocol was followed for the control system (blank), using 5 mL ethanol and 25 mL of Milli-Q water acidified at pH 3.8 with 0.5 M of citric acid.

2.4 Isolation of volatile compounds

The isolation of the volatile compounds was performed using solid phase micro-extraction (SPME) with the divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber. The SPME fiber was inserted into the headspace of the vial containing the cashew apple juice system for 30 min at room temperature, with agitation provided by a magnetic stir bar. After this period, the fiber was removed from the vial and immediately desorbed into the injector of the GC equipments.

2.5 GC analysis

The volatile compounds were separated on a DB-Wax (J & W, Folsom, USA) fused silica capillary column (30 m length, 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness) in a Shimadzu model GC 2010 gas chromatograph. The splitless mode

injector was maintained at 230 °C and the flame ionization detector (FID) at 250 °C. Hydrogen was the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. The oven temperature was kept at 40 °C for 15 min, followed by a linear increase of 4 °C/min to 210 °C and held at that temperature for 17 min. Relative composition was obtained considering the detector's response in electric signal (mVolts).

For identification, the volatile compounds were analyzed in a Shimadzu model QP 2010 mass spectrometer (GC/MS) with a MS electron-impact ionization voltage of 70 eV, using the same column and oven conditions described above for GC-FID analysis, with the exception that helium was used as the carrier gas. The MS spectra obtained were analyzed by matching the computerized library (NIST 2006 MS Library) provided with the equipment.

A standard mixture of paraffin homologues was prepared using hexane as solvent. Co-injection of sample and standard mixture provided retention indices under the same chromatographic conditions, and also experimental Kovats retention indices. Since most standards of the detected volatiles were not commercially available, our identification can be considered as "tentative identification".

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Carotenoid degradation in the cashew apple juice-model

A total of 15 different carotenoids were separated in the fresh cashew apple juice model not submitted to heat, all-*trans*- β -cryptoxanthin was the major carotenoid, followed by all-*trans*- β -carotene (Table 1). These results agree with those previously reported for fresh cashew apple fruits from Brazil (Assunção & Mercadante, 2003b). As a consequence of heating, the concentration of 6 carotenoids decreased, whereas the levels of 5 *cis* isomers increased and 8 new compounds were formed in small amounts (Table 1). In fact, as can be seen in Figure 1, the decreased concentration of all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene was not compensated by the increased levels of thermal degradation compounds, since the amounts of total carotenoids detected by HPLC-PDA also decreased during heating of the cashew apple juice model at 60 and 90°C. This fact indicated that low molecular weight compounds derived from carotenoids and not detected by HPLC-PDA were formed during heating.

Table 1 Carotenoid composition ($\mu\text{g/mL}$) in cashew apple juice model heated at 90 °C.

carotenoids	0 h	1 h	2 h
12'-apo- β -caroten-12'-al	n.d	3.0 $\pm$ 0.3	n.d
<i>cis</i> -neoxanthin	2.1 $\pm$ 1.8	n.d	n.d
neochrome	1.2 $\pm$ 0.4	n.d	n.d
auroxanthin	n.d	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3
<i>cis</i> -violaxanthin	3.4 $\pm$ 0.5	n.d	n.d
luteoxanthin	n.d	0.9 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3
antheraxanthin	2.8 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.6
mutatoxanthin	n.d	1.0 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4
all- <i>trans</i> -lutein	2.0 $\pm$ 0.5	n.d	n.d
<i>cis</i> -lutein	n.d	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.5
all- <i>trans</i> -zeaxanthin	1.7 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3
5,6-epoxy- β -cryptoxanthin	n.d	2.0 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.0
13- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^a	1.9 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.5
13'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^a	1.6 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 1.0	3.5 $\pm$ 0.4
zeinoxanthin	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3
all- <i>trans</i> - α -cryptoxanthin	0.7 $\pm$ 0.2	n.d	n.d
all- <i>trans</i> - β -cryptoxanthin	61.4 $\pm$ 2.5	40.5 $\pm$ 2.0	36.1 $\pm$ 1.4
15- <i>cis</i> - β -carotene	n.d	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3
5,8-epoxy- β -carotene	n.d	0.6 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3
13- <i>cis</i> - β -carotene	1.3 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.5
9- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin ^b	1.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.6
all- <i>trans</i> - α -carotene	0.6 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3
all- <i>trans</i> - β -carotene	23.5 $\pm$ 1.6	17.0 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 2.1
9- <i>cis</i> - β -carotene	0.8 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3
total carotenoids	106.2 $\pm$ 3.2	86.5 $\pm$ 1.9	78.9 $\pm$ 2.7

Mean and standard deviation of two independent experiments.

^aTentatively identified as 13-*cis*- β -cryptoxanthin or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin.

^bTentatively identified as 9-*cis*- β -cryptoxanthin or 9'-*cis*- β -cryptoxanthin.

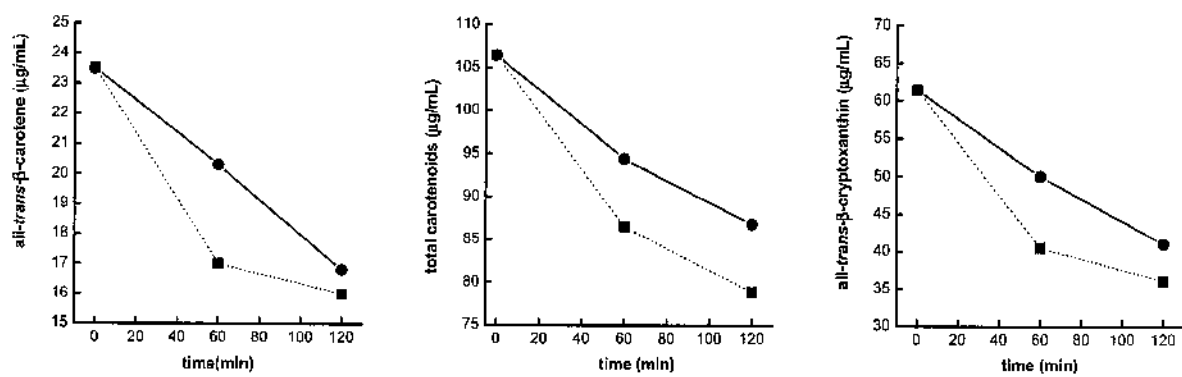


Fig. 1. Degradation of all-*trans*-β-cryptoxanthin, all-*trans*-β-carotene and total carotenoids during heating of cashew apple juice model at 60 °C (filled line) and 90 °C (dotted line).

3.2. Volatile compounds derived from the thermal degradation of carotenoids

The impact of thermal treatment on the profile of volatile compounds formed in the cashew apple juice model can be seen in Figure 2 and Table 2.

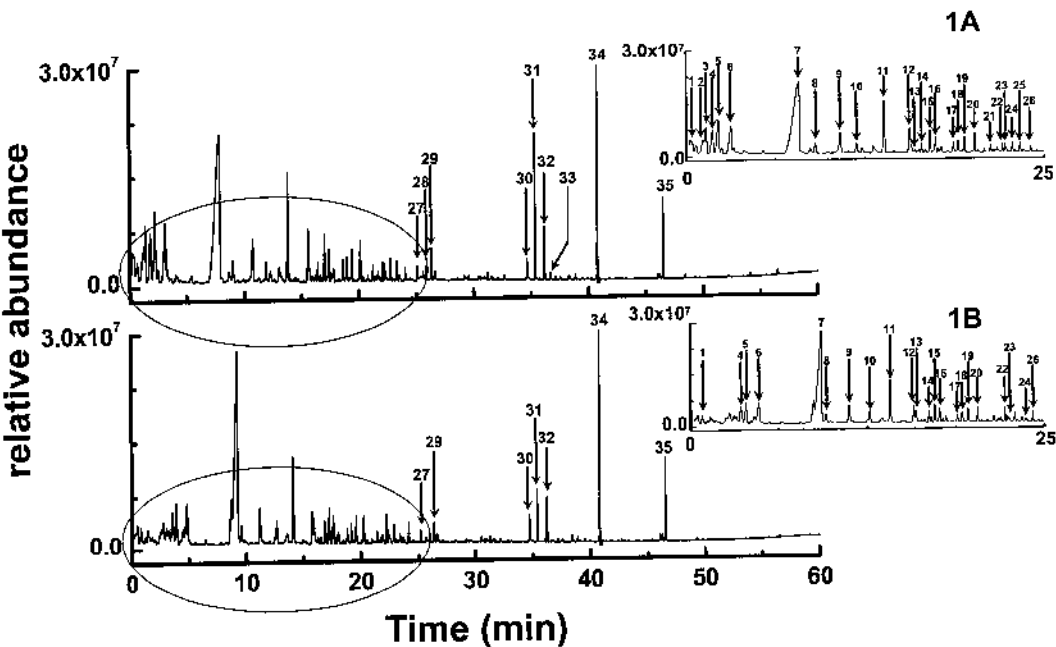


Fig. 2. Chromatogram (total ion current), obtained by GC-MS, of volatile compounds from cashew apple juice model, at time 0 h (A) and 2 h heated at 90 °C (B). See text for chromatographic conditions. Peak characterization is given in Table 2.

