



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE - CE
MESTRADO EM TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

FELIPE SOUSA DA SILVA

COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM REFRESCO
MISTO COM FRUTA E HORTALIÇA

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI

Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- S586c Silva, Felipe Sousa da.
Composição e Estabilidade de Compostos Voláteis em Refresco Misto com Frutas e Hortalíça / FelipeSousa da Silva. - 2022.
70 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia de Alimentos, CampusLimoeiro do Norte, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Maria Aparecida Liberato Milhome.
1. MicroExtração em Fase Sólida. 2. Cromatografia Gasosa. 3. Perfil de Voláteis. 4. Controle deQualidade. I. Título.

CDD 664

FELIPE SOUSA DA SILVA

**COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM REFRESCO
MISTO COM FRUTA E HORTALIÇA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará – Campus Limoeiro do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida
Liberato Milhome

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2022



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ

Rua Estevão Remígio de Freitas, 1145 - Bairro Centro - CEP 62930-000 - Limoeiro do Norte - CE - www.ifce.edu.br

FELIPE SOUSA DA SILVA

COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM REFRESCO MISTO COM FRUTA E HORTALIÇA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará Campus Limoeiro do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em: 09/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Liberato Milhome (Orientadora)
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará
Campus Limoeiro do Norte

Prof^ª. Dr^ª Séfura Maria Assis Moura
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará
Campus Limoeiro do Norte

Prof^ª. Dr^ª. Virna Luiza de Farias
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará
Campus Limoeiro do Norte



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Liberato Milhome**, **Coordenador(a) de Mestrado em Tecnologia de Alimentos**, em 10/03/2022, às 19:31, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virna Luiza de Farias**, **Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 10/03/2022, às 19:54, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Séfura Maria Assis Moura**, **Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 11/03/2022, às 18:52, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade do documento pode ser conferida no site https://sei.ifce.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **3499568** e o código CRC **63891948**.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, Antônio Raimundo de Sousa e Francisca Zeuda de Sousa Silva, pelo incentivo inigualável na busca pelo conhecimento e pela formação acadêmica; às minhas irmãs, Sandra Eulência de Sousa Silva e Sabrina de Sousa Silva, pela preocupação e pelo carinho acima de qualquer coisa. Vivemos experiências valiosas que abriram e ainda abrem tantas portas no meu caminho.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Liberato Milhome, pela dedicação e pela confiança em mim.

Agradeço aos Professores do Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Alimentos, pela amizade, pela parceria nessa jornada aparentemente interminável e pelas contribuições individuais, uma vez que elas exemplificaram e moldaram, por semelhança ou por total aversão, exatamente o tipo de profissional que eu gostaria de me tornar.

Aos meus colegas/amigos Sheyla Maria Barreto Amaral, Ana Paula Ferreira e Raimunda Valdenice da Silva Freitas, por tornar a labuta diária, antes e durante a pandemia, mais tranquila e divertida.

Aos meus colegas de mestrado, pelas parcerias durante as pesquisas realizadas e momentos de convivências nos Laboratórios de Bromatologia.

Aos amigos colaboradores Crisiana de Andrade Nobre, Renata de Oliveira Silva e Vitor Paulo de Andrade Silva, pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Ultravioleta-Visível e Cromatografia Gasosa acoplado por Espectrometria de Massa.

A todos que sempre estiveram ao meu lado, direta ou indiretamente contribuindo para o meu crescimento profissional e para o desenvolvimento da minha dissertação.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará – Campus Limoeiro do Norte e ao Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará (NUTEC), pela disponibilidade na utilização das instalações essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro.

“- As pessoas te botam pra baixo, você começa a acreditar.
- Te acho muito inteligente. Uma mulher muito especial.
- As coisas ruins são mais fáceis de acreditar.”

Uma Linda Mulher

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a composição e a qualidade de Refresco Misto constituído de fruta e hortaliça, através da análise do perfil de compostos voláteis e do estudo da estabilidade destes constituintes no produto. Polpa de abacaxi, couve-manteiga, gengibre, limão-tahiti e água potável foram utilizados para elaboração do Refresco sendo posteriormente filtrado (0,2 mesh) e armazenado em refrigeração a 10 °C. As características físico-químicas (pH, sólidos solúveis, acidez titulável e *ratio*) foram verificadas nas amostras e dois métodos para determinação de ácido cítrico foram utilizados: método volumétrico (acidez titulável) e método cromatográfico (cromatografia líquida), expressos em g.100 mL⁻¹. A identificação dos compostos voláteis foi realizada por meio da MicroExtração em Fase Sólida (MFS) e da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM). Três fibras (PA, PDMS-CAR e PDMS-DVB) foram avaliadas, em diferentes condições de extração: tempo de exposição (20 e 30 min) e temperatura (65 e 85 °C). O estudo da estabilidade foi realizado no período de 15 dias, seguindo as condições cromatográficas selecionadas após a otimização da técnica de extração. Os resultados dos parâmetros físico-químicos revelaram pH de 3,03, 3,05 °Brix, acidez apresentaram 6,84 e 8,65 g.100⁻¹ mL em ácido cítrico e *ratio* entre 0,35-0,45. Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois métodos usados para determinar o ácido cítrico, cujos valores são provenientes da interação de outros ácidos orgânicos naturalmente encontrados em frutas e vegetais. A fibra selecionada (PA, 65 °C / 20 min) foi capaz de extrair 90 compostos voláteis, com elevada intensidade em 16 picos majoritários que compõem o perfil volátil, dividido em seis classes químicas: aldeído, álcool, organossulfurado, ésteres, ácido carboxílico e terpenos e terpenoides. A partir do estudo, a maioria dos compostos apresentaram estabilidade no período entre o 3º e o 5º dia, podendo alegar a validade e a qualidade para o consumo do produto. Logo, este estudo qualitativo apresentou resultados satisfatórios, evidenciado que as técnicas abordadas são aplicáveis para este tipo de produto alimentício de composição complexa, sendo possível identificação de compostos, os quais mostraram estabilidade durante um curto período de consumo.

Palavras-chaves: MicroExtração em Fase Sólida, Cromatografia Gasosa, Perfil de Voláteis, Controle de Qualidade

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the composition and quality of Mixed Refreshment consisting of fruit and vegetables, through the analysis of the profile of volatile compounds and the study of the stability of these constituents in the product. Pineapple pulp, kale, ginger, lime and drinking water were used to prepare the Refreshment, which was then filtered (0.2 mesh) and stored under refrigeration at 10 °C. The physicochemical characteristics (pH, soluble solids, titratable acidity and ratio) were verified in the samples and two methods for citric acid determination were used: volumetric method (titratable acidity) and chromatographic method (liquid chromatography), expressed in g.100 mL⁻¹. The identification of volatile compounds was performed using Solid Phase Microextraction (MFS) and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). Three fibers (PA, PDMS-CAR and PDMS-DVB) were evaluated under different extraction conditions: exposure time (20 and 30 min) and temperature (65 and 85 °C). The stability study was carried out over a period of 15 days, following the chromatographic conditions selected after the optimization of the extraction technique. The results of the physical-chemical parameters revealed pH of 3.03, 3.05 °Brix, acidity presented 6.84 and 8.65 g.100⁻¹ mL in citric acid and ratio between 0.35-0.45. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the two methods used to determine citric acid, whose values derive from the interaction of other organic acids naturally found in fruits and vegetables. The selected fiber (PA, 65 °C / 20 min) was able to extract 90 volatile compounds, with high intensity in 16 major peaks that make up the volatile profile, divided into six chemical classes: aldehyde, alcohol, organosulfur, esters, carboxylic acid and terpenes and terpenoids. From the study, most of the compounds showed stability in the period between the 3rd and 5th day, being able to claim the validity and the quality for the consumption of the product. Therefore, this qualitative study presented satisfactory results, showing that the techniques discussed are applicable to this type of food product with a complex composition, making it possible to identify compounds, which showed stability during a short period of consumption.

Keywords: Solid Phase Microextraction, Gas Chromatography, Volatile Profile, Quality Control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens ilustrativas de bebidas mistas ou "sucos verdes" industrializadas.....	18
Figura 2 - Ilustração da unidade isoprênica.....	21
Figura 3 - Estrutura química de alguns compostos voláteis em frutas e raiz.....	22
Figura 4 - Esquema das fases de extração do vial de Headspace.....	24
Figura 5 - Descrição do processo de extração MFS-HS. (A) Escolha da fibra, (B) Introdução da agulha no vial, (C) Exposição da fibra, (D) Extração dos analitos, (E) Recolhimento da fibra na agulha e (F) Dessorção no GC.....	25
Figura 6 - Esquema dos principais componentes dos instrumentos GC-MS.....	27
Figura 7 - Ilustração do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Ultravioleta-visível... 30	
Figura 8 - Sistema de extração para HS-SPME. (A) Agulha instrumental SPME contendo a fibra, (B) Vial ou frasco septo e (C) Bloco de alumínio em forno.....	31
Figura 9 - Ilustração do Cromatógrafo Gasoso Acoplado à Espectrometria de Massa.....	33
Figura 10 - Fluxograma da análise de estabilidade de CV's em um período de 15 dia.....	34
Figura 11 - Cromatograma do pico (1000 mg.L ⁻¹) na curva analítica de ácido cítrico obtido por CLAE-UV.	37
Figura 12 - Representação gráfica da curva analítica de ácido cítrico.	38
Figura 13 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas da identificação dos compostos voláteis do teste entre as três fibras PA, PDMS-CAR e PDMS-DVB	40
Figura 14 - Representação gráfica dos números de picos identificados por fibra de MicroExtração em fase sólida.....	41
Figura 15 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas da identificação dos compostos voláteis em diferentes tempos de exposição (30 e 20 min) nas temperaturas de: 65 °C (A) e 85 °C (B).....	42
Figura 16 - Representação gráfica da variação da área (%) em função do número de compostos durante a otimização de tempo de exposição (20 e 30 min) e temperatura extração a 65°C (A) e 85°C (B).....	43
Figura 17 - Cromatograma dos Compostos Orgânicos Voláteis identificados de acordo com as condições de extração HS-SPME estabelecidas no estudo, 65 °C por 20 minutos.....	44
Figura 18 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas na identificação dos compostos voláteis no Refresco Misto a partir das condições de extração definidas no estudo ao longo do período de armazenamento de 15 dias.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos das análises físico-químicos do Refresco Misto.....	35
Tabela 2 - Perfil de compostos majoritários voláteis do Refresco Misto.	45
Tabela 3 - Valores da área cromatográfica dos compostos voláteis que compõem o perfil volátil do Refresco Misto, mostrando o percentual de degradação de cada composto após 15 dias.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT – Acidez Titulável

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Ultravioleta-Visível

CV's – Compostos Voláteis

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

HS – *Headspace*

MFS – MicroExtração em Fase Sólida

PA – Poliavrilato

PDMS-CAR – Polidimetilsiloxano-Carboxen

PDMS-DVB – Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno

VC's – *Volatile Compounds*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1. Bebidas mistas de frutas e/ou hortaliças.....	18
4.2. Compostos Voláteis- CV's	20
4.3. Extração e identificação de Compostos Voláteis	23
4.3.1. MicroExtração em Fase Sólida – <i>Headspace (HS-SPME)</i>	23
4.3.2. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GS-MS).....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. Obtenção das matérias-primas	28
5.2. Processamento do Refresco Misto	28
5.3. Análises físico-químicas.....	28
5.4. Determinação de ácido cítrico por CLAE-UV	29
5.4.1. Reagentes, soluções e curva analítica.....	29
5.4.2. Preparo de amostra	29
5.4.3. Condições cromatográficas	30
5.5. Análise dos Compostos Voláteis-CV's por CG-MS	31
5.5.1 Seleção da fibra de SPME.....	31
5.5.2. Otimização das condições de extração por <i>HS-SPME</i>	32
5.5.3. Condições do método GC-MS	32
5.6. Estudo da estabilidade dos CV's.....	33
5.7. Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6.1. Análises físico-químicas da amostra	35
6.1.1. pH, sólidos solúveis, acidez e <i>ratio</i>	35
6.1.2. Análise de ácido cítrico por CLAE-UV	37
6.2 Análise de CV's no Refresco Misto.....	39
6.2.1 Otimização do método de extração	39
6.2.2. Perfil de compostos voláteis no Refresco Misto	44

6.3. Estudo de estabilidade dos CV's.....	49
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

As bebidas mistas são feitas combinando uma variedade de frutas, vegetais ou ambos, e podem ser preparadas em um ambiente doméstico ou industrial. Além disso, é de suma importância destacar que os consumidores buscam benefícios nutricionais nesses produtos quando os ingerem.

As bebidas não alcoólicas feitas de frutas e outros vegetais também estão ganhando popularidade no Brasil, principalmente no setor de sucos/refrescos, com um aumento de produção de 492 milhões de litros até 2018. Os consumidores destacaram os aspectos mais importantes do produto, como conveniência, sabor, inovação e praticidade, além de divulgar a escolha de alimentos saudáveis/funcionais. Em razão da grande procura por essas bebidas, grandes empresas alimentícias têm investido em bebidas mistas que incluem uma combinação de frutas e vegetais para consumidores que buscam uma forma natural de manter uma alimentação balanceada sem o uso de conservantes, açúcar ou aditivos químicos (ABRE, 2017; ABIR, 2019).