Table 2. Volatile compounds detected in the cashew apple juice model heated for 2 h at 90 °C.

peak ^a	volatile compounds	Kovats index	% area FID	odor description (reference)
1	<i>p</i> -xylene	1126	2.5	plastic (flavornet)
2	6-methyl-undecane	1132	0.3	n.f.
3	5-methyl-undecane	1151	0.4	n.f.
4	4-methyl-undecane	1156	0.3	n.f.
5	3-methyl-undecane	1160	0.4	n.f.
6	2-methyl-undecane	1169	0.8	n.f.
7	dodecane	1199	28.0	alkane (flavornet)
8	1-ethyl-3-methyl-benzene	1210	tr	n.f.
9	1,2,3-trimethyl-benzene	1232	0.6	n.f.
10	1-dodecene	1251	4.2	n.f.
11	1,3,5-trimethyl-benzene	1268	3.4	n.f.
12	<i>o</i> -xylene	1287	tr	geranium (flavornet)
13	<i>o</i> -propyltoluene	1289	tr	n.f.
14	tridecane	1299	0.2	alkane (flavornet),
15	2-ethyl- <i>p</i> -xylene	1305	3.0	n.f.
16	1,2,4-trimethyl-benzene	1312	tr	n.f.
17	1-ethyl-2,3-dimethyl-benzene	1335	tr	n.f.
18	<i>p</i> -cymene	1341	0.7	solvent, gas, citrus (flavornet)
19	5-ethyl- <i>p</i> -xylene	1349	0.4	n.f.
20	1,2,4-trimethyl-benzene	1360	tr	n.f.
21	1-methyl-4-(1-methylpropyl)- benzene	1379	tr	n.f.
22	tetradecane	1394	1.3	alkane (flavornet)
23	1,2,4,5-tetramethyl-benzene	1396	tr	n.f.
24	1,2,3,4-tetramethyl-benzene	1407	0.1	n.f.
25	n.i.	1417	tr	n.f.
26	1-tetradecene	1435	tr	n.f.

Cont. Table 2. Volatile compounds detected in the cashew apple juice model heated for 2 h at 90 °C.

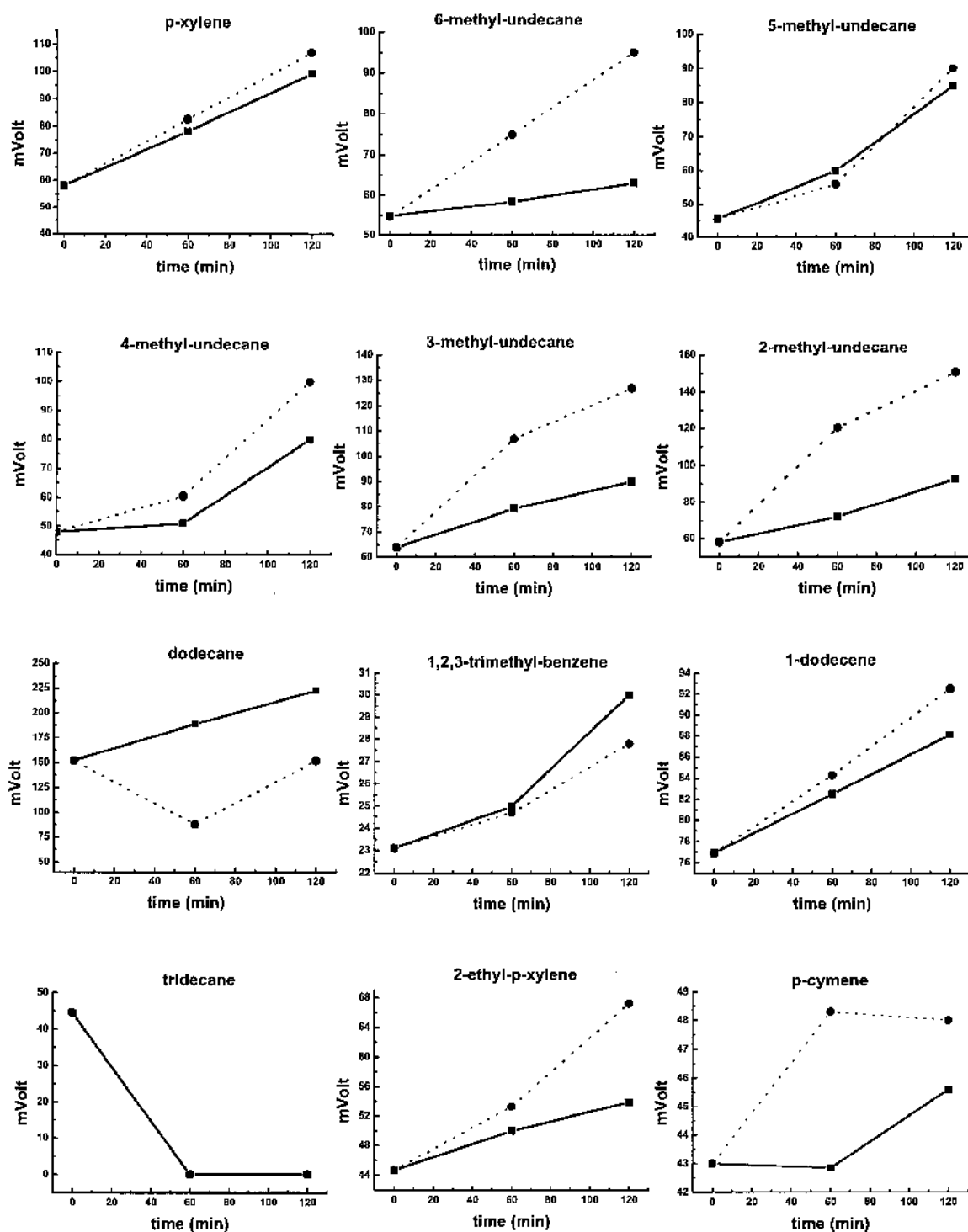
peak ^a	volatile compounds	Kovats index	% area FID	odor description (reference)
27	1-ethyl-3,5-dimethyl-benzene	1458	tr	n.f.
28	2,6-dimethyl-2,5-heptadien-4-one	1474	tr	n.f.
29	2-ethyl-1-hexanol	1483	0.3	green (flavornet,)
30	naphthalene	1692	0.7	tar (flavornet)
31	dimethyl-styrene	1712	0.3	citrus, pine (flavornet,)
32	2,5-diisopropyl-phenol	1735	0.1	smoky (flavornet,)
33	cyclopentyl-4-ethyl-benzoato	1750	tr	n.f.
34	<i>p</i> -cresol	1870	50.5	medicine (flavornet), barn-like (Fu <i>et al.</i> , 2002), phenol, animal (Fan and Qian, 2005)
35	1-(4-ethoxy-2-hydroxyphenyl)- 1-octadecanone	2052	1.5	n.f.

^a Peaks numbered according to the chromatograms shown in Figure 2.

tr: detected in trace amounts (< 0.1%).

n.f.: not found in the literature

Figure 3 shows the behaviour of the major volatile compounds during heating of cashew apple juice model at 60 and 90 °C.