Os Compostos Voláteis (CV's) são um grupo de compostos orgânicos que são responsáveis pela caracterização de um alimento ou bebida, e têm um impacto significativo na qualidade do produto, não só no aspecto sensorial, mas também no aspecto de ser um alimento seguro. A existência de várias substâncias químicas que englobam essas percepções sensoriais está ligada a compostos orgânicos voláteis, que se referem a uma variedade de classes químicas responsáveis pela qualidade dos alimentos em termos de sabor, intensidade e concentrações (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020; GARCÍA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2016).

Os CV's são o produto de transformações bioquímicas durante a maturação vegetal típica, e desempenham um papel significativo na apresentação, particularmente entre os frutos, mas também em algumas hortaliças. Outro ponto significativo a ser considerado é quantas perdas ou alterações dessas substâncias ocorrem em decorrência do processamento industrial, resultando em produtos de alta qualidade que mantêm as características (CHITARRA; CHITARRA, 2005; THOMAZINI; FRANCO, 2000).

A Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) tem sido considerada a técnica mais adequada para identificação e quantificação de CV's. A técnica tem a capacidade de separar os componentes de diversos materiais complexos, como uma bebida mista. Os analitos nas bebidas mistas devem ser baseadas nas propriedades físicas e químicas dos componentes, bem como sua interação com a fase estacionária interior da coluna. A combinação GC-MS permite a separação e a elucidação de uma ampla gama de

misturas sem a necessidade de padrões analíticos para identificação, tornando-os necessários apenas para quantificação (GARCA *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Entende-se que as bebidas compostas por uma combinação de frutas e vegetais são citadas como fontes de nutrientes e como compostos bioativos (fitoquímicos), nos quais grande parte do grupo é de Compostos Voláteis. Esses compostos podem atuar como agentes reguladores, afetando as atividades bioquímicas do organismo.

O abacaxi, a couve-manteiga, o gengibre e o limão, além do valor nutritivo, incluem características alimentares da região, como variedade, sabores, preparo e práticas alimentares. Sabe-se que uma alimentação rica em frutas e vegetais pode servir de base para uma alimentação equilibrada, saudável, saborosa e culturalmente adequada. Além disso, o uso de alimentos à base de origem vegetal tem o efeito de estimular a agricultura familiar, as economias locais e a promoção de um sistema alimentar socialmente justo.

Torna-se fundamental lembrar que eles estão predispostos a sofrer uma variedade de mudanças devido a reações químicas e enzimáticas. Como resultado, as tecnologias atuais de processamento são capazes de produzir alimentos com menores perdas nutricionais, mantendo a qualidade do produto final.

Vários estudos têm demonstrado que, além do conteúdo nutritivo, a ingestão de sucos/bebidas incluindo frutas e vegetais resulta na formação de compostos fitoquímicos com propriedades funcionais e bioquímicas para o organismo. No entanto, são poucos os estudos que envolvem análises desses produtos alimentícios, principalmente bebidas mistas, em termos de requisitos qualitativos e quantitativos para Compostos Voláteis. Dada a importância da gestão da qualidade de alimentos, uma ferramenta que vem sendo cada vez mais utilizada para esse fim é a Cromatografia Gasosa, que permite a separação de analitos de matrizes complexas, como bebidas mistas (EL-SHATANNOVI *et al.*, 2012; GORECKI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2015).

Dessa forma, o estudo qualitativo de CV's em bebida mista de fruta e hortaliça e a análise da estabilidade do suco processado é essencial para averiguar a qualidade do alimento e comprovar suas propriedades funcionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o perfil e a estabilidade de Compostos Voláteis no Refresco Misto de fruta e hortaliça.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o refresco misto;
- Otimizar a técnica de extração dos analitos utilizando a MicroExtração em Fase Sólida (HS-SPME) através da seleção da melhor fibra (PA, PMDS-CAR e PMDS-DVB);
- Otimizar o *HS-SPME* avaliando tempo e temperatura de extração para caracterização do perfil de Compostos Voláteis;
- Analisar a estabilidade dos compostos voláteis do refresco misto no período de 15 dias.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Bebidas mistas de frutas e/ou hortaliças

Entre 2016 e 2018, a indústria brasileira de bebidas não alcoólicas cresceu em ritmo acelerado, principalmente na área de sucos prontos para beber, que cresceu 36,3 % (10,3 % ao ano), atingindo 492 milhões de litros em produção. Conveniência, sabor, inovação, praticidade e propagação da consciência da escolha de alimentos/funcionais estiveram entre os fatores citados pelos consumidores como importantes na escolha de seus produtos (ABRE, 2018).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Refrigerante e de Bebidas Não Alcoólicas-ABIR (2019), as frutas e as hortaliças mais utilizadas são maçã, abacaxi, coco, limão, uva, kiwi, couve, gengibre, melão, pepino, hortelã, espinafre, tangerina, acerola, cenoura, manga, abóbora, uva, framboesa, beterraba e morango. A busca por alimentos mais saudáveis/funcionais tem levado as empresas alimentícias a investir em sucos ou bebidas para consumidores que buscam uma forma de manter uma alimentação balanceada sem adição de conservantes, açúcar ou aditivos químicos (Figura 1).

Figura 1 - Imagens ilustrativas de bebidas mistas ou "sucos verdes" industrializadas.



Fonte: ABIR (2019).

Apesar da falta de legislação específica para “sucos verdes”, a Instrução Normativa nº 19, de 19 de junho de 2013, tem definições para refresco, geladeira, bebida composta, chá e refrigerante. A bebida enquadra-se na categoria de Refresco Misto, pronto a consumo, que se define como “um produto obtido pela diluição de uma mistura de frutas ou vegetais em água potável, ou pela combinação dos dois através de um processo tecnológico adequado” (BRASIL, 2013).

Nakayama (2010) classifica e recomenda as hortaliças como fontes de vitaminas e minerais, bem como integrantes do grupo de alimentos reguladores, ou alimentos que contribuem para a saúde geral do organismo, ressaltando a importância do uso integral da hortaliça. Outro aspecto positivo na criação dessas bebidas é a redução de desperdícios de frutas e hortaliças, ocasionada pela falta de manuseio e/ou diminuição do valor da safra. A produção de suco (bebida ou refresco) tornou-se uma opção viável e de baixo custo tanto para o produtor quanto para a indústria/mercado, com o objetivo de proporcionar um novo paladar e características nutritivas e funcionais ao consumidor (SILVA *et al.*, 2016).

Embora o suco verde seja conhecido popularmente como suco detox, por supostamente atuar na desintoxicação do corpo e na perda de peso. No entanto, não há declaração funcional de atividade para o uso deste termo *detox*, e não há legislação brasileira vigente (BONG *et al.*, 2017). Esses sucos são comercializados por estabelecimentos de *food service*, alegando aos consumidores que se beneficiam da ingestão de nutrientes ou compostos fitoquímicos que possuem diversas propriedades funcionais, como atividade antioxidante, melhorias nos sistemas imunológico e gastrointestinal, perda de peso, entre outras. Segundo Atalla (2017), não existem artigos científicos que afirmem que os sucos verdes causam desintoxicação no organismo. O corpo humano já possui mecanismos para eliminar toxinas potencialmente prejudiciais, nesse caso, o fígado é um órgão capaz de realizar essa propriedade biológica de maneira eficiente.

Assim, estudos acadêmicos com bebidas mistas de frutas e hortaliças têm sido relatados na categoria de Alimentos Funcionais ou até mesmo Nutracêuticos, por conterem componentes naturais de elevada concentração, além das características nutricionais básicas, atuando com efeitos positivos à saúde do consumidor e não evidenciando risco de toxicidade, estabelecendo um caráter seguro ao produto.

El-Shatanovi *et al.* (2012) avaliaram a bebida mista (tomate, agrião, salsa, cenoura, aipo, alface, beterraba e espinafre) tanto quanto à atividade antioxidante (fenóis totais, flavonoides totais, carotenoides, clorofila A e B, vitaminas C e E), quanto aos efeitos antiestrogênicos em 12 ratos machos Wister, alimentados com dieta hiperlipídica. Os autores alegaram que o suco apresentou alto teores de compostos relevantes que agem como antioxidantes. A análise biológica demonstrou ser significativamente maior em relação a redução de peso corporal no grupo alimentado com dieta aterogênica e consumindo suco de vegetais, apresentando uma melhoria no perfil lipídico, como colesterol e triglicerídeos. No exame histopatológico do coração e da aorta, confirmaram-se esses resultados, que refletem o papel do efeito protetor do suco vegetal contra aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Kim *et al.* (2015) avaliaram o efeito de bebidas mistas comerciais, com caráter “*detox*”, em 85 mulheres com dieta calórica restritiva, com pareceres de antropometria, sensibilidade à insulina, níveis séricos de adipocinas e marcadores inflamatórios. Eles, verificaram as mulheres com excesso de peso antes e após os exames de mediação clínica (índices antropométricos, sensibilidade à insulina, níveis de adipocinas séricas e marcadores inflamatórios). Selecionaram também 84 mulheres em situação de pré-menopausa que foram divididas, aleatoriamente, em 3 grupos: controle sem restrição de dieta (Normal), dieta placebo alimentado por pares (Positivo) e dieta *detox* de limão (Lemon). Realizados no período de onze dias, dos quais sete dias sob a dieta *detox*, seguidos por quatro dias com alimentos de transição, esse grupo apresentou melhoria nos níveis de leptina e adiponectina e redução no índice de massa corporal e percentual gordura.

Além disso, é importante destacar que Gorecki *et al.* (2018) elaboraram uma bebida mista em pó (acerola, maçã, beterraba, brócolis, repolho, cenoura, *cranberry*, tâmaras, alho, couve, laranja, pêssego, mamão, salsa, abacaxi, ameixa, espinafre, açúcar beterraba, tomate, *Spirulina pacífica*, *Lactobacillus acidophilus* e farelo de aveia), empregada na forma de cápsulas e distribuída para 183 pacientes em estágio pré-operatório de cirurgia de retirada de terceiro molar. Os pacientes mantiveram sob suplementos deste suco encapsulado por um período de 10 semanas, durante o pré-operatório. Os autores evidenciaram que tal suplementação minimizou os efeitos pós-operatórios e a morbidade pós-operatória, contribuindo para melhoria na qualidade de vida durante a recuperação após a cirurgia.

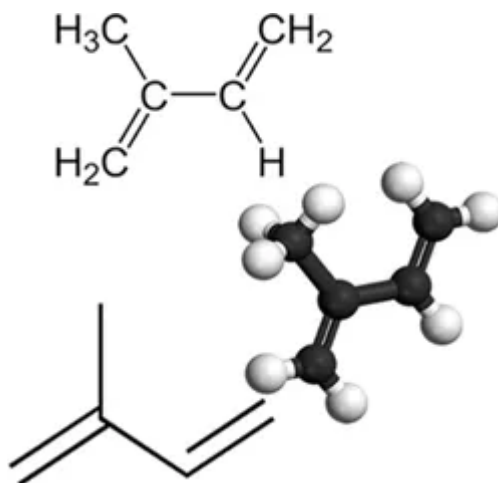
4.2. Compostos Voláteis- CV's

Compostos Voláteis são substâncias orgânicas que apresentam alta pressão de vapor sob as condições normais. Uma enorme diversidade de moléculas orgânicas, como aldeídos, cetonas, e outros hidrocarbonetos leves são caracterizados como CV's.

A classe química dos terpenos tem maior destaque em relação a essas características, essas substâncias são formadas estruturalmente por unidades de isoprenos unidas em cadeias poliméricas lineares e cíclicas, podendo apresentar funções oxigenadas (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e etc.). Uma vez que são formados, podem sofrer condensações, pois podem reagir novamente com outros grupos químicos originando compostos com estruturas carbonatos, dependendo do números das subunidades de isopreno presentes na molécula que recebem a classificação de hemi (C₅), mono (C₁₀), sesqui (C₁₅), di (C₂₀), ses (C₂₅), tri (C₃₀), tetra (C₄₀) e politerpenos (C₅)_n. Uma das características fundamentais desses

compostos é a presença de grande variabilidade estrutural decorrente da existência de insaturações por ligações duplas, que conferem diminuição da energia de ligação. Dessa forma, são capazes de sofrer polimerização, oxidação, dimerização e ciclização (RODIRGUES *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2020).

Figura 2 - Ilustração da unidade isoprênica.



Fonte: Adaptado de Fogaça (2022).

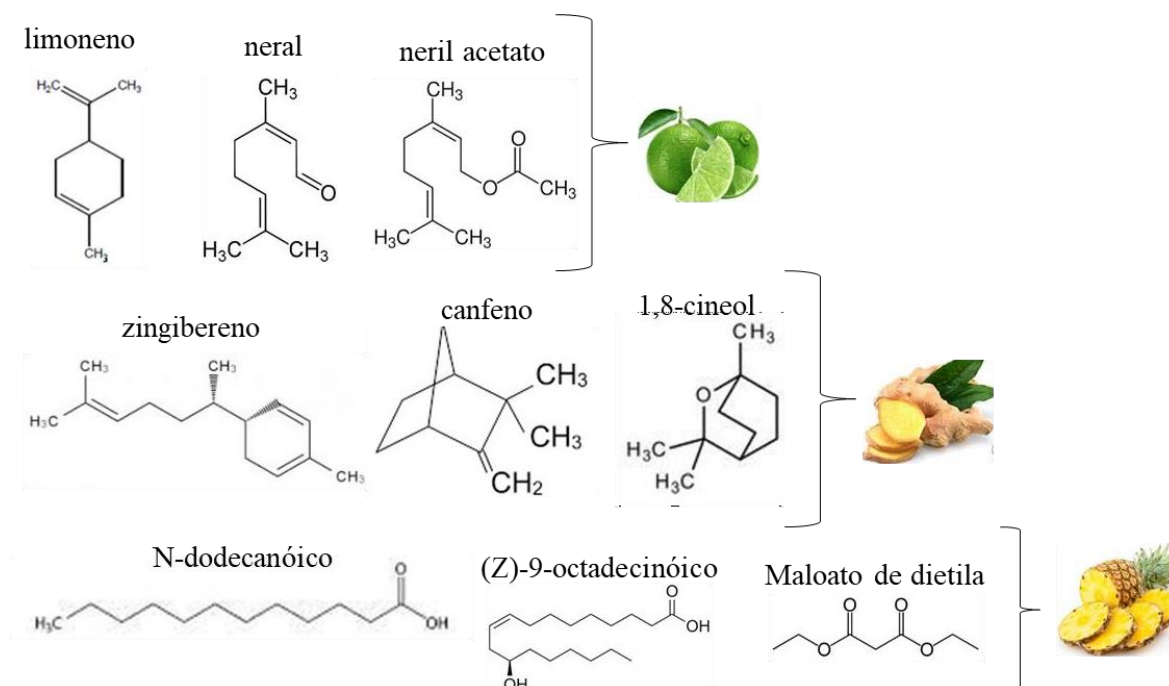
Os CV's apresentam considerável impacto econômico, como parâmetros de qualidade dos alimentos e de preferência do consumidor. A função dos voláteis em frutas e hortaliças é como sinal de maturação e como um atrativo para abelhas e aves dispersoras das sementes (GOFF; KLEE, 2006).

Embora uma única fruta (ou vegetal) sintetize centenas de compostos voláteis, apenas um pequeno subconjunto dessas substâncias possibilita a preferência dos alimentos pelos consumidores. Dentre as características que os voláteis devem apresentar para produzir a sensação sensorial, está, além da alta pressão de vapor para que possa ser transmitido para o sistema olfativo, a solubilidade em água e a concentração adequada para ser capaz de interagir com receptores olfativos. A concentração dos compostos voláteis normalmente é baixa e pode ser afetada por uma série de fatores, contendo os agrônômicos (variedade, condições climáticas e amadurecimento) e tecnológicos (colheita, tratamento pós-colheita, armazenamento e condições de processamento) (DUDAREVA; PICHERSK; GERSHENZON, 2004).

Cada fruta e hortaliça apresenta características em função das diferentes quantidades de voláteis, do impacto e da presença ou ausência destes componentes. A determinação

qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis permite monitorar a qualidade dos alimentos *in natura* ou processados, além de possibilitar o desenvolvimento de novas aplicações desses compostos voláteis no mercado. Felipe e Bicas (2017) descrevem os monoterpenos (limoneno, β -pineno, γ -terpineno), monoterpenoides (geranial, neral, citronelal, linalol), outros compostos (neril acetato, geranil acetato, nonanal) encontrados no limão, os sesquiterpenos (zingibereno, AR-curcumeno, β -sesquifelandreno, bisaboleno), monoterpenos (canfeno, β -felandreno), monoterpenoide (1,8-cineol) no gengibre e detectados ésteres metílicos e etílicos ((E)-2-hexenóico, n-dodecanóico, n-hexadecanóico e n-octadecanóico, (Z)-9-octadecenóico, (Z,Z)-9,12-octadecadienóico e (Z,Z,Z)-octadecatrienóico, acetato de 2-(metiltio)-etila, malonato de dietila, 1-nonanal e 1-dodecanol) no abacaxi (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química de alguns compostos voláteis em frutas e raiz.



Fonte: Adaptado de Felipe e Bicas (2017)

A origem dos compostos voláteis nos alimentos pode estar correlacionada a fatores como:

- 1) matéria-prima utilizada para a produção;
- 2) subprodutos decorrentes de um processo anterior, por exemplo, uma fermentação;
- 3) ação de microrganismos;
- 4) indicadores de deterioração ao longo do armazenamento do produto.

Esses compostos se apresentam, em sua maioria, como agentes de diversas propriedades e funções químicas no alimento. Logo, a determinação de perfil de Compostos Voláteis é capaz de proporcionar não só respostas de aplicação desses compostos, mas também possibilidades diversas que vão, por exemplo, do aprimoramento na tecnologia de processamento aos indicadores de presença de substâncias tóxicas, tanto na indústria de alimentos quanto na de bebidas. Consequentemente, tais vantagens também beneficiam a saúde (OLANIRAN *et al.*, 2017; PAIVA, 2020).

4.3. Extração e identificação de Compostos Voláteis

Hoje se conhece uma grande quantidade de métodos indicados para a extração de compostos orgânicos voláteis em matrizes alimentícias, incluindo as mais complexas; assim como diversos métodos que permitem a detecção e identificação desses compostos. Os procedimentos MicroExtração em Fase Sólida – *Headspace* e Cromatografia Gasosa Acoplado à Espectrometria de Massa estão sendo os mais utilizados em pesquisas pelas indústrias, como em café (VALE, 2019), cervejas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020), bebidas isotônicas (SOUTELO *et al.*, 2020), sucos de frutas (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020), como forma de monitoramento de qualidade e segurança do alimento.

4.3.1. MicroExtração em Fase Sólida – *Headspace* (HS-SPME)

A MicroExtração em Fase Sólida baseia-se na extração e concentração rápida de compostos voláteis e semivoláteis sem a utilização de solventes orgânicos e que envolve a adsorção/absorção de analitos presentes na matriz (sólida ou líquida) em uma fibra de sílica fundida ou fibra recoberta com polímero não volátil, revestida por uma camada polimérica (fase estacionária) com subsequente dessorção no sistema cromatográfico (ALMEIDA *et al.*, 2004; GARCÍA *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

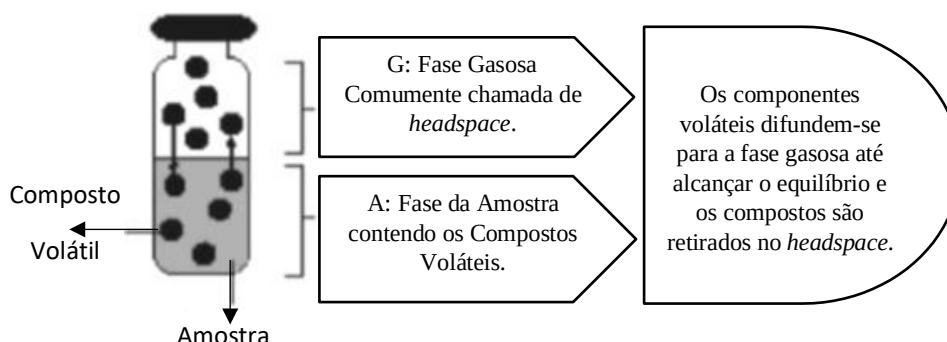
A fibra de sílica é um filamento capilar que fica protegido no tubo hipodérmico retrátil, adaptada em um instrumento chamado de *holder*, que é um equipamento robusto utilizado em inúmeras análises e se apresenta na forma de uma seringa. Comumente, as fibras mais utilizadas quando se trata de extração de compostos voláteis são: polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB), carbowax-templated resin (CW-TPR), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) e polidimetilsiloxano-

carboxen (PDMS-CAR). A literatura propõe a PDMS, sendo um polímero apolar mais apropriado para compostos apolares, as PDMS-DVB e PDMS-CAR são mais adequadas para compostos polares (NASCIMENTO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020).

A técnica de *Headspace* estático, relativamente simples e de fácil aplicação, está sendo muito usada para análise de orgânicos voláteis e semivoláteis em amostras alimentares, com destaque para bebidas. Na extração por *HS*, a amostra é normalmente colocada em um frasco selado (*vial*) e mantido em aquecimento até os compostos alcançarem o equilíbrio com a fase gasosa (Figura 2); a técnica de *HS* estático está acoplada à técnica de MicroExtração em Fase Sólida (MFS). Essa combinação de técnicas oferece algumas vantagens:

- 1) ser uma técnica pouco onerosa;
- 2) não requerer instrumentação complicada;
- 3) não é necessário o uso de solvente orgânico;
- 4) diminui o tempo do preparo das amostras;
- 5) as fibras são reutilizáveis, depende apenas da complexidade da matriz da amostra (GARCÍA *et al.*, 2020; HELENO, 2009; YANG *et al.* 2004).

Figura 4 - Esquema das fases de extração do *vial* de *Headspace*.



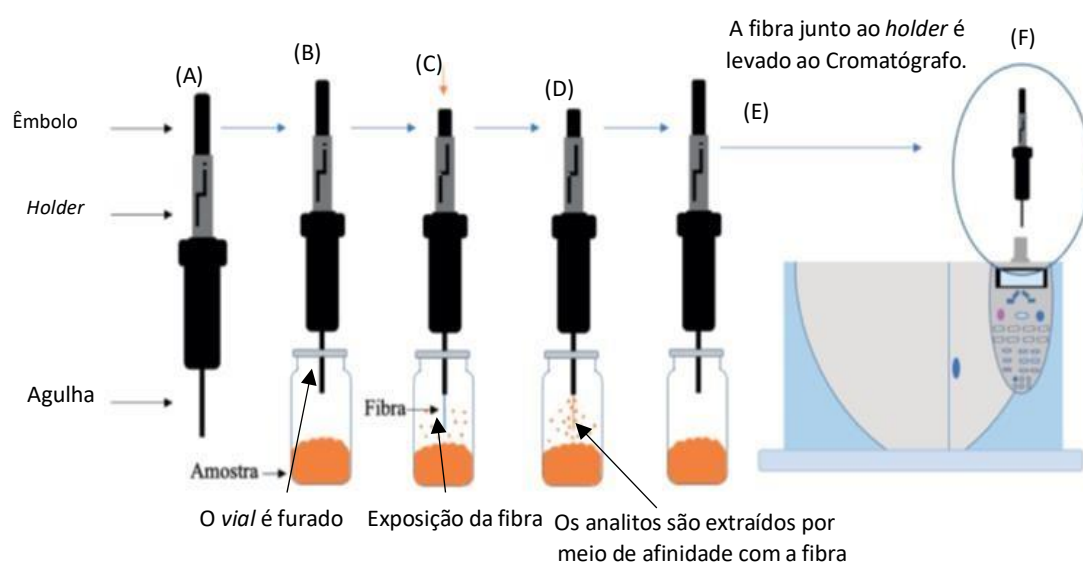
Fonte: Adaptado de Heleno (2009).

O procedimento *HS-SPME* pode ser observado na Figura 3. Esse tipo de extração consiste em um recipiente (*vial*) lacrado com septo (silicone), no qual a amostra está inserida. Em seguida, é perfurado o septo com a agulha do *holder*, e o êmbolo do equipamento (Figura 3A) é pressionado para expor a fibra diretamente na matriz da amostra (Figura 3B).

A fibra é exposta pela movimentação de um êmbolo na matriz da amostra, onde é estabelecido um equilíbrio dos analitos entre a matriz da amostra e a fibra, permitindo, assim, que a fibra não seja danificada (Figura 3), uma vez que a fibra não entra em contato direto com a matriz analisada. Depois, os analitos da amostra são concentrados no revestimento

polimérico da fibra, através de um processo de adsorção (Figura 3D). Decorrido o tempo de exposição, a fibra é retida e o holder retirado do *vial* (Figura 3E). Posteriormente, a agulha do *holder* é inserida no injetor do GC e a fibra é exposta novamente, tornando os analitos dessorvidos em virtude da alta temperatura e conduzidos pelo gás de arraste até a coluna cromatográfica (Figura 3F) (ALMEIDA *et al.*, 2004; GARCÍA *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Figura 5 - Descrição do processo de extração MFS-HS. (A) Escolha da fibra, (B) Introdução da agulha no *vial*, (C) Exposição da fibra, (D) Extração dos analitos, (E) Recolhimento da fibra na agulha e (F) Dessorção no GC.



Fonte: Adaptado de Garcia *et al.* (2021).