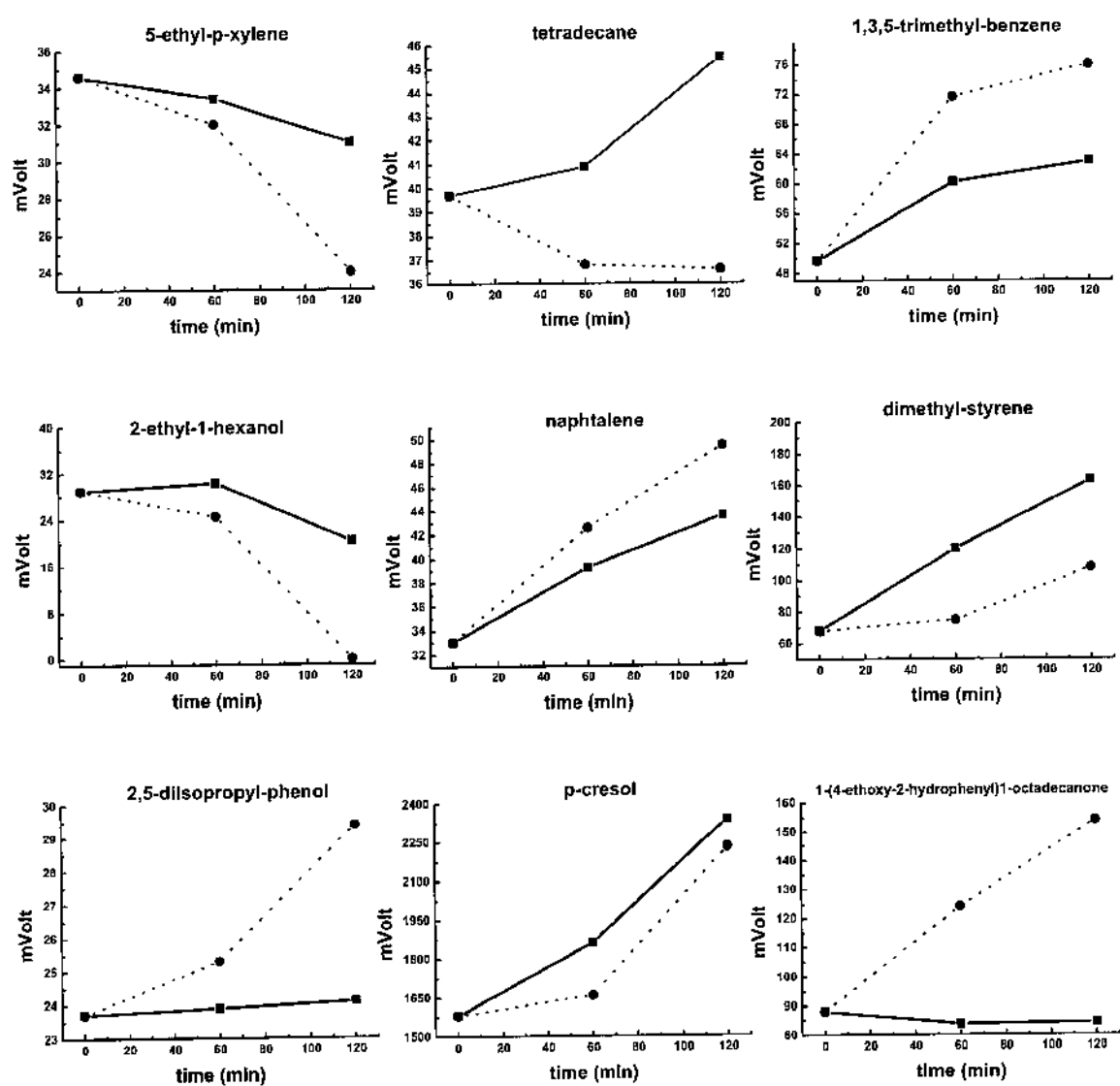


Fig. 3. Changes of volatile compounds observed during heating of cashew apple juice model at 60 (filled line) and 90 °C (dotted line).

As can be seen in Figure 3, *p*-xylene, also named 1,2,3-dimethyl-benzene, was formed during heating of the cashew apple system at both temperatures. Similar results were already observed in several studies, as already mentioned, with the formation of *m*-xylene due to thermal degradation of carotenoids (Mader, 1964; Rios et al., 2008; Ueno et al., 2004; Scotter, Lesley, Appleton & Castle, 2000; Scotter, 1995). In our study, this result supports the hypothesis that carotenoids thermal degradation can contribute to changes in cashew apple juice aroma and flavour, since *p*-xylene is an odorant whose odour was described as plastic (Flavornet, 2008).

Figure 3 also shows that the concentration of *p*-cresol, dimethyl-styrene and *p*-cymene increased during heating of the cashew apple juice system at both temperatures. It is interesting to note that for *p*-cresol and dimethyl-styrene, the highest increasing rate occurred at 60 °C, while for *p*-cymene the highest one was observed at 90 °C.

Ueno et al. (2004) proposed that under acidic conditions, citral, a compound formed during the thermal degradation of β -carotene at 40 °C, undergoes further oxidation as well as acid catalyzed reactions, leading to the generation of *p*-cresol, dimethyl-styrene and *p*-cymene. This is very consistent with our findings, shown in Figure 3, and supports our hypothesis that due to the heat treatment, carotenoids present in cashew apple juice, undergo thermal degradation forming aroma volatiles responsible for changes in the juice aroma and flavour, particularly because *p*-cresol represented approximately 50% of the total area of the

chromatogram (Table 2). In our juice model, dimethyl-styrene and *p*-cymene were formed at much lower amounts; however, since both are odorant volatile described in the literature (flavornet, 2008), both compounds can be considered as off-flavour in the heated cashew apple juice model.

Figure 3 also shows that the concentration of 2,5-diisopropylphenol, naphthalene, dodecane, 2-ethyl-*p*-xylene, 1,2,3-trimethyl-benzene, 1-dodecene and 1,3,5-trimethyl-benzene increased during heating of the cashew apple juice model. The 2,5-diisopropylphenol is an odorant whose odour is described as smoky (Flavornet, 2008).

Naphthalene was regarded as a thermal degradation compound resulting from the polyene chain of β -carotene heated at 97 °C in aqueous medium (Kanasawud & Crouzet, 1990). Both naphthalene and tridecane were identified in cashew apple fruit submitted to the mild thermal treatment, typical of the simultaneous distillation extraction (SDE) of volatiles (Bicalho, Pereira, Aquino Neto, Pinto & Rezende, 2000). Studies that did not applied temperatures higher than 37 °C for volatile extraction from fresh cashew apple fruits, such as those conducted by Maciel, Hansen, Aldenger & Labows (1986) and Garruti, Franco, Da Silva, Janzantti & Alves (2003), did not detect naphthalene and tridecane. Altogether, these findings support our hypothesis that the latest mentioned compounds are volatiles generated from the thermal degradation of cashew apple carotenoids, and may have an impact on the juice aroma and flavour. On this matter, tetradecane, listed in Table 2, was also identified by Bicalho et al. (2000) in

cashew apple and therefore might also be a thermal degradation compound from cashew apple carotenoids.

In general, 6-methyl-undecane, 5-methyl-undecane, 4-methyl-undecane, 3-methyl-undecane, and 2-methyl-undecane are probably derived from the thermal degradation of carotenoids, since the levels of these compounds increased as time and heating temperature increased (Figure 3), along with concomitant decreased amounts of the major carotenoids (Table 1).

On the other hand, 2-ethyl-1-hexanol and 5-ethyl-*p*-xylene decreased as time and heating temperature increased. As a consequence of the heat treatment, these peaks were not any more detected after 1 h heating at 90 °C. The 2-ethyl-1-hexanol is an odorant whose odour is described as green (Flavornet, 2008). In addition, 1-(4-ethoxy-2-hydroxyphenyl)-1-octadecanone seems to be differently modulated by temperature, since its relative amount increased with heating time at 90 °C, whereas a slight decreased was observed during heating at 60 °C.

4. CONCLUSION

Our results strongly suggest that the volatiles compounds 6-methyl-undecane, 5-methyl-undecane, 4-methyl-undecane, 3-methyl-undecane, 2-methyl-undecane, *p*-cresol, dimethyl-styrene, *p*-xylene, *p*-cymene, dodecane, 1-dodecene, tetradecane, 1,3,5-trimethyl-benzene, 2-ethyl-*p*-xylene, 2,5-diisopropylphenol, 1,2,3-trimethyl-benzene, 1-(4-ethoxy-2-hydroxyphenyl)-1-octadecanone and naphthalene were derived from the thermal treatment of cashew apple juice model,

and thus, based in earlier studies of carotenoid thermal degradation, they are most likely compounds generated from the degradation of carotenoids present in cashew apple.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Brazilian Funding Agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support.