4.3.2. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GS-MS)

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas, permitindo o estudo de CV's, semivoláteis, e simultaneamente não termolábeis. A CG normalmente utiliza, na fase móvel, o gás Hélio, Hidrogênio ou Nitrogênio, enquanto, na fase estacionária, é um líquido de elevado ponto de ebulição que envolve o material sólido inerte (Figura 4B). A fase móvel com o gás determinado adequa-se para carregar os analitos por toda a coluna cromatográfica, uma vez que só irá eluir na fase estacionária (sólida ou líquida). A interação dos analitos é atribuída à similaridade com os componentes da fase estacionária, igualmente com a temperatura em que cada componente se desloca na fase gasosa (Figura 4C) (COLLINS *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Os principais componentes de um cromatógrafo a gás são: sistema de injeção, cilindro de gás, coluna cromatográfica, forno, detector e sistema de aquisição de dados (Figura 4). Devem-se seguir as seguintes condições fundamentais para que análise aconteça:

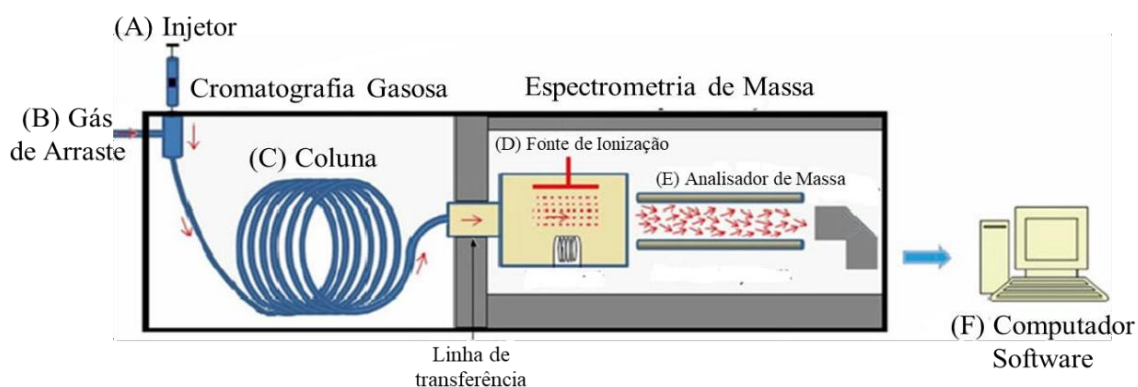
- 1) o gás de arrastre deve ser de alta pureza, inerte e adequado ao tipo de detector;
- 2) o detector deve possuir boa estabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade, tempo de resposta e facilidade de manuseio;
- 3) o fluxo de gás de arrastre deve ser controlado por válvulas de medição, o qual varia com o tipo de coluna (empacotadas ou capilares) (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Os detectores são componentes acoplados após a coluna cromatográfica e têm como principal função detectar os constituintes da amostra após a separação na fase estacionária da coluna. Logo, o emprego do detector adequado na saída da coluna torna possível a identificação e quantificação dos Compostos Voláteis, gerando como resposta o cromatograma. Existem diversos tipos de detectores: Detector por Ionização em Chama (FID); Detector por Condutividade Térmica (TCD); Detector por Captura de Elétrons (ECD); Detector de Nitrogênio e Fósforo (NPD); Detector por Fotoionização (PID); Detector Fotométrico de Chama (FPD) e Espectrometria de Massas (EM ou MS) (COLLINS *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Na fonte de ionização, ocorre a formação dos fragmentos das moléculas do analito, devido a um alto potencial aplicado (geralmente 70 eV), transferindo os íons para o analisador do MS, separando-os, assim, de acordo com a razão Massa/Carga (M/Z) (Figura 4D) (GARCÍA *et al.*, 2020; WILSON e WALKER, 2010).

Os analisadores de massas comumente utilizados são quadrupolo (Q) e armadilha de íons (*ion trap* - IT) (Figura 4E). O acoplamento do EM a um sistema cromatográfico tem a vantagem de responder a um grande número de Compostos Voláteis e Semivoláteis. O detector monitora e amplifica a corrente de íons, transmitindo o sinal para o sistema de dados. Ao chegar a esse sistema, os íons são registrados na forma de espectros de massas (valores m/z dos íons) em função da sua intensidade, e, posteriormente, comparados com o banco de dados (biblioteca).

Figura 6 - Esquema dos principais componentes dos instrumentos GC-MS.



Fonte: Adaptado de Emwas *et al.* (2015).

Geralmente, o espectrômetro de massas é utilizado em duas formas: no modo varredura completa (*Full Scan*), para análise qualitativa; e monitoramento seletivo de íons (SIM), para análise quantitativa (GARCIA *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2018). A biblioteca de espectros padrão do equipamento permite a identificação da estrutura pela comparação entre os espectros do analito e o banco de dados, gerando uma probabilidade de confirmação da identidade do composto (Figura 5F) (NASCIMENTO *et al.*, 2018; WILSON; WALKER, 2010).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção das matérias-primas

As frutas e hortaliças (abacaxi, couve-manteiga, gengibre, limão-taiti) utilizadas na elaboração da bebida mista foram adquiridas no comércio local de Limoeiro do Norte, Ceará.

5.2. Processamento do Refresco Misto

Como refrescos mistos não possuem padrão de identidade e qualidade próprio, devem ser elaborados de forma a seguir as orientações da Instrução Normativa nº 19/2013 (MAPA), que cita que refresco ou bebida cuja matéria-prima não esteja especificado na legislação deve conter uma concentração mínima de 10% v/v de suco/polpa da fruta e 5% v/v de suco/polpa de vegetal (hortaliça) (BRASIL, 2013).

Para o processamento do Refresco Misto, seguiu-se a metodologia de Fouchy *et al.* (2019), com formulação pré-estabelecida em estudo prévio. Polpa de abacaxi (18,33%), couve-manteiga (8,33%), gengibre (0,33%), limão-Tahiti (6,33%) e água potável (66,67%) foram batidos em liquidificador industrial por cerca de 2 minutos, filtrados em peneira com granulometria 0,2 mesh, envasados em garrafas de vidros com capacidade para 300 mL, fechados com tampas plásticas previamente higienizadas em solução clorada (50 ppm) e armazenados sob refrigeração a 10 °C.

5.3. Análises físico-químicas

O pH das amostras foi avaliado utilizando pHmetro de bancada, da marca OHAUS, modelo Starter 2100, seguindo metodologia eletrométrica preconizada pelo método 943.71 da AOAC (2012).

A determinação dos sólidos solúveis foi realizada por leitura da amostra, em refratômetro eletrônico, modelo Optronic Abbe Refractometer, à temperatura de 28 °C, e o resultado expresso em °brix.

A análise de acidez titulável (AT) foi realizada conforme método 937.05 da AOAC (2012). Foram transferidos 5 mL de amostra com pipeta volumétrica para Erlenmeyer de 250 mL, e diluídos com 70 mL de água destilada. Procedeu-se a titulação com NaOH 0,1 M

utilizando solução de fenolftaleína 1% como indicador. A análise foi realizada em triplicata, e os resultados expressos em $\text{g} \cdot 100^{-1}$ de ácido cítrico.

O *Ratio* é comumente aplicado para sucos de frutas; o cálculo foi baseado na relação SS/AT. Essa relação é utilizada como uma indicação do grau de maturação da matéria-prima (ARAÚJO; SENA, 2018).

5.4. Determinação de ácido cítrico por CLAE-UV

5.4.1. Reagentes, soluções e curva analítica

O padrão de ácido cítrico – P.A. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), Sigma-Aldrich® foi adquirido com grau de pureza $\geq 99,99\%$. Os reagentes acetonitrila (CH_3CN), Sigma-Aldrich®, fosfato monopotássio (KH_2PO_4), Sigma-Aldrich®, ácido fosfórico – P.A. (H_3PO_4), Sigma-Aldrich®, todos possuíam pureza superior a 98%. Água foi obtida em sistema Milli-Q Millipore.

Preparou-se a solução tampão de fosfato monopotássio (KH_2PO_4) 0,2 M, pH 2,4, diluindo 27,2 g de KH_2PO_4 em 950 mL de água Milli-Q. Ajustou-se o pH para 2,4 com ácido fosfórico (H_3PO_4), e, em seguida, o volume foi ajustado para balão volumétrico de 1000 mL. A solução foi filtrada em sistema completo de filtração a vácuo com membrana de 0,45 μm de porosidade (Millipore), acondicionada em frasco de vidro, realizada a degaseificação em sonificador para remoção de gases.

Preparou-se a solução estoque do padrão analítico com concentração de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, diluindo 0,1000 g do ácido cítrico em 100 mL de água Milli-Q. A partir da solução estoque, preparou-se as diluições necessárias para atingir as concentrações desejadas (100, 250, 500 e $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). O preparo foi realizado ao abrigo da luz. Após essas etapas, o preparo foi filtrado em membrana Millex (0,45 μm) para remoção das impurezas. Em seguida, transferiu-o para os *vials* do injetor automático, para a quantificação instrumental obtendo a curva de calibração do padrão.

5.4.2. Preparo de amostra

Primeiramente, foi tratado o cartucho de extração em fase sólida fase estacionária C18 com 10 mL da solução, recém preparada, de acetonitrila: água Milli-Q® (1:1), para remoção do solvente – com auxílio de Manifold acoplado à bomba a vácuo – até secagem total do cartucho, descartando o líquido. Em seguida, 10 mL da amostra no cartucho foram tratadas também com Manifold, porém se descartando os primeiros 5 mL da amostra. Os outros 5 mL

foram coletados em um tubo de ensaio e filtrados em membrana Millex para remoção total das impurezas.

5.4.3. Condições cromatográficas

Cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com sistema binário de bombeamento 321 da Gilson®, coluna de fase reversa C18 (Hichrom, 15 cm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro x 5 µm de partícula), detector ultravioleta-visível (UV-Vis) (modelo 152, Gilson®, injetor automático com loop de 20 µl (modelo 234, Gilson®), desgaseificador (modelo 864, Gilson® e sistema de análise e processamento de dados (*Software Unipoint 3.0*) (Figura 5).

A amostra foi disposta nos *vials* do injetor automático e analisada por CLAE-UV, em duplicata, sob as seguintes condições:

- fase móvel: solução tampão de fosfato monopotássio 0,2 M, pH 2,4;
- modo de eluição: isocrática;
- vazão do fluxo: 0,8 mL min⁻¹;
- comprimento de onda do detector: 214 nm;
- temperatura da coluna: temperatura ambiente (25 °C);
- duração da corrida: 10 minutos.

Figura 7 - Ilustração do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Ultravioleta-visível.



Fonte: Autor (2022).

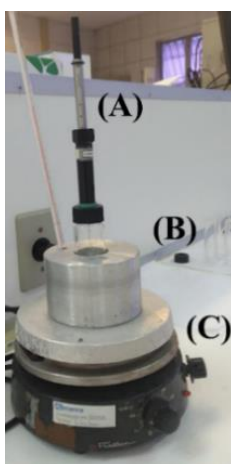
5.5. Análise dos Compostos Voláteis-CV's por CG-MS

5.5.1 Seleção da fibra de SPME

Foram avaliadas três fibras com diferentes recobrimentos poliméricos: poliacrilato (PA, espessura do filme 85 μm); polidimetilsiloxano-carboxen (PDMS-CAR, espessura do filme 80 μm); e polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB, espessura do filme 100 μm). Previamente, as fibras foram condicionadas no injetor do cromatógrafo de acordo com tempo e temperatura recomendados no manual do fabricante, específicos para cada tipo de fibra.

Para extração, o *vial* contendo 20 mL do Refresco Misto foi lacrado e mantido sob agitação constante em chapa aquecedora, aquecido em bloco de alumínio, a 65 °C por 20 minutos. As fibras foram expostas no modo *headspace* (HS-SPME), até que fosse estabelecido o equilíbrio (adsorção) dos analitos entre a matriz da amostra e a fibra polimérica (Figura 6). Em seguida, as fibras foram inseridas diretamente no injetor do CG-EM, a 260 °C, no qual ocorreu a dessorção térmica dos analitos retidos no recobrimento polimérico (MARQUES, 2019; XU *et al.*, 2021).

Figura 8 - Sistema de extração para HS-SPME. (A) Agulha instrumental SPME contendo a fibra, (B) Vial ou frasco septo e (C) Bloco de alumínio em forno.



Fonte: Autor (2022).

5.5.2. Otimização das condições de extração por *HS-SPME*

Na etapa de otimização do método, após a escolha da melhor fibra, foram avaliados os parâmetros de tempo de equilíbrio e a influência da variação de temperatura. Foram testados 20 e 30 minutos, 65 °C e 85 °C nas mesmas condições de extração no modo *headspace* (*HS-SPME*), descrito no item 5.5.1.

5.5.3. Condições do método GC-MS

As experimentações foram realizadas no Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrometria de Massa, marca Thermo® modelo Focus GC/ DSQII (Figura 7), equipado com analisador quadrupolo, utilizando uma coluna DB-5MS (5% fenilmetilsiloxano), Agilent J&W, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição *Full Scan*, com intervalo de varredura entre 35-400 m/z, utilizando-se ionização por impacto de elétrons- IE com energia de 70 eV. Os CV's foram identificados de acordo com a Biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (Figura 7).

As condições estabelecidas para as experimentações e a programação da temperatura, foram:

- temperatura do injetor: 260 °C;
- modo de injeção: *Splitless*;
- gás de arraste: Hélio 5.0 (99,999%);
- vazão do fluxo: 1,0 mL.min⁻¹;
- rampa de aquecimento: temperatura inicial em 60 °C, mantida durante 1 minuto, com taxa de aquecimento em 5 °C.min⁻¹ até 210 °C. Após, a taxa foi de 15 °C.min⁻¹ até 300 °C, mantida durante 1 minuto. Totalizando em 38 minutos;
- temperatura da linha de transferência: 300 °C;
- temperatura da fonte de íons: 250 °C;
- software: *Xcaliur* 2.0.7.

Figura 9 - Ilustração do Cromatógrafo Gasoso Acoplado à Espectrometria de Massa.



Fonte: Autor (2022).