6. REFERENCES

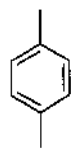
- Assunção, R. B., Mercadante, A. Z. (2003a). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial compounds of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 647-657.
- Assunção, R. B., Mercadante, A. Z. (2003b). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81, 495-502.
- Bicalho, B., Pereira, A. S., Aquino Neto, F. R.; Pinto, A. C., Rezende, C. M. (2000). Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L, Var. *nanum*) volatiles. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1167-1174.

- De Rosso, V. V., Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062-5072.
- Day, C. W., Erdman, G. J. (1963). Ionene: A thermal degradation product of β -carotene. *American Association for the Advancement of Science*, 141, 808.
- Da Silva, M. A. A. P., Elder, V., Lederer, C. I., Lundhal, D. S. McDaniel, M. R. (1993). Flavor Properties and Stability of a Corn-based-snack: Relating Sensory, Gas-chromatography, and Mass-spectrometry data. In: A. Charalambous, *Shelf-Life Studies of Foods and Beverages*, (pp.707-738). Amsterdam.
- Fan, W., Qian, M. (2006). Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fraction followed by gas chromatography/olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 333-342.
- Flavornet. www.flavornet.com. accessed in 05/08/2008.
- Fu, S-G., Yoon, Y., Bazemore, R. (2002). Aroma-active components in fermented bamboo shoots. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50, 549-554.
- Garruti, D. S., Franco, M. R. B., Da Silva, M. A. A. P., Janzantti, N. S., Alves, G. A. (2003). Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by Osme gas chromatography/olfactometry technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1455-1462.

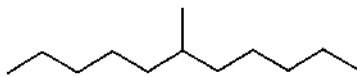
- Kanasawud, P., Crouzet, J. C. (1990). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -carotene degradation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 237-243.
- Kunh, R., Winterstein, A. (1932). Thermic breakdown of carotin colour substances. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 65, 1873.
- Maciel, M. I., Hansen, T. J., Aldinger, S. B., Labows, J. N. (1986). Flavor chemistry of cashew apple juice. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 34, 923-927.
- Mader, I. (1964). β -Carotene: thermal degradation. *Science*, 144, 533-534.
- Rios, J. J., Fernández-García, E., Mínguez-Mosquera, M. I., Pérez-Gálvez, A. (2008). Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, 106, 1145-1153.
- Scotter, M. (1995). Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chemistry*, 53, 177-185.
- Scotter, M., Lesley, W. A., Appleton, G. P., Castle L. (2000). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 2. Determination of aromatic hydrocarbon thermal degradation products by gas chromatography. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 484-488.
- Ueno, T.; Masuda, H.; Ho, C. (2004). Formation mechanism of p-methylacetophenone from citral via a tert-alkoxy radical intermediate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5677-5684.

Zepka, L. Q.; Mercadante, A. Z. (2009). Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry* (accepted for publication).

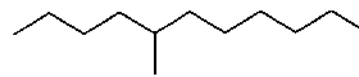
SUPPLEMENTARY DATA



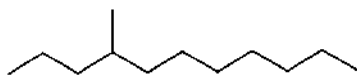
p-xylene



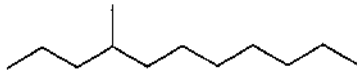
6-methyl-undecane



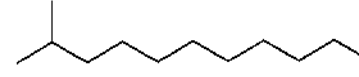
5-methyl-undecane



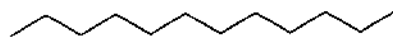
4-methyl-undecane



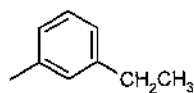
3-methyl-undecane



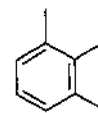
2-methyl-undecane



dodecene



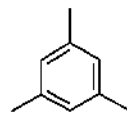
1-ethyl-3-methyl-benzene



1,2,3-trimethyl-benzene



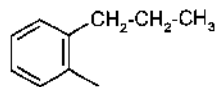
1-dodecene



1,3,5-trimethyl-benzene



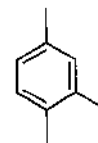
o-xylene



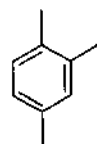
o-propyl-toluene



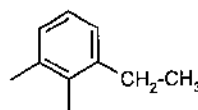
tridecane



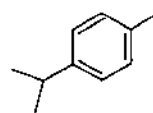
2-ethyl-*p*-xylene



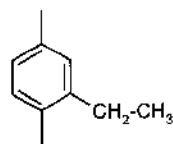
1,2,4-trimethyl-benzene



1-ethyl-2,3-dimethyl-benzene



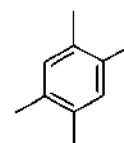
p-cymene



5-ethyl-*p*-xylene



tetradecane



1,2,4,5-tetramethyl-benzene

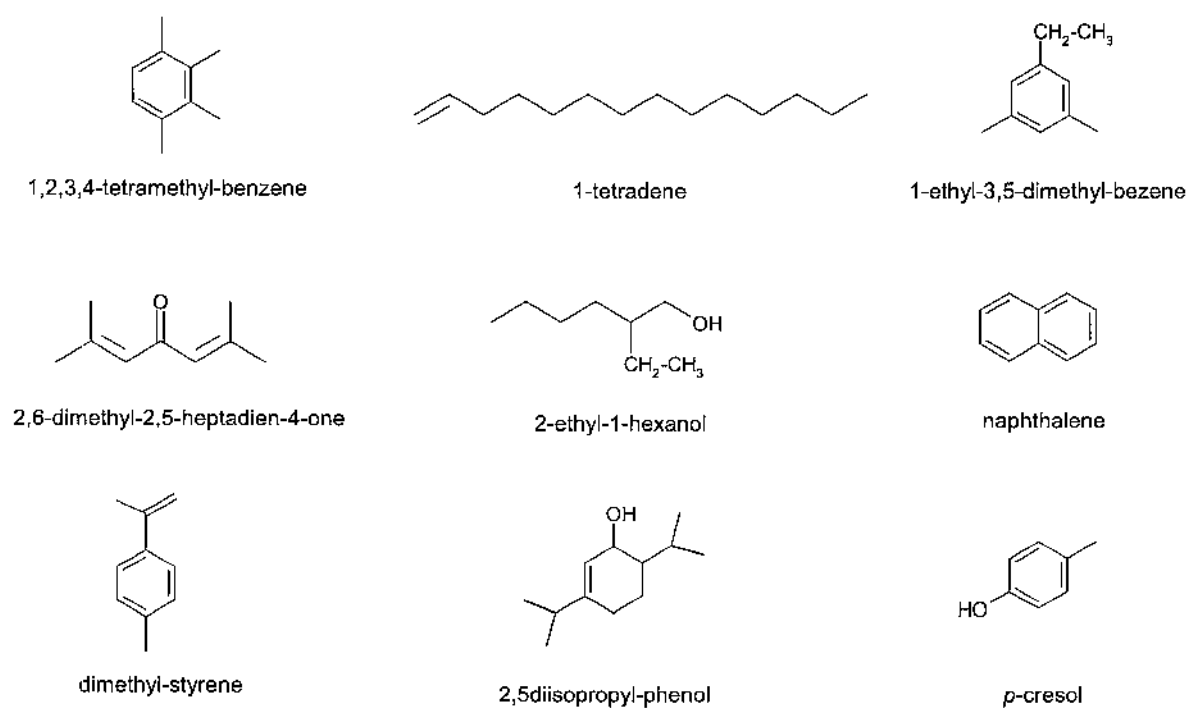


Figure 1S. Structures of the compounds detected in the cashew apple juice-model.