5.6. Estudo da estabilidade dos CV's

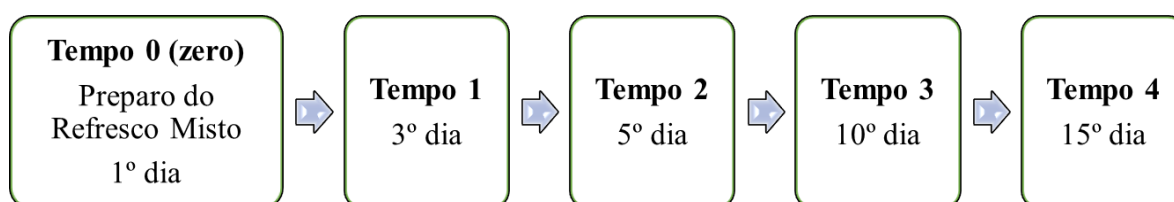
A amostra de Refresco Misto foi avaliada considerando a estabilidade em ambiente doméstico. O volume de 180 mL da amostra foi mantido em frasco de vidro próprio para envase comercial de bebidas, fechado de maneira adequada, garantindo a proteção da amostra do ambiente externo, e mantido sob ambiente de refrigeração a 10 °C.

O estudo da estabilidade do Refresco Misto foi realizado em um período de 15 dias de armazenamento, conforme apresentado na Figura 8. Para cada tempo, foram retiradas alíquotas de 20 mL, do mesmo frasco e submetidas a extração por MFS-HS, seguindo as condições estabelecidas após a seleção da fibra e a otimização da técnica de extração. Posteriormente à extração, as amostras foram injetadas no CG-MS, para análise qualitativa, seguindo as mesmas condições cromatográficas descritas no item 5.5.3.

A estabilidade foi através do percentual de degradação dos principais compostos, conforme Equação 1 da metodologia de Herrington (2021), com modificações, verificando as mudanças nas áreas cromatográficas (AC) ao longo do período do estudo.

$$Degradação(\%) = \frac{|AC'Tempo0' - AC'Tempo4'|}{AC'Tempo0'} \times 100 \quad (1)$$

Figura 10 - Fluxograma da análise de estabilidade de CV's em um período de 15 dia.



Fonte: Autor (2022)

5.7. Análise estatística

Os valores obtidos na determinação de ácido cítrico foram expressos em média e desvio padrão, em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 5%, utilizando-se o software *Statistica* 10.0 (STATSOFT, 2011); utilizou-se o teste T de *Student* para comparação de médias. Avaliou-se a comparação de quantificação de ácido cítrico entre o método por titulação e método cromatográfico.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análises físico-químicas da amostra

6.1.1. pH, sólidos solúveis, acidez e *ratio*

Os resultados relacionados às análises físico-químicas do Refresco Misto de Frutas e Hortifrutis, encontram-se na Tabela 1. A combinação de abacaxi, couve-manteiga, gengibre e limão pode ser considerada um produto inovador, em virtude de não apresentar referências de comparação dos valores analisados. Ademais, o Refresco pode promover uma nova experiência sensorial de cor, sabor e viscosidade à linha dos refrescos mistos, tornando-se atrativo ao público que renuncia o consumo de frutas e hortaliças.

Tabela 1 - Resultados obtidos das análises físico-químicos do Refresco Misto.

Características	Refresco Misto
pH	3,03 ± 0,03
Sólidos Solúveis Totais (°brix)	3,05 ± 0,09
Acidez Titulável (AT) (g.100⁻¹ mL Ácido Cítrico)	8,65 ± 0,08a
<i>Ratio</i>	0,35

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste T-Student;

Fonte: Autor (2022).

Observa-se que o valor do pH do Refresco foi de 3,03, apresentando uma característica ácida, ou seja, um alimento muito ácido ($pH < 4,0$). Esse pH traz vantagens como inibir uma grande parcela do desenvolvimento microbiano, principalmente bactérias, reduzir o uso de aditivos de conservação, apresentar menos risco para a comercialização, por se mostrar um alimento menos perecível. Em contrapartida, fica propício quase que exclusivamente a bolores e leveduras (FIB, 2012; FRANCO; LANDGRAF, 2005). Este valor foi próximo aos encontrados nos estudos de Leone (2009), que elaborou sucos mistos compostos de polpas de uva e acerola juntamente com a hortaliça *Rumex acetosa* (azedinha), que apresentou pH muito ácido, entre 3,03 e 3,07; de Gomes et al. (2016), com valores médios de pH entre 2,82 e 3,34, ao formular sucos mistos com maracujá, laranja, hortelã e limão-toranja; e de Silva (2019),

com pH 3,10, ao avaliar uma marca de suco misto tendo na sua composição couve e espinafre (liofilizados), polpas de maçã e limão-tahiti (pó alimentício), gengibre e salsa (pó alimentício).

A quantificação dos Sólidos Solúveis Totais (SST) (°brix) permite observar o desempenho na qualidade do produto, devido às influências nas propriedades termofísica, química e biológica ocorridas pelo processamento, principalmente industrial, pois expressa o conteúdo de açúcares, como glicose, frutose e sacarose, de alguns ácidos orgânicos e de outros componentes de cadeia simples, representando uma proporção direta com o grau de doçura do produto (COSTA et al., 2004; SILVA, et al., 2002).

O Refresco Misto apresentou 3,05 °brix. Vale ressaltar que o produto foi elaborado com o intuito de utilizar somente os componentes solúveis naturalmente presentes nos próprios ingredientes da mistura, sem emprego de aditivos alimentares e sendo diluído em água potável, como recomenda a Instrução Normativa nº 19/2013 (BRASIL, 2013). Entretanto, foi um valor relativamente próximo do estudo de Vilar et al. (2020), que determinaram o valor de 5,50 °brix ao analisar o suco misto contendo abacaxi, manga, banana, espinafre, couve, hortelã e gengibre, também diluído em água potável e sem adição de aditivos. Os autores ainda mencionam que são poucas as literaturas que seguem essa tendência de bebidas mistas que optem para uma conscientização de uma opção mais saudável.

Outras pesquisas (GOMES *et al.*, 2016; LEONE, 2009; SILVA, 2019), ao desenvolverem ou até mesmo avaliarem marcas de suco/bebidas/refrescos mistos conhecidas no mercado, verificaram a utilização de aditivos, tais como maltodextrina, antiumectante, edulcorante sucralose, acidulantes e estabilizantes para realizar ajustes nas características do produto.

A acidez titulável foi expressa em ácido cítrico, por ser um ácido orgânico existente em maior concentração na composição do Refresco Misto. Esta característica pode influenciar no sabor, odor e estabilidade do produto.

O valor obtido no Refresco Misto foi de 8,65 g.100⁻¹ mL de ácido cítrico, superior a Silva (2019), que apresentou uma variação de 0,10 a 0,53% de ácido cítrico em 7 bebidas mistas de frutas e vegetais comercializadas em estabelecimentos de produtos alimentícios em Belo Horizonte (MG). Machado *et al.* (2017) encontraram 0,13% de ácido cítrico em suco comercial *Detox* e 0,26% ao elaborar o próprio suco misto de fruta e hortaliça para o estudo. Vilar et al. (2020) apresentaram 1,21% ao desenvolver suco em pó e 2,28% suco líquido utilizando abacaxi, manga, banana, espinafre, couve, hortelã e gengibre.

Essa elevada acidez do Refresco Misto pode ser explicada pela presença do limão e da couve-manteiga, pois conforme Martins *et al.* (2017), ao caracterizar parâmetros químicos de

frutos de limeiras ácidas “Tahiti” e limões “Galegos” cultivados em condições de Cerrado (Uberlândia, Minas Gerais), obtiveram valores para ácido cítrico de 10,12% (Tahiti) e 10,36% (Galego). Primak e Lima (2017), ao realizar a caracterização físico-química da couve logo após a colheita, em Rio Bonito do Iguaçu, PR, obtiveram valores entre 4,78 e 5,72% de ácido cítrico.

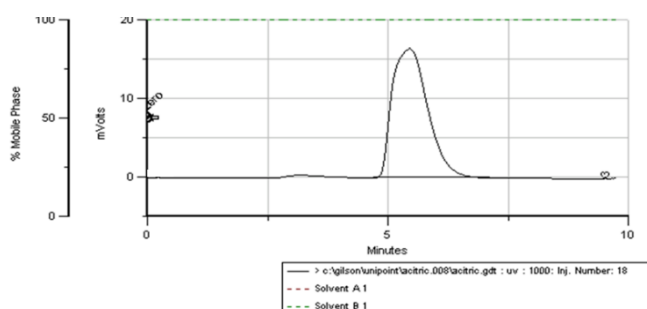
O *ratio* é um parâmetro que estabelece uma relação entre SST/AT. É uma variável considerável, pois avalia o grau de doçura do produto, ou seja, o equilíbrio entre o sabor doce e o ácido, porém esse valor é bastante influenciado pelas condições da matéria-prima. Ao utilizar frutas no preparo de bebidas, existem os fatores como estágio de maturação, condições de manejo e dos estresses abióticos, além dos diversos processos agroindustriais aos quais o produto é submetido (MEDEIROS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2008).

Essa baixa relação indica que o Refresco Misto possui um sabor mais ácido e menos doce, de modo semelhante ao encontrado por Lima *et al.* (2019), que, ao elaborar um suco misto de acerola com manjerição, aplicando um planejamento experimental (4 ensaios) para avaliar a melhor resposta dentre as condições de formulações da bebida, obtiveram valores de *ratio* entre 1,50 e 1,80. Esse valor distingue-se do verificado por Murakami *et al.* (2020), que, ao desenvolver um suco funcional com suco concentrado de laranja adicionado diferentes percentuais em massa de couve (1, 3, 7 e 10%), obtiveram entre 16,3 e 17,3 de *ratio*.

6.1.2. Análise de ácido cítrico por CLAE-UV

O tempo de retenção do ácido cítrico no método foi determinado usando um padrão analítico, apresentando um tempo médio de retenção de 5,53 min, conforme mostra a Figura 9.

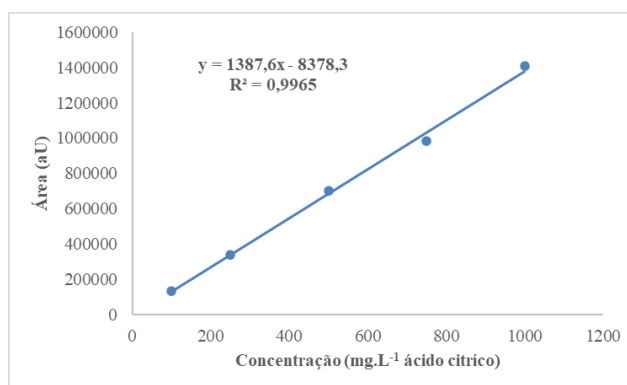
Figura 11 - Cromatograma do pico (1000 mg.L⁻¹) na curva analítica de ácido cítrico obtido por CLAE-UV.



Fonte: Autor (2022).

A curva analítica foi estabelecida pela relação entre as áreas dos picos em função das concentrações, apresentando coeficiente de regressão de 0,9965 e coeficientes de variação (%) entre 0,29 e 1,27 (Figura 10). A Resolução RDC nº 166/2017, da ANVISA, recomenda um coeficiente igual a 0,99 e a análise da curva de calibração seja realizada através de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. A partir da equação ($y = 1387,6x - 8378,3$) obtida, foi deliberada a quantificação do Refresco Misto. A equação fornece a concentração em mg.L^{-1} , porém o resultado final foi convertido para $\text{g.100}^{-1} \text{ mL}$ de ácido cítrico, sendo a variável Y as áreas dos picos do Refresco Misto e a variável X a concentração de ácido cítrico.

Figura 12 - Representação gráfica da curva analítica de ácido cítrico.



Fonte: Autor (2022)

A determinação do ácido cítrico pelo método cromatográfico apresentou um valor de $6,84 \pm 0,28 \text{ g.100mL}^{-1}$, com diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados para dois métodos usados. O método de acidez titulável, apesar de corresponder à um método oficial para bebidas com frutas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, determina, além do ácido cítrico, vários outros compostos orgânicos naturalmente presentes no Refresco Misto ou através de uma interação como os ácidos málico, oxálico, succínico, ascórbico, tartárico, isocítrico, fumárico, oxalacético e cetoglutárico, que no geral são encontrados em frutas e vegetais (LIMA et al., 2010; SCHERER et al., 2012). Diante disso, os métodos mais adequados para determinar a concentração real de ácido cítrico são os Métodos Cromatográficos, devido à sua maior seletividade.

Outro ponto de vista seria explicado pela etapa de preparo de amostra durante o tratamento do cartucho de extração em fase sólida C18, uma vez que o material adsorvente é capaz de diferenciar, isolar e interagir com o analito de interesse (ácido cítrico), discriminando-o de outros compostos presentes na matriz (Refresco Misto), antes da análise

cromatográfica. Nesta etapa, também é realizada a eliminação de possíveis impurezas presentes no solvente dentro do cartucho, visto que a principal finalidade é o processo de concentração do analito. Em razão disso, utilizou-se grande volume de amostra para reter, no cartucho, o analítico e propiciar a eliminação dos interferentes (CASTRO; MACCA, 2018).

Neste trabalho, a amostra apresentou $6,84 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ mL}$ de ácido cítrico por CLAE-UV. Scherer et al. (2012) validaram um método analítico usando um sistema de cromatografia líquida para determinação rápida e simultânea dos principais ácidos orgânicos (tartárico, málico, ascórbico e cítrico) em sucos de frutas comerciais. Os autores usaram o sistema LC-UV/DAD, comprimento de onda de 210 nm para o ácido cítrico e tratamento do cartucho de extração C18. Obtiveram a concentração de ácido cítrico entre 6581 e 7023 $\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$ para suco com limão-galego (*Citrus aurantifolia*), entre 5192 e 5765 $\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$ para suco com limão-cravo (*Citrus limonia*) e entre 6,41 e 7,70 $\text{g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$ para suco com limão siciliano (*Citrus limon*). Pereira et al. (2007) realizaram a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos que compõem a couve tronchuda na região de Mirandela, Portugal. O estudo foi conduzido através de sistema HPLC/UV, comprimento de onda de 214 nm para todos aos ácidos analisados, com tratamento da matriz (5 mL de metanol/água (1:1), ultrassonicado, centrifugado e filtrado). Os autores identificaram sete ácidos orgânicos: aconítico, cítrico, ascórbico, málico, quínico, chiquínico, fumárico. Ao quantificar o ácido cítrico, obtiveram 99746 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (9,97 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

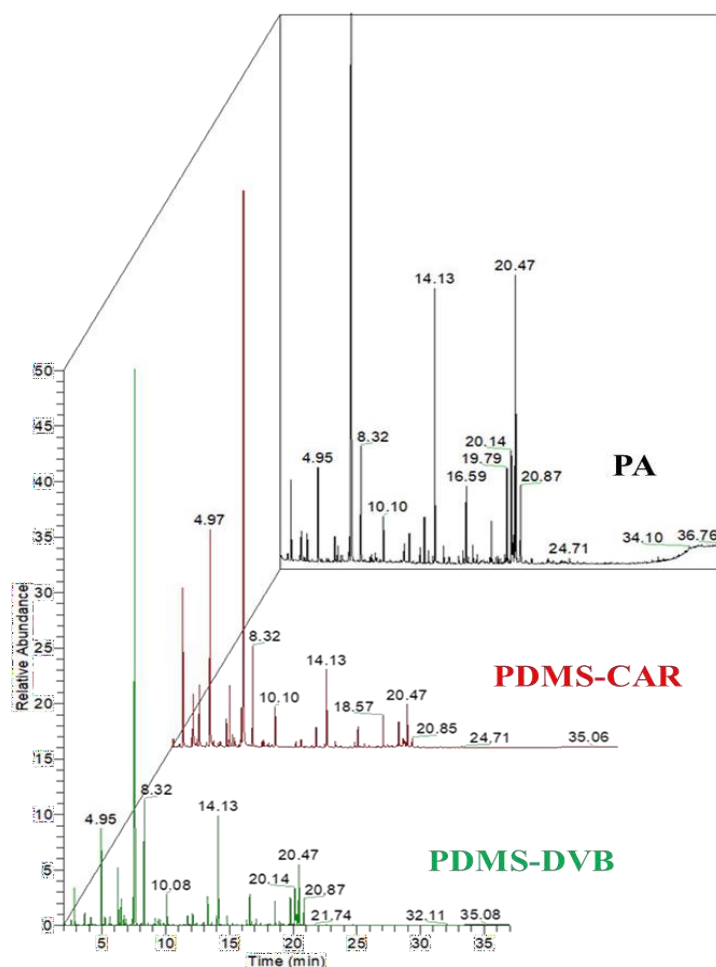
6.2 Análise de CV's no Refresco Misto

6.2.1 Otimização do método de extração

Para otimização do método, inicialmente foi realizada a seleção da fibra dentre as três testadas: PA (85 μm), PDMS-CAR (80 μm) e PDMS-DVB (100 μm), com as seguintes condições: temperatura de extração de 65 °C, durante 20 minutos, sob agitação (Figura 11).

Os resultados obtidos no pré-teste com diferentes revestimentos de fibras estão representados graficamente na Figura 12, na qual a fibra PA (85 μm) obteve o maior número de picos (90 ao todo), seguida da fibra PDMS-CAR (80 μm) com 85 picos identificados e por último a fibra PDMS-DVB (100 μm) com 82. Em sua maioria, os compostos identificados foram encontrados em todas as fibras, porém, com concentração (área%) diferentes.

Figura 13 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas da identificação dos compostos voláteis do teste entre as três fibras PA, PDMS-CAR e PDMS-DVB.



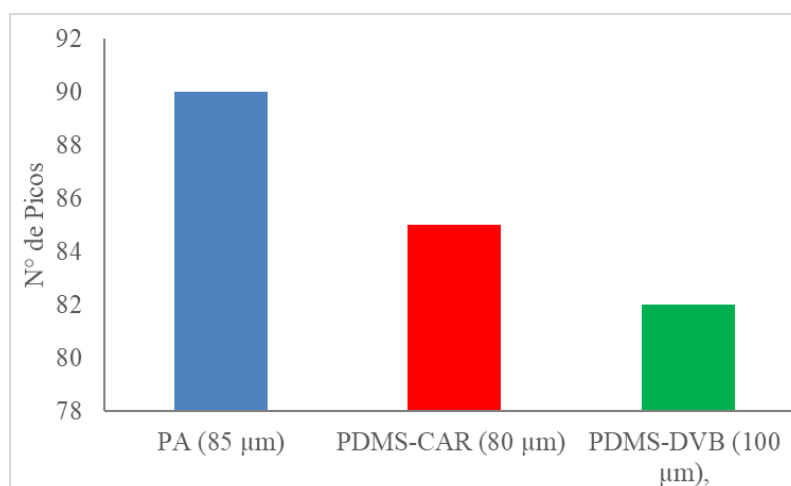
Fonte: Autor (2022).

Apesar da pequena diferença entre os números de picos dos revestimentos (90, 85 e 82), os resultados foram moderadamente melhores para a fibra PA, sendo, portanto, utilizada para os testes de extração de voláteis, por demonstrar uma melhor eficiência, ao se tratar de uma fibra com maior afinidade aos compostos com características apolares.

Esse comportamento dos testes de revestimentos para a eficiência da fibra PA teve uma semelhança com um dos estudos de Costa (2014) sobre a prospecção de compostos voláteis, características e identificação química de resistência e/ou atração, em algumas variedades do fruto manga (*Mangifera indica* L.) resistentes às moscas-das-frutas (*Anastrepha obliqua*). O autor, para chegar à eficácia da PA, analisou várias fibras e comparou-as com os compostos identificados e obtidos por SPME, identificando os Compostos Voláteis por meio da realização de testes com as fibras PA – Poliacrilato (100 µm de espessura), PDMS – Polidimetilsiloxano (100 µm de espessura), Car/PDMS – Carboxen/Polidimetilsiloxano (75

μm de espessura) e DVB/Car/PDMS – Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (50/30 μm de espessura). Os resultados do estudo indicaram que a fibra PA se mostrou mais eficiente devido ao elevado número de identificação dos compostos voláteis em algumas partes dos frutos (casca, polpa, látex) e em vários níveis de maturação do fruto.

Figura 14 - Representação gráfica dos números de picos identificados por fibra de MicroExtração em fase sólida.



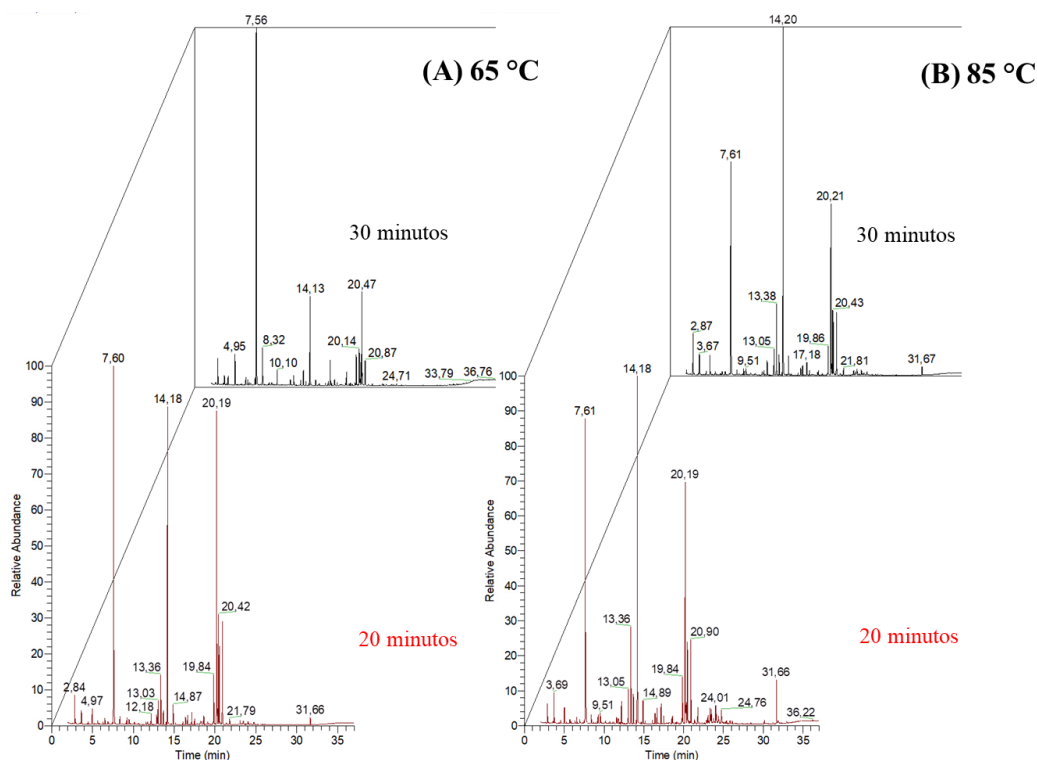
Fonte: Autor (2022).

No cromatograma, é permitido determinar componentes principais (majoritários) do Refresco Misto, sendo considerado componente majoritário toda espécie química presente na matriz alimentar na faixa entre 1% e 100% de área (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Para isso, foi avaliada a influência da fibra quanto à intensidade do pico. Observou-se que dentre os compostos majoritários a fibra PA representou 98,42% dos 16 compostos voláteis com maiores níveis de intensidade do pico, demonstrando uma percentagem expressiva de importância, enquanto as outras fibras foram inferiores tanto nos números de majoritários quanto nos valores da área%.

De acordo com o número de compostos identificados e a análise de intensidade de pico dos compostos classificados como correspondentes entre as três fibras estudadas, a fibra com melhor aplicabilidade na identificação e extração dos CV's foi a fibra poliacrilato (PA), por ser capaz de apresentar um número elevado de compostos e com níveis de área% expressivos.

Após a seleção da fibra realizou-se teste de otimização de extração por SPME, verificando diferentes tempos de equilíbrio e influência da temperatura de extração, conforme apresentado no cromatograma na Figura 15.

Figura 15 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas da identificação dos compostos voláteis em diferentes tempos de exposição (30 e 20 min) nas temperaturas de: 65 °C (A) e 85 °C (B).

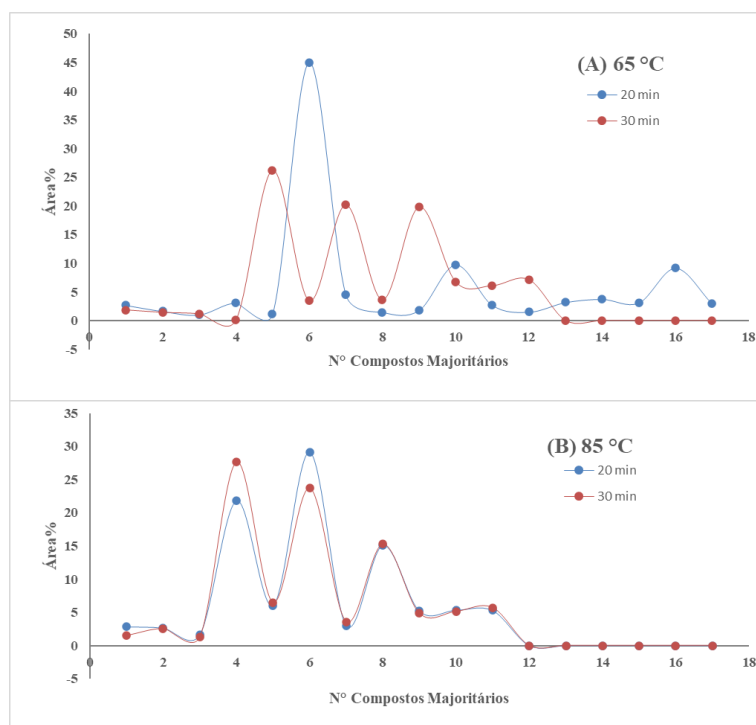


Fonte: Autor (2022).

Com base nos resultados obtidos (Figura 15), foram observados os efeitos estimados para as respostas de números de compostos majoritários voláteis dispostos na seleção da fibra, e pode-se constatar que qualitativamente ocorreram perdas em função do tempo de exposição da fibra sob influência da temperatura para os 16 picos majoritários.

O tempo de exposição de 20 minutos, sobre temperatura de 65 °C, apresentou efeito positivo para a identificação de compostos voláteis, como mostra o cromatograma na Figura 13. Já com exposição de 30 minutos, não foi expressivo para o número de picos majoritários e de área% dos compostos majoritários. Nascimento *et al.* (2018) explica que o instante de exposição da fibra na matriz da amostra tende a estabelecer um equilíbrio dos analitos entre a amostra e a fibra selecionada. O tempo de 20 minutos para adsorção dos analitos na fibra PA em SPME foi satisfatório para a extração de voláteis do *headspace* do Refresco Misto, apresentando efeito expressivo quanto aos critérios (área %, número de picos majoritários e similaridade %) escolhido para avaliar a eficiência da extração para exposição da fibra.

Figura 16 - Representação gráfica da variação da área (%) em função do número de compostos durante a otimização de tempo de exposição (20 e 30 min) e temperatura extração a 65°C (A) e 85°C (B).