CAPÍTULO 5

INFLUÊNCIA DO AQUECIMENTO E ADIÇÃO DE ÁCIDO NA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS A PARTIR DE COMPOSTOS GLICOSILADOS DO CAJU

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Food Chemistry*

RESUMO

Considerando a importância do aroma para a indústria de sucos, informações a respeito de modificações nos compostos voláteis induzidas pelo calor apresentam relevante importância na qualidade do produto final. Em face disto, este trabalho teve por objetivo verificar se ocorre formação de compostos voláteis em sistema-modelo a base de água constituído de compostos glicosilados de caju, acidificado e aquecido a 60 °C por 2 horas. Os compostos voláteis foram obtidos por micro-extração em fase sólida no "headspace" associado a cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (HS-SPME-GC-FID). Foram detectados 49 picos, entretanto 5 deles também estavam presentes no branco. Não houve um aumento significativo dos teores relativos de nenhum destes compostos voláteis, indicando que provavelmente não ocorreu liberação de novos compostos voláteis nas condições avaliadas.

Palavras-chave: caju, voláteis, compostos glicosilados, aquecimento em meio ácido, voláteis livres, HS-SPME-GC-FID

1. INTRODUÇÃO

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma fruta tropical que botanicamente é dividido em duas partes, o fruto propriamente dito que é a castanha, e, o pedúnculo floral denominado pseudofruto. Entre os derivados do pseudofruto destaca-se o suco de caju, muito apreciado no Brasil e no exterior. No entanto, as indústrias que processam o suco de caju enfrentam limitações com relação à aceitação do produto junto ao consumidor, em função das modificações que ocorrem durante o processamento e estocagem, entre elas, a formação de “off-flavor”.

A presença de ligações glicosídicas em compostos voláteis de origem vegetal tem sido amplamente discutida. Estes compostos são considerados precursores de aroma, capazes de liberar substâncias aromáticas por clivagem química ou enzimática, durante o processamento industrial (Boulanger & Crouzet, 2001). Acredita-se que a biodegradação de carotenóides seja catalisada por dioxigenases (Winterhalter, 1996; Wahlberg & Eklund, 1998), embora muitas questões permaneçam não respondidas, especialmente em relação às etapas iniciais de clivagem. A via não enzimática de formação de voláteis a partir de carotenóides inclui oxidação induzida pela luz (Isoe, Hyeon, & Sakan, 1969) ou alta temperatura (Kanasawud & Crouzet, 1990a; 1990b; Scotter, 1995) ou ainda auto-oxidação (Mordi et al., 1993; Lutz-Röder, Jezussek, & Winterhalter, 1999). A importância destas ligações glicosídicas em constituintes voláteis e sua

contribuição no aroma de frutas têm despertado a atenção de vários pesquisadores (Adedeji, Hartman, Lech, & Ho, 1992; Bicalho, Pereira, Aquino-Neto, Pinto, & Rezende, 2000; Boulanger & Crouzet, 2001; Stingl, Knapp, & Winterhalter, 2002; Kilic, Kollmannsberger, & Nitz, 2005; Varming, Andersen, & Poll, 2006).

Um número muito grande de compostos voláteis identificados em frutas, aparentemente derivados de carotenóides, foram formados através da ação de ácido catalisado pelo aquecimento ou por hidrólise enzimática de precursores glicosilados (Varming et al., 2006). Exemplos reconhecidos de voláteis formados a partir de metabólitos de carotenóides são os norisoprenóides. Estes metabólitos de carotenóides estão presentes na forma livre ou ligado glicosidicamente em frutas, tais como em acerola (Boulanger & Crouzet, 2001), maçã (Stingl et al., 2002), manga (Adedeji et al., 1992) e caju (Bicalho et al., 2000). No que se refere ao caju, pesquisas tem dado atenção na utilização deste pseudofruto para desenvolvimento de aromas e/ou otimização de tecnologias para a industrialização de derivados de caju, tais como aromas de bebidas (Bicalho et al., 2000).

Bicalho et al. (2000) avaliaram os compostos glicosilados precursores de voláteis em frutos de caju in natura, encontrando principalmente ácidos cinâmicos, alcoóis aromáticos e de cadeia aberta, todos glicosilados. No entanto, no que se refere à geração de compostos voláteis a partir da degradação de compostos glicosilados de caju submetido a condições ácidas e de aquecimento, não há dados na literatura.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o perfil dos compostos voláteis livres, e a influência do aquecimento e presença de ácido na formação de compostos voláteis a partir dos compostos glicosilados do caju em sistema-modelo aquoso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra

Frutos de caju vermelho (*Anacardium occidentale* L.) provenientes de Petrolina (Pernambuco, Brasil) foram obtidos no estágio maduro no comércio local de Campinas (São Paulo, Brasil), em outubro de 2008. Após separação da castanha, a pele foi retirada, as polpas foram homogeneizadas e mantidas sob refrigeração a -35 °C para posterior análise.

2.2. Isolamento dos voláteis livres e compostos glicosilados do caju

Uma amostra de 700 g de polpa de caju foi misturada com 175 ml de água Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA) e centrifugada (30 min, 10000xg) a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1, e a seguir foi fracionado em coluna de Amberlite XAD-2 (80 × 4 cm) de acordo com a metodologia proposta por Günata, Bayonove, Baumes, & Cordonnier (1985).

A coluna foi lavada com 4000 mL de água destilada para eliminar açúcares, ácidos e outros compostos hidrossolúveis. A fração contendo os compostos voláteis livres foi eluída com 500 mL de pentano/diclorometano (2:1) com fluxo de 2 mL/min, recolhida e concentrada por destilação com banho de água quente (40 °C), e mantida a -35 °C até o momento das análises por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID). Os compostos ligados glicosidicamente foram eluídos com 1000 mL de metanol, e esta fração foi concentrada em evaporador rotatório ($T < 40\text{ °C}$), redissolvida em 200 mL de água Milli-Q (Millipore, Billerica, USA), liofilizada e pesada.

2.3. *Sistemas-modelo com compostos glicosilados de caju*

Os sistemas-modelo foram elaborados dissolvendo em banho sonicator (Modelo T1440, Thorton, Brasil) 0,2 g do extrato liofilizado de compostos glicosilados de caju em 5 mL de metanol que foram dispersos em 25 mL de solução aquosa acidificada a pH 3,8 com ácido cítrico 0,5 M.

Considerando que a literatura reporta que as ligações glicosídicas são rompidas preferencialmente por via enzimática ou química (Adedeji *et al.*, 1992; Ortiz-Serrano & Gil, 2007), o controle foi elaborado exatamente como descrito acima, porém sem adição de ácido cítrico na solução aquosa. Protocolo similar foi seguido para o sistema (branco), elaborado com 5 mL de metanol e 25 mL de água Milli-Q acidificada pH 3,8 com 0,5 M de ácido cítrico, no entanto sem adição dos compostos glicosilados.

Todos os sistemas foram transferidos para frascos de vidro (120 mL) selados com septo de teflon e submetidos ao aquecimento por 2 h a 60 °C, seguido de resfriamento em água corrente.

2.4. Análise dos voláteis por GC-FID

Os compostos voláteis dos sistemas com compostos glicosilados de caju foram extraídos por micro-extração em fase sólida (SPME) utilizando a fibra divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) fornecida pela Sulpeco (Bellefont, Estados Unidos). O sistema SPME foi inserido no frasco onde a fibra foi exposta ao "headspace" do sistema simulador por 30 minutos sob agitação magnética à temperatura ambiente. A fibra foi removida do frasco e imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID).

Um volume de 1 µL da fração dos compostos voláteis livres foi injetado de maneira convencional utilizando microseringa.

Independentemente do sistema, os compostos voláteis foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-Wax, J & W (Folsom, Estados Unidos) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada no cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010 (Quioto, Japão). O injetor, no modo splitless, foi mantido a 230 °C e o detector de ionização de chama (FID) a 250 °C. Hidrogênio foi usado como gás de arraste a 1,5 mL/min. A programação de temperatura do forno utilizada foi 40 °C por 15 min, elevação até 210 °C a 4 °C/min e mantida por 17 min.

O Índice de Kovats foi calculado usando uma mistura padrão de alcanos (C₇ a C₃₀ Polyscience, Estados Unidos). Foi injetado 2 µL da mistura de alcanos em hexano nas mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Compostos voláteis livres*

A Figura 1 apresenta o cromatograma dos compostos da fração dos voláteis livres do caju, e as características destes compostos encontram-se na Tabela 1.