Fonte: Autor (2022)

Outro parâmetro avaliado foi a influência da temperatura de extração, pois, segundo Nascimento *et al.* (2018), a temperatura pode alterar a interação do analito com o revestimento da fibra; alguns compostos podem aumentar e/ou diminuir sua interação, conforme se eleva a temperatura. Neste estudo a temperatura de 85 °C para o Refresco Misto demonstrou um impacto negativo nos números de compostos decaindo de 16 majoritários para 11, e nos valores das áreas%, principalmente no tempo de 30 minutos como visto na representação gráfica, em que 54,55% demonstram terem diminuído a intensidade dos picos.

No geral, de acordo com o número de compostos extraídos, o número de majoritários e o percentual de área cromatográfica, as melhores condições de extração do CV's, com a fibra selecionada (PA, 85 m), foram com 20 minutos de exposição para que alcance o equilíbrio dos analitos, sobre influência de temperatura a 65 °C e sob agitação padrão.

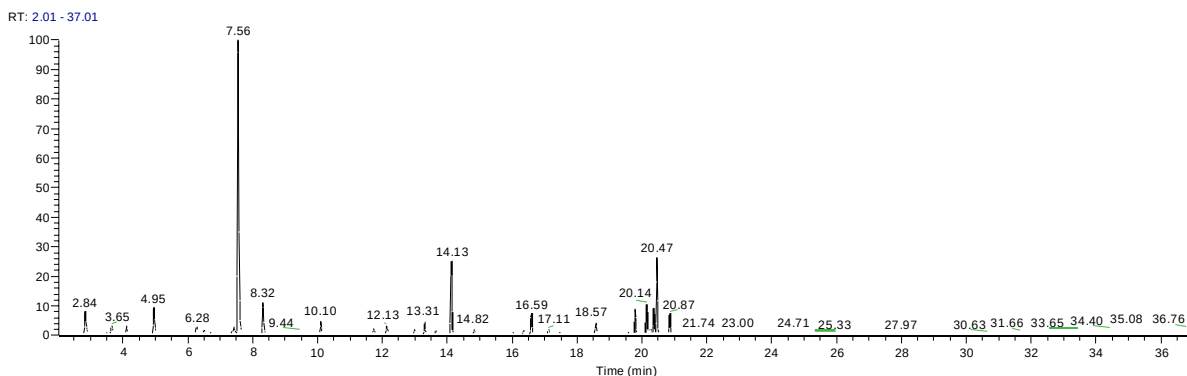
Estudo similar foi realizado por García *et al.* (2020) quando extraíram CV's de polpa do fruto acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) coletada na cidade de Sete Lagoas-MG, utilizando o método de extração HS-SPME/ GC-MS com analisador do tipo *ion-trap*. Os autores avaliaram a eficiência de duas fibras polares: PA (85 µm) e CW-DVB (65 µm); e três fibras semipolares: PDMS-DVB (65 µm), DVB-CAR-PDMS (50 µm) e

carboxen/polidimetilsiloxano (CAR-PMDS, 75 μ m). As condições investigadas para extração foram: tempo de extração (20, 30 e 40 min), temperatura de extração (25, 45 e 65 °C) e agitação (0, 50 e 100 rpm). Dentre as cinco fibras avaliadas, observou-se que as três fibras (CW/DVB, DVB/CAR/PDMS e PA) apresentaram condições de extração similares; em contrapartida, as duas fibras (CAR/PDMS e PDMS/DVB) apresentaram comportamentos distintos nas condições de extração. Ao avaliar o número de compostos extraídos e as condições tempo/temperatura/agitação, a fibra com melhor eficiência de extração de CV's foi a fibra de poliacrilato (PA), pois foi capaz de extrair o número de compostos, 51 ao todo, nas seguintes condições: tempo de extração de 20 min, na temperatura de 65°C e sem agitação.

6.2.2. Perfil de compostos voláteis no Refresco Misto

Após a otimização do método de extração, foi feita a análise no Refresco Misto por HS-GC/MS. Foram identificados inicialmente 90 compostos voláteis, sendo 17 compostos majoritários, conforme mostrado no cromatograma apresentado na Figura 15.

Figura 17 - Cromatograma dos Compostos Orgânicos Voláteis identificados de acordo com as condições de extração *HS-SPME* estabelecidas no estudo, 65 °C por 20 minutos.



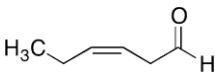
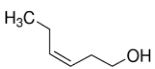
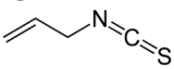
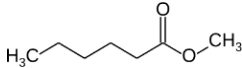
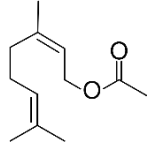
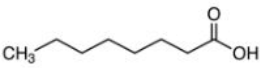
Fonte: Autor (2022).

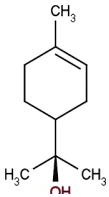
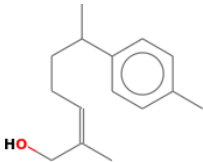
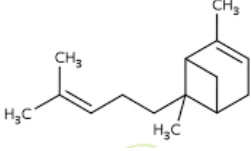
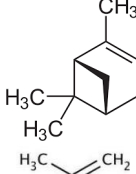
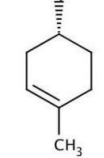
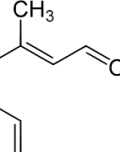
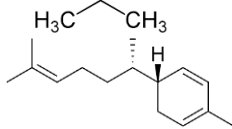
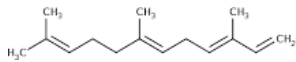
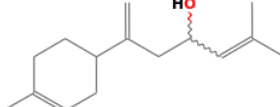
Na Tabela 2, mostram-se os dados dos 16 compostos majoritários, com seus tempos de retenção, classe química e similaridade. Dentre os CV's majoritários, foram encontradas seis classes químicas, sendo o percentual do perfil volátil: 6,25% é um aldeído, 6,25% é um álcool, 6,25% é um organossulfurado, 12,50% são ésteres, 6,25% é um ácido carboxílico e 62,50% são terpenos e terpenoides.

No Refresco Misto, incluem-se compostos como o *cis*-3-hexenal, *cis*-3-hexen-1-ol e o isolatiocianato de alila, uma vez que eles possuem importância comercial para indústrias de

alimentos e de perfumarias, pois, conforme os órgãos FAO (*Food and Agriculture Organization*), FDA (*Food and Drug Administration* EUA) e FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*) são compostos voláteis utilizados como agentes aromatizantes. Os compostos cis-3-hexenal e cis-3-hexen-1-ol atribuirão características aromáticas intensa de grama, folhas verdes recém cortadas e frutado, sendo muito comum em hortaliças, mas podem ser encontrados em tomates maduros, condimentos e temperos (MATSUI, 2006; PUBCHEM, 2004, 2021). Quanto ao isotiocianato de alila, é responsável pelo sabor pungente de mostarda, raiz-forte e wasabi. Na indústria de alimentos, é uma alternativa utilizada como conservante químico em alimentos (antimicrobiano) por ser capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias e fungos micotoxigênicos e deteriorantes (DHINGRA *et al.*, 2004).

Tabela 2 - Perfil de compostos majoritários voláteis do Refresco Misto.

Composto	Formula Molecular	Estrutura Química	Tempo. de Retenção	Área (%)	Similaridade (%)
Aldeído					
cis-3-hexenal	C ₆ H ₂₀ O		2,84	2,68	45,94
Álcool					
cis-3-hexen-1-ol	C ₆ H ₁₂ O		3,65	1,63	54,05
Organossulfurado					
Isotiocianato de alila	C ₄ H ₅ NS		4,1	1,01	80,85
Ésteres					
Hexanoato de metila	C ₇ H ₁₄ O ₂		4,95	3,09	88,28
Acetato de nerila	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		16,59	2,70	43,71
Ácido Carboxílico					
Ácido caprílico	C ₈ H ₁₆ O ₂		10,1	1,48	74,92
Terpenos e Terpenóides					

Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O		8,32	4,55	28,99
cis-nuciferol	C ₁₅ H ₂₂ O		19,79	3,18	69,96
trans- α -bergamoteno	C ₁₅ H ₂₄		18,57	1,50	31,67
α -pineno	C ₁₀ H ₁₆		6,28	1,11	36,11
d-limoneno	C ₁₀ H ₁₆		7,56	44,59	70
citral	C ₁₀ H ₁₆ O		14,13	9,73	95
(-)-zingibereno	C ₁₅ H ₂₄		20,14	3,74	61,6
α -farneceno	C ₁₅ H ₂₄		20,36	3,11	72,44
β -atlantol	C ₁₅ H ₂₄ O		20,47	9,16	35,51
α -sesquifelandreno	C ₁₅ H ₂₄		20,87	2,96	70,88

Fonte: Autor (2022); PubChem (2021); Nist (2022).

Os ésteres são desenvolvidos a partir de uma reação de condensação catalisada por enzima entre um ácido graxo ativado (acil-CoA) e um álcool (VERSTREPEN *et al.*, 2003). Segundo o sistema informativo da TGSC (*The Good Scents Company*) (2021), os dois compostos ésteres são utilizados pelos ramos de alimentos e de perfumaria como agentes aromatizantes ou fixadores de aroma, então o hexanoato de metila é responsável pela sensação

de frescor, frutado, muito comum em abacaxi, mas já foi identificado nos frutos pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) (ANDRADE; MAIA, 2007; PINO *et al.*, 2010); e o acetato de nerila é comumente encontrado em óleos essenciais em vegetais de caráter cítrico sendo responsável por conferir aromas florais e frutados, sensação de cítrico, frescor e doce.

O composto ácido caprílico, presente no Refresco Misto, é um nome comum para o ácido graxo também conhecido como ácido octanoico, de gosto desagradável e rançoso. Comercialmente, a produção desse éster é usada em perfumaria e na fabricação de corantes para industrial em geral. Também tem sido usado em tratamentos específicos para pacientes que sofrem de má absorção, insuficiência pancreática, com déficit ou ausência de sais biliares. Este ácido graxo tem sido usado em dietas para pessoas subnutridas, crianças prematuras e outros distúrbios, devido à grande facilidade em fornecer energia (SAMPELAYO *et al.*, 2007; VANDENBERGHE *et al.*, 2017).

Os resultados mostraram que a classe química terpenos e terpenoides é a principal fração volátil no Refresco Misto. Com ampla aplicação na perfumaria e cosméticos, mas tais compostos também tem sua relevância aplicabilidade na indústria alimentícia por contribuir no reforço ou na melhora da qualidade sensorial dos alimentos (RAVINDRA; KULKARNI, 2015). Alguns compostos como:

O terpineol de odor agradável obtido naturalmente tem sido extraído de diversas fontes como óleo de cajeput, óleo de pinho e óleo de petitgrain (BAPTISTELLA *et al.*, 2009).

O *cis*-nuciferol, atualmente o óleo essencial de sândalo (*Santalum austrocaledonicum*), demonstra ser a única fonte natural do composto volátil, podendo ser obtido numa 5-15% do composto ao extrair óleo essencial (Page *et al.*, 2010). A característica aromática é descrita como amadeirado-doce, balsâmico animal e muito adesivo. O composto está associado a atividades biológicas, tais como: elevar o humor, por agir diretamente no sistema nervoso central, acalmar a mente, a agitação e a ansiedade, sendo muito utilizado em casos de depressão (BUSSE *et al.*, 2014).

O *trans*- α -bergamoteno, é um composto químico encontrado em uma variedade de vegetais, principalmente em óleos essenciais. O composto volátil já foi encontrado nos óleos de cenoura, bergamota, lima, cidra, semente de algodão e kumqua. Também muito utilizado para biossíntese de antibióticos (SCHEE *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2017).

O α -pineno já foi detectado em óleos essenciais em espécies de árvores coníferas (pinheiro), aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem), também foi identificado o isômero em alecrim (*Rosmarinus officinalis*), óleos de eucalipto (*Eucalyptus*) e lavanda

(*Lanandula officianalis*) (BAKKALI *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2015). O α -pineno vem instigado a curiosidade acadêmica por ser apontado como um grande potencial nas funções biológicas, porque é anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano (MATSUO *et al.*, 2011; NAM *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

O d-limoneno, é encontrada em frutas cítricas, principalmente em óleos essenciais das cascas de limões e laranjas. Industrialmente tem apresentado destaque devido à sua capacidade como solvente biodegradável, pois se decompõe naturalmente pelos microrganismos e apresenta baixa toxicidade (nula) – tem sido usado na substituição de componentes tóxicos em defensivos agrícolas e em alguns processos de biotransformação farmacêuticas (PARKDEL; PANTEA; ROY, 2001). Por apresentar essa baixa toxicidade, alguns estudos apontam propriedades antioxidantes (ROBERTO *et al.*, 2010; SUN, 2007), vasodilatadoras (ANDRADE *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2015) e anti-hipertensivas (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

O citral possui forte aroma de limão/laranja, naturalmente encontrados em capim-limão (*Cymbopogon citratus/flexuosus*), citronela (*Cymbopogon nardus*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), litsea cubeba (*Litsea cubeba*) e outras matrizes. Esse composto pode ser encontrado como citral A (geranial, *trans*-isômero), responsável pelo forte aroma cítrico, e citral B (neral – *cis*-isômero), expressa um aroma mais suave e doce. Para a indústria, é um material químico de importância comercial, pois proporciona a fabricação de aromas e fragrâncias (cosméticos, perfumarias e alimentos), além de alguns exemplares de biocidas e fármacos (AZAMBUJA, 2009). Através de estudos, o composto oferece benefícios terapêuticos, tais como: diminuir a pressão arterial (OLIVEIRA; ARAUJO, 2007), sendo um excelente calmante (PEIXOTO *et al.*, 2015) e diurético (NUNES; BERNARDINO; MARTINS, 2015), e potencializar o efeito do antibiótico em bactérias resistentes (LUCENA *et al.*, 2015).