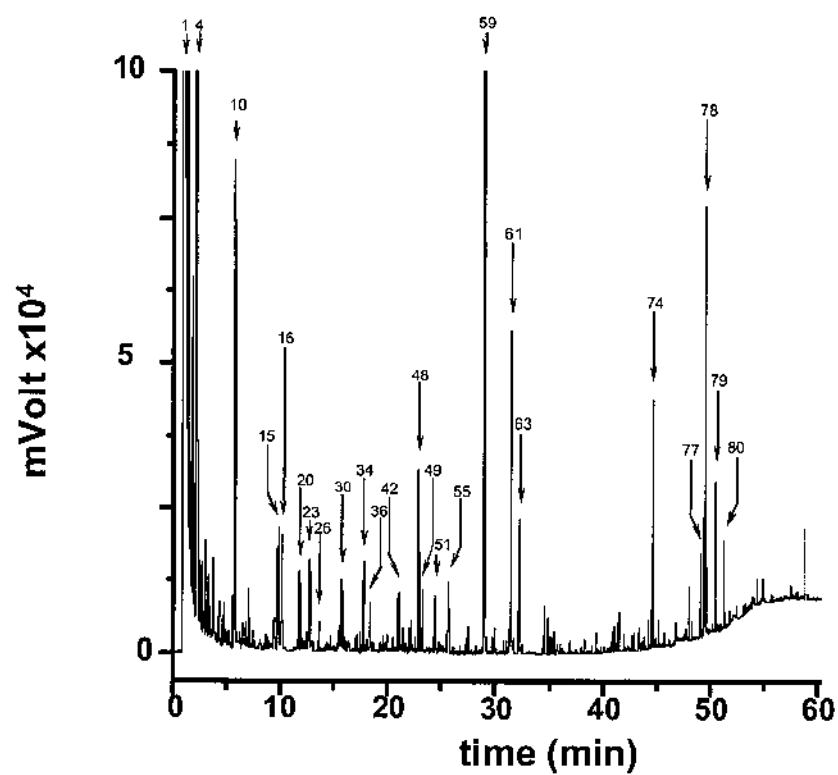


Fig. 1. Cromatograma, obtido por GC-FID, da fração dos compostos voláteis livres do caju *in natura*. Condições cromatográficas no texto. A caracterização dos picos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos voláteis detectados na fração de voláteis livres, e nos sistemas-modelo de compostos glicosilados de caju aquecidos a 60 °C por 2 h.

Pico ^a	índice de Kovats - coluna DB-Wax (identificação tentativa)	mVolt (% área)			
		fração voláteis livres	sistema branco	sistema com compostos glicosilados de caju	
				sem ácido	com ácido
1	<1000	21,5 (9,5)	n.d	n.d	n.d
2	<1000	n.d	24,2 (16,3)	179,7 (2,5)	< 75,9 (< 1,2)
3	<1000	n.d	43,1 (29,0)	438,4 (6,1)	132,8 (2,1)
4	<1000	17,6 (7,8)	n.d	n.d	n.d
5	1012	n.d	n.d	431,2 (6,0)	322,5 (5,1)
6	1072	n.d	n.d	100,6 (1,4)	113,8 (1,8)
7	1077 (3-metil-etil- butirato)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	75,9 (1,2)
8	1083	n.d	n.d	93,4 (1,3)	101,2 (1,6)
9	1109	n.d	n.d	1135,7 (15,8)	1062,6 (16,8)
10	1119	16,9 (7,2)	n.d	n.d	n.d
11	1125 (<i>p</i> -xileno)	n.d	n.d	100,6 (1,4)	113,9 (1,8)
12	1139	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
13	1180 (3-metil-etil- pentanoato)	n.d	n.d	86,2 (1,2)	75,9 (1,2)
14	1186	n.d	n.d	115 (1,6)	113,8 (1,8)
15	1195 (3-hexanol)	11,7 (5,2)	n.d	n.d	n.d
16	1202	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
17	1210 (1-etil-3-metil- benzeno)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
18	1215 (<i>trans</i> -2- hexenal)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
19	1230 (2-metil-etil -2- butenoato)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)

Cont. Tabela 1. Compostos voláteis detectados na fração de voláteis livres, e nos sistemas-modelo de compostos glicosilados de caju aquecidos a 60 °C por 2 h.

Pico ^a	índice de Kovats – coluna DB-Wax (identificação tentativa)	mVolt (% área)			
		fração voláteis livres	sistema branco	sistema com compostos glicosilados de caju	
				sem ácido	com ácido
20	1233 (1-etil-2,3- dimetil-benzeno)	4,9 (1,9)	n.d	n.d	n.d
21	1235 (3-metil-1- butanol)	n.d	n.d	115,1 (1,6)	126,5 (2,0)
22	1248	n.d	< 3,5 (< 2,4)	n.d	n.d
23	1250 (1-dodeceno)	3,1 (1,4)	n.d	n.d	n.d
24	1256	n.d	n.d	115,0 (1,6)	107,5 (1,7)
25	1261	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
26	1265	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
27	1274 (2-metil- hexenoato)	n.d	n.d	107,8 (1,5)	113,9 (1,8)
28	1284	n.d	23,5 (15,8)	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
29	1290 (2-etil-1- hexanol)	n.d	n.d	(4,3)	290,9 (4,6)
30	1297	2,9 (1,3)	n.d	n.d	n.d
31	1324	n.d	n.d	352,2 (4,9)	328,9 (5,2)
32	1337 (1-etil-2,3- dimetil-benzeno)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	75,9 (1,2)
33	1350 (5-etil- <i>p</i> -xileno)	n.d	n.d	86,2 (1,2)	88,6 (1,4)
34	1355	n.d	n.d	n.d	n.d
35	1368	n.d	n.d	215,6 (3,0)	202,4 (3,2)
36	1373	2,9 (1,3)	n.d	n.d	n.d
37	1390 (2-butoxi- etanol)	n.d	n.d	115,0 (1,6)	121,3 (1,9)

Cont. Tabela 1. Compostos voláteis detectados na fração de voláteis livres, e nos sistemas-modelo de compostos glicosilados de caju aquecidos a 60 °C por 2 h.

Pico ^a	índice de Kovats – coluna DB-Wax (identificação tentativa)	mVolt (% área)			
		fração voláteis livres	sistema branco	sistema com compostos glicosilados de caju	
				sem ácido	com ácido
38	1397 (1,2,4,5-tetra- metil-benzeno)	n.d	n.d	108,5(1,5)	95,9 (1,5)
39	1409 (1,2,3,4-tetra- metil-benzeno)	n.d	n.d	107,8 (1,5)	95,9 (1,5)
40	1438 (1-octen-3-ol)	n.d	n.d	86,2 (1,2)	75,9 (1,2)
41	1449 (ácido acético)	n.d	n.d	86,2 (1,2)	75,9 (1,2)
42	1455	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
43	1463	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	107,5 (1,7)
44	1478	n.d	n.d	115,0 (1,6)	101,2 (1,6)
45	1495	n.d	n.d	219,2 (3,0)	215,0 (3,4)
46	1510	n.d	n.d	215,6 (3,0)	196,1 (3,1)
47	1588	n.d	n.d	610,9 (8,5)	608,8 (9,6)
48	1538 (ácido 2-metil- butírico)	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
49	1548	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
50	1599	n.d	n.d	138,4 (1,9)	120,2 (1,9)
51	1605	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
52	1620	n.d	n.d	136,5 (1,9)	132,8 (2,1)
53	1630	n.d	4,3 (2,9)	n.d	n.d
54	1641	n.d	n.d	201,2 (2,8)	202,4 (3,2)
55	1667 (<i>trans</i> -2- nonenal)	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
56	1670	n.d	n.d	100,6 (1,4)	101,2 (1,6)
57	1721	n.d	n.d	86,2 (1,2)	75,9 (1,2)

Cont. Tabela 1. Compostos voláteis detectados na fração de voláteis livres, e nos sistemas-modelo de compostos glicosilados de caju aquecidos a 60 °C por 2 h.

Pico ^a	índice de Kovats - coluna DB-Wax (identificação tentativa)	mVolt (% área)			
		fração voláteis livres	sistema branco	sistema com compostos glicosilados de caju	
				sem ácido	com ácido
58	1806	n.d	27,5 (18,5)	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
59	1880	98,4 (43,5)	n.d	n.d	n.d
60	1886	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
61	1895	9,1 (4,0)	n.d	n.d	n.d
62	1972	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
63	> 2005	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
64	2141 (eugenol)	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
65	2162	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
66	2205	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
67	2236	n.d	12,2 (8,2)	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
68	2305	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
69	> 2500	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
70	> 2500	n.d	< 3,5 (< 2,4)	n.d	n.d
71	> 2500	n.d	n.d	< 86,2 (< 1,2)	< 75,9 (< 1,2)
72	> 2500	n.d	3,6 (< 2,4)	n.d	n.d
73	> 2500	n.d	< 3,5 (< 2,4)	n.d	n.d
74	> 2500	3,4 (1,5)	n.d	n.d	n.d
75	> 2500	n.d	< 3,5 (< 2,4)	n.d	n.d
76	> 2500	n.d	< 3,5 (< 2,4)	n.d	n.d
77	> 2500	5,6 (2,5)	n.d	n.d	n.d
78	> 2500	9,5 (4,2)	n.d	n.d	n.d
79	> 2500	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
80	> 2500	< 2,9 (< 1,3)	n.d	n.d	n.d
total		226,2 (100)	145,8 (100)	7184,0 (100)	6325,0 (100)

^a Picos numerados de acordo com os cromatogramas das Figuras 1 e 2.

n.d não detectado

Um total de 23 picos foi detectado na fração de voláteis livres eluída da coluna XAD-2. Nesta fração dos compostos voláteis livres, o pico 59 foi o majoritário com 43,5% da área total, detectada pelo FID.

A literatura apresenta vários trabalhos sobre separação de voláteis de caju *in natura* e de produtos processados do pseudofruto de caju utilizando diferentes colunas cromatográficas, tais como: coluna DB-WAX (Valim, Rouseff, & Lin, 2003), VA-WAX (Garruti, Franco, Da Silva, Jazantti, & Alves, 2003; Garruti, Franco, Da Silva, Jazantti, & Alves 2006), HP-5 (Bicalho, *et al.*, 2000), e CP-WAX-57CB (Maciel, Hansen, Scott, & Labows, 1986). Estes trabalhos demonstram a existência de considerável variação no número e tipo de compostos voláteis observados nas amostras de caju. Estas diferenças podem ser atribuídas a um grande número de fatores, incluindo diferenças nas condições cromatográficas, de cultivar, de processamento da amostra (*in natura* ou processada) e principalmente diferenças na preparação de amostras.

Por comparação com os valores de índice de Kovats reportados por Valim *et al.* (2003), o pico 48 corresponde ao ácido 2-metil-butírico, o pico 55 ao *trans*-2-nonenal. O ácido 2-metil-butírico foi descrito como sendo aroma de caju e de fruta madura, enquanto que o *trans*-2-nonenal foi relacionado aos descritores de aroma como sabão, floral e doce (Valim *et al.*, 2003). Estes compostos foram também identificados no pseudofruto de caju *in natura*; entretanto, o ácido 2-metil-butírico foi descrito como suor e sujo, e o *trans*-2-nonenal como aroma de castanha, doce e floral, ambos compostos reportados como importantes contribuintes do aroma

global de caju (Garruti *et al.*, 2003). Por comparação dos valores do índice de Kovats, os picos 15, 20 e 23 correspondem, respectivamente, aos compostos 3-hexanol (Garruti *et al.*, 2003), 2,3-dimetil-1-etil-benzeno e 1-dodeceno (Zepka, Mercadante & Da Silva, 2009).

3.2. Compostos voláteis derivados de glicosilados de caju

Os cromatogramas dos compostos voláteis detectados nos sistemas com compostos glicosilados de caju aquecidos por 2 h a 60 °C, com e sem a adição de ácido foram muito similares (Figura 2).

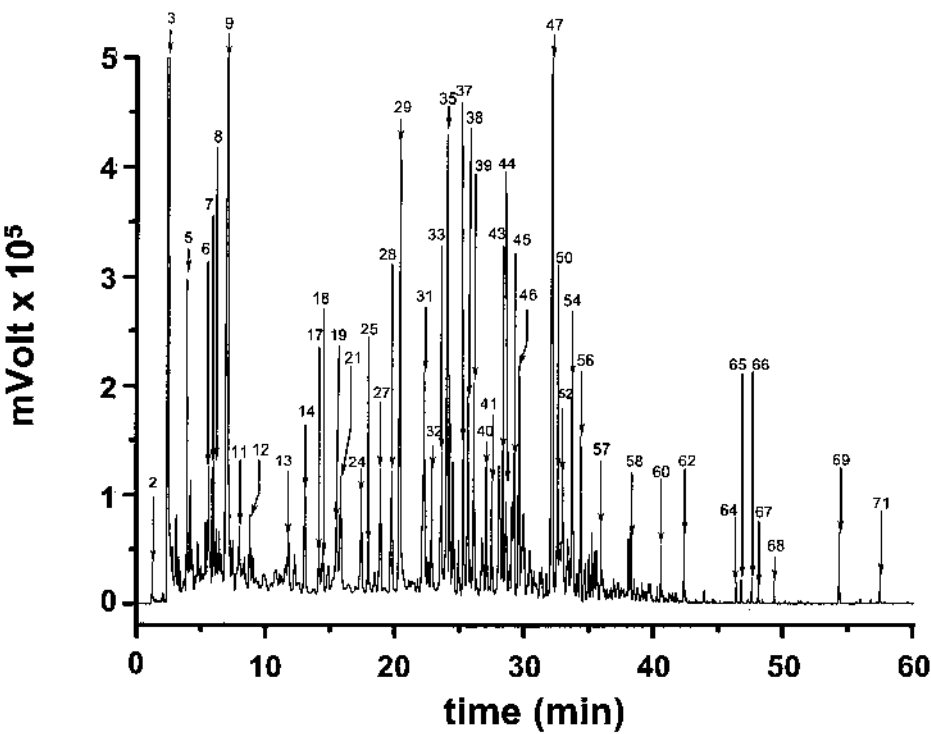


Fig. 2. Cromatograma, obtido por SPME-GC-FID, do sistema com compostos glicosilados de caju acidificado e aquecido por 2 h a 60 °C. Condições cromatográficas: ver texto. A caracterização dos picos está apresentada na Tabela 1.

O procedimento utilizado para separação da fração dos voláteis livres da contendo os compostos glicosilados de caju foi eficiente, considerando nenhum dos 23 picos de voláteis livres foram detectados nos sistemas com compostos glicosilados de caju.

No "headspace" dos sistemas com compostos glicosilados de caju (com e sem ácido) foram detectados 49 compostos voláteis (Tabela 1), porém 5 destes picos, os de números 2, 3, 28, 58 e 67, foram também detectados no branco do sistema-modelo, sugerindo que estes compostos são artefatos produzidos pelo aquecimento dos solventes utilizados para a elaboração do sistema.

Comparando os valores de índice de Kovats encontrados neste trabalho para os picos 7, 11, 13, 17, 18, 21, 27, 29, 33, 37, 38, 40, 41 e 64 com dados da literatura (Garruti *et al.*, 2003; Garruti *et al.*, 2006; Valim *et al.*, 2003; Zepka *et al.*, 2009), estes compostos foram tentativamente identificados como 3-metil-etil-butirato, *p*-xileno, 3-metil-etil-pentanoato, 1-etil-3-metil-benzeno, *trans*-2-hexenal, 2-metil-2-etil-butenóato, 3-metil-1-butanol, 2-metil-hexenoato, 2-etil-1-hexanol, 5-etil-*p*-xileno, 2-butoxi-etanol, 1,2,4,5-tetra-metil-benzeno, 1,2,3,4-tetra-metil-benzeno, 1-octen-3-ol, ácido acético e eugenol, respectivamente.

Estes compostos já foram descritos como sendo parte do perfil de aroma em néctares de caju pasteurizado e reconstituído a partir da concentração térmica. O 3-metil-etil-butirato foi descrito como caju, doce, frutal, fruta madura (Valim *et al.*, 2003) e foi detectado como composto majoritário em bebida alcoólica fermentada de caju. Os compostos 3-metil-etil-pentanoato (doce, caju, frutal),

trans-2-hexenal (castanha, doce, floral), 3-metil-1-butanol (fumaça, caju maduro, desagradável) e 2-butoxi-etanol (caju) foram detectados no perfil de aroma de suco *in natura* de caju (Garruti *et al.*, 2003). O 1-octen-3-ol foi descrito como cogumelo e relacionado com a modificação do aroma natural da fruta em função do processamento térmico (Valim *et al.*, 2003), sendo detectado nos néctar de caju pasteurizado e em nectar de caju reconstituído a partir da concentração térmica. O ácido acético foi descrito como ácido e o eugenol como cravo, especiaria (Valim *et al.*, 2003), encontrados nos dois tipos de néctares estudados (pasteurizados e reconstituído). O ácido acético também foi detectado no perfil de aroma de bebida alcoólica fermentada de caju e descrito como acético, ácido, fruta fermentada (Garruti *et al.*, 2006). O eugenol foi identificado como composto de aroma derivado de compostos glicosilados de manga (Adedeji *et al.*, 1992), tomate (Ortiz-Serrano & Gil, 2007) e louro (Kilic *et al.*, 2005).

A adição de ácido não resultou na formação de novos compostos voláteis derivados dos compostos glicosilados, pois não foi verificada diferença qualitativa no perfil cromatográfico dos voláteis do "headspace" dos sistemas com e sem ácido. Dos 44 compostos detectados nos sistemas com compostos glicosilados de caju sem ácido ou adicionado de ácido, 25 compostos apresentaram um pequeno aumento no percentual de área no sistema com ácido; entretanto não houve aumento na área total dos picos medida em mVolts. Os compostos majoritários nos 2 sistemas foram os picos 9 e 47. No sistema sem ácido os picos 9 e 47

apresentavam 1135,7 e 610,9 mVolt enquanto que na presença de ácido foram detectados os valores de 1062,6 e 608,8 mVolt, respectivamente.

Em resumo, estes dados preliminares indicam que a composição de voláteis da primeira fração eluída da coluna XAD-2, correspondente aos voláteis livres, difere qualitativamente dos voláteis detectados na fração de compostos glicosilados de caju. Além disso, os resultados indicam que provavelmente o ácido não foi responsável pela liberação de novos compostos voláteis derivados dos compostos glicosilados de caju nas condições avaliadas (0,5 M de ácido acético, 60 °C por 2 h).

4. REFERÊNCIAS

- Adedeji, J., Hartman, G. T., Lech, J., & Ho, C-T. (1992). Characterization of glycosidically bound aroma compounds in the African mango (*Mangifera indica* L.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 40, 659-661.
- Bicalho, B., Pereira, A. S., Aquino Neto, F. R., Pinto, A. C., & Rezende, C. M. (2000). Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L. Va., *nanum*) volatiles. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1167-1174.

- Boulanger, R., & Crouzet J., (2001). Identification of the aroma components of acerola (*Malphigia glabra* L.): free and bound flavour compounds. *Food Chemistry*, 74, 209-216.
- Garruti, D. S., Franco, M. R. B., Da Silva, M. A. A. P., Janzantti, N. S., & Alves, G. A. (2003). Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by Osme gas chromatography/olfactometry technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1455-1462.
- Garruti, D. S., Franco, M. R. B., Da Silva, M. A. A. P., Janzantti, N. S., & Alves, G. A. (2006). Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC-MS and GC-olfatometric. *Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, 39, 372-377.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, L. R., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes: I. extraction and determination of free and glicosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of chromatography*, 331, 83-90.
- Isoe, S., Hyeon, S. B., & Sakan, T. (1969). Photo-oxygenation of carotenoids. I. The formation of dihydroactinidiolide and β -ionone from β -carotene. *Tetrahedron Letter*, 10, 279-281.
- Kanasawud, P., & Crouzet, J. C. (1990a). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 237-243.

- Kanasawud, P., & Crouzet, J. C. (1990b). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2. Lycopene degradation *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1238-1242.
- Kilic, A., Kollmannsberger, H., & Nitz, S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2231-2235.
- Lutz-Roder, A., Jezussek, M., & Winterhalter, P. (1999). Nickel peroxide induced oxidation of canthaxanthin. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1887-1891.
- Maciel, M. I., Hansen, T. J., Aldinger, S. B., & Labows, J. N. (1986). Flavor chemistry of cashew apple juice. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 34, 923-927.
- Macleod, A. J., & Troconis, N. G. (1982). Volatile flavour components of cashew apple (*Anacardium occidentale*). *Phytochemistry*, 10, 2527-2530.
- Mordi, R., Walton, J., Burton, G., Hughes, L., Ingold, K., Lindsay, D., Moffatt, D. (1993). Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8-carotenal. *Tetrahedron*, 49, 911-928.
- Valim, F. M., Russel. L., & Lin, J. (2003). Gas Chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1010-1015.

- Varming, C., Andersen, M. L., & Poll, L. (2006). Volatile monoterpenes in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice: Effects of heating and enzymatic treatment by β -glucosidase. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2298-2302.
- Ortiz-Serrano, P., & Gil, V. J. (2007). Quantitation of free and glycosidically bound volatiles in and effect of glycosidase addition on three tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9170-9176.
- Stingl, C., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2002). 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro-beta-ionone 3-O-beta-D-glucopyranoside and other glycosidic constituents from apple leaves. *Natural Products Letters*, 16, 87-93.
- Scotter, M. J. (1995). Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chemistry*, 53, 177-185.
- Wahlberg, i.; Eklund, A.-M. (1998). Degraded carotenoids. In: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander birkhäuser, *Carotenoids, vol 3: Biosynthesis and metabolism*, (pp. 195-216). Basel.
- Winterhalter, P. (1996). *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*. pp. 295-308. In Takeoda, G.; Teranish, R.; Kobayashi, A. ACS Symp..
- Zepka, L. Q., Mercadante, A. Z. & Da Silva, M. A. A. P. (2009). Aroma compounds formed from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice system, (manuscript in preparation).

CONCLUSÃO GERAL

O perfil de carotenóides do sistema simulador de suco de caju, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de díodos e de massas, apresentou 19 carotenóides, sendo *all-trans*- β -criptoxantina e *all-trans*- β -caroteno os majoritários.

Em consequência do aquecimento a 60 e 90 °C do sistema simulador de suco de caju, *cis*-neoxantina, neocromo, *cis*-violaxantina, *all-trans*- α -criptoxantina e luteína desapareceram enquanto isômeros *cis* (*cis*-luteína e 15-*cis*- β -caroteno) e 5,8-furanóide-derivados (auroxantina, mutatoxantina, e 5,8-epóxi- β -caroteno) foram formados. Os carotenóides luteoxantina e 12'-apo- β -caroten-12'-al foram formados a 90 °C.

A reação de isomerização da configuração *trans* para a *cis*, acompanhada do rearranjo epóxi-furanóide e da formação de compostos de oxidação explicaram o mecanismo de degradação da β -criptoxantina tanto em sistemas com padrão de β -criptoxantina quanto nos sistemas simuladores de suco de caju. O comportamento cinético bifásico da degradação dos carotenóides e das mudanças de cor indicou que as reações reversíveis (isomerização) e irreversíveis (compostos de oxidação) ocorreram paralelamente.

Foi verificada uma boa correlação entre a degradação dos carotenóides e as variações nos parâmetros de cor, sugerindo que o monitoramento da propriedade física de cor pode ser uma importante ferramenta para o controle de

qualidade em tempo real do processamento térmico do suco de caju. A determinação do ΔE^* pode ser um bom preditor da degradação de *all-trans*- β -criptoxantina e *all-trans*- β -caroteno durante o processamento térmico do suco de caju.

Vários compostos voláteis, tais como xileno, 6-metil-undecano, 5-metil-undecano, 4-metil-undecano, 3-metil-undecano, 2-metil-undecano, *p*-cresol, dimetil-stireno, *p*-xileno, *p*-cimene, dodecano, 1-dodeceno, tetradecano, 1,3,5-trimetil-benzeno, 2-etil-*p*-xileno, 2,5-diisopropilfenol, 1,2,3-trimetil-benzeno, 1-(4-etoxi-2-hidroxifenil)-1-octadecanona e naftaleno, foram detectados no headspace do do sistema simulador de suco de caju. As características estruturais destes compostos indicaram que foram provavelmente formados a partir da degradação térmica da cadeia poliênica dos carotenóides

Os resultados iniciais indicaram que provavelmente não ocorreu liberação de novos compostos voláteis durante aquecimento dos compostos glicosilados de caju a pH 3,8 a 60 °C por 2 h.