Os compostos (-)-zingibereno, α -farneceno, β -atlantol e α -sesquifelandreno identificados nesse estudo são constituintes predominantes no *Zingiber officinale*, podendo encontrar cerca de 30% ao todo e responsáveis pelo sabor característico do gengibre (RANI, 1999). Estes compostos químicos apresentam forte ação antimicrobiano, como principal atividade biológica, frente a vários patógenos alimentares (AHMED *et al.*, 2012; SANGUANPUAG *et al.*, 2011; YOUSUFIL, 2012). De acordo com pesquisas com finalidade de certificar a ação fitoterápica desses compostos voláteis, observaram-se, dentre elas, as ações anti-inflamatórias, causando a sensação de alívio dos sintomas de doenças inflamatórias (colite ulcerosa, artrite reumatoide, entre outras), antitumorais, antioxidantes, bactericidas e

antivirais (NAGENDRA CHARI *et al.*, 2013); e o efeito termogênico, potencial controle da glicemia e do colesterol (PALATTY *et al.*, 2013), como também de dores musculares, dores de garganta, cólicas, prisão de ventre, indigestão, vômitos, febre e doenças infecciosas (SILVA *et al.*, 2017).

6.3. Estudo de estabilidade dos CV's

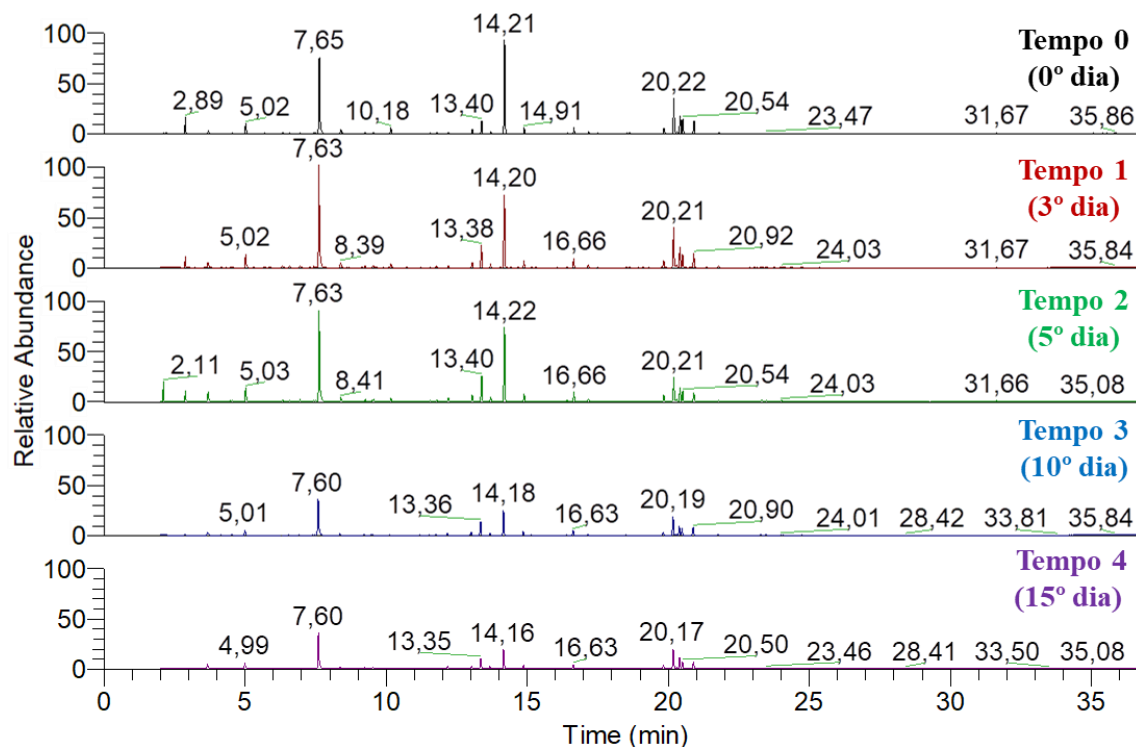
Ao longo do estudo de estabilidade, as condições foram as mesmas até o último tempo, definidas para extração em fase sólida pela técnica *HS-SPME*, com a fibra PA (85 µm) sobre influência de temperatura a 65 °C com tempo de exposição da fibra em 20 minutos. Proporcionou a identificação inicial (Tempo 0) de 90 compostos voláteis e 63 no último período de análise da estabilidade (Figura 16).

O Refresco Misto foi simulado ao sistema de refrigeração doméstica, mesmo utilizando uma embalagem apropriada para bebidas, ainda é necessário que haja proteção da influência externa (ambiente), com a finalidade de monitorar os CV's como medida de qualidade do produto final, pois, em apenas em curto período de dias de armazenamento, é perceptível a queda de números de compostos voláteis.

Autores como Müller *et al.* (2006) e Uekane, Rocha-Leão e Rezende (2013) citam que geralmente as principais causas dessas perdas de voláteis são a evaporação, a degradação e a oxidação de alguns constituintes (presença de ácidos graxos), e que são influenciadas pela solubilidade em água, reatividade dos componentes, temperatura, umidade e presença de oxigênio. A presença de oxigênio atmosférico e peróxido de hidrogênio pode iniciar o processo oxidativo, situação comum ao abrir qualquer bebida (sucos, vinhos, refresco etc.), como também metais de transição, como o ferro (II), capaz de desestabilizar indiscriminadamente diversos compostos voláteis (Jofré *et al.*, 2010).

Lopéz *et al.* (2006) e Jofré *et al.* (2010) relatam que a matriz alimentar sofre perdas significativas de compostos voláteis durante as etapas de processamento, pois a presença de substâncias oxidativas como metais ou a ocorrência de luz provocam a instabilidade desses compostos. Além disso, Müller *et al.* (2006) expõem fatores como a extração com água, as interações com outros compostos da matriz portando a captura do analito, formando ligações covalentes, a presença de ácido orgânicos e os produtos de degradação por temperaturas elevadas.

Figura 18 - Sobreposição comparativa dos cromatogramas na identificação dos compostos voláteis no Refresco Misto a partir das condições de extração definidas no estudo ao longo do período de armazenamento de 15 dias.



Fonte: Autor (2022).

No presente estudo, foram determinados, de acordo com a Tabela 2, o perfil volátil, sendo 16 componentes, do Refresco Misto. Os resultados são apresentados na Tabela 3, na qual foram representados em valores do percentual de estabilidade, utilizando as áreas cromatográficas, durante o período de 15 dias, em que foi possível observar oscilações nos valores ao longo do período avaliado.

Os valores percentuais de degradação são apresentados como valores absolutos, porém podem ocorrer números negativos e/ou positivos. Nesse estudo, os valores em destaque foram negativos e correspondem aos compostos *cis*-3-hexen-1-ol, ácido caprílico, *trans*- α -bergamoteno e *cis*-nuciferol. Os percentuais negativos são comumente encontrados em estudos de estabilidade de compostos voláteis (AHN; DEEP; KIM, 2016; HERRINGTON, 2021; SILVA *et al.*, 2016), onde citam como uma das causas desse comportamento a adsorção dos analitos no método utilizado para extração dos compostos voláteis, reações químicas com água ou outros compostos presentes.

Tabela 3 - Valores da área cromatográfica dos compostos voláteis que compõem o perfil volátil do Refresco Misto, mostrando o percentual de degradação de cada composto após 15 dias.

Compostos	Área Cromatográfica ($\times 10^7$)					Degradação %
	Tempo 0 (0 dia)	Tempo 1 (3º dia)	Tempo 2 (5º dia)	Tempo 3 (10º dia)	Tempo 4 (15º dia)	
<i>cis</i> -3-hexenal	9,79	7,48	7,45	1,25	1,31	86,62
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	3,31	6,14	9,81	4,54	5,31	-60,42
Isolatiocianato de alila	0,46	0,47	0,46	0,18	0,25	45,65
Hexanoato de metila	9,92	11,01	12,41	5,73	6,31	36,39
α -pineno	1,65	2,10	1,59	0,68	0,55	66,67
d-limoneno	83,98	96,45	92,15	43,13	40,15	52,19
Terpineol	4,47	5,47	5,21	2,57	2,412	46,04
Ácido caprílico	5,23	4,58	3,78	0,85	10,86	-107,65
Citral	81,37	71,64	66,93	25,43	4,65	94,29
Acetato de nerila	6,77	8,59	8,43	5,19	0,56	91,73
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1,43	1,38	1,14	0,72	3,35	-134,27
<i>cis</i> -nuciferol	6,02	7,18	6,59	3,37	18,58	-208,64
(-)-zingibereno	37,29	37,34	22,14	18,2	10,17	72,73
α -farneceno	17,81	18,45	11,71	8,48	5,99	66,37
β -atlantol	13,48	11,49	10,48	6,43	6,55	51,41
α -sesquifelandreno	13,00	12,63	8,63	8,68	ND	33,23

ND – Não Detectado.

Fonte: Autor (2022).

Já os percentuais positivos podem ser atribuídos à partição dos compostos voláteis, como citado pelos Wootton *et al.* (1978), que relatam que uma parcela dos compostos, no caso dos refrescos mistos, poderia estar atuando na derivação, na formação de outros compostos ou agindo como agente reguladores (antioxidantes). Esses autores refizeram essas observações quando, ao estudarem seis méis australianos armazenados em temperatura ambiente no período de 44 dias, perceberam o surgimento inesperados de outros compostos (11 picos) e a diminuição da área cromatográfica dos 15 compostos que estavam previstos pelos pesquisados. Esses resultados de percentuais positivos com valores altos também podem ser obtidos por meio da degradação microbiana e das atividades enzimáticas, conforme demonstram Mo, Xu e Fan (2010) Para isso, eles consideraram as eventualidades do catabolismo microbiano e da atividade enzimática envolvidas nas oscilações durante o estudo e conseqüentemente no aumento do percentual de degradação ao estudarem as características aromática do vinho de arroz chinês e os possíveis fatores que influenciariam no sabor do vinho.

Conforme a metodologia de Herrington (2021), os compostos que apresentam percentual de degradação $\leq 30\%$ são considerados estáveis ao longo período de estudo em 30 dias. Enquanto, nos trabalhos de Ahn, Deep e Kim (2016) e Silva *et al.* (2016) a estabilidade do composto estaria nos valores $\leq 25\%$. Os resultados deste experimento, no cenário de 15 dias de armazenamento, com valor médio de alteração percentual entre os compostos foi de 72,84, e indicam que nenhum dos compostos foi considerado estável, pois os valores de degradação aumentam a partir do 10º dia de armazenamento, mas poderiam ser citados os compostos com os percentuais mais próximos dos autores, que seriam o Hexanoato de metila (36,39%) e α -sesquifelandreno (33,23%), porém o α -sesquifelandreno não foi identificado no último período de estudo.

Ademais, há existência de compostos que ultrapassaram valor de 100% e que, para alguns autores, são conhecidos como anomalias. Castro-Vázquez *et al.* (2012) também observaram essa anomalia em alguns compostos voláteis com o avanço do período 12 meses de armazenamento sob temperatura de 40 °C, em méis frescos da Espanha, relatando que esses compostos também poderiam estar transitando pelos processos fermentativos, afetando a qualidade do mel, apresentando as perdas de compostos voláteis.

A validade de um produto é determinada pela empresa com base no tempo em que o produto mantém suas propriedades e permanece adequado para consumo. Em decorrência disso, refrescos ou bebidas de frutas ou vegetais, ou ambos, são geralmente consumidos em um prazo de três dias, com ou sem conservantes, após aberto, como é informado pelo produtor (SOUZA, 2010). Com base nessa concepção, o Refresco Misto poderia ser consumido entre o 3º e o 5º dia, pois nesse intervalo foram observados 6 compostos voláteis (*cis*-3-hexenal, α -pineno, ácido caprílico, Citral, β -atlantol e α -sesquifelandreno) com estabilidade $\leq 27,72\%$, os quais são apontados como com promissoras propriedades biológicas como ações anti-inflamatórias e antimicrobianos, calmante, na diminuição da pressão arterial, diuréticos entre outros.

Souza (2010) realizou um estudo semelhante a este, ao implementar uma pesquisa de estabilidade do perfil voláteis em néctar de laranja industrializado, sem conservante, com o produto aberto e mantido sob refrigeração no período de três dias, como indicado no rótulo. E constatou que sete compostos (etanol, butanoato de etila, mirceno, octanal, linalol, β -terpíneol e α -terpíneol) mantiveram um percentual de estabilidade entre 0,3 e 11,1%, com exceção do limoneno, que apresentou 63,6%, sendo percebido que o composto é mais suscetível à degradação. Apontaram, também, a confiabilidade na estabilidade dos compostos voláteis do néctar de laranja industrializado, vendido em estabelecimentos, se

consumido no período de três dias após aberto, e que pode ser aplicado a outros sucos ou bebidas nas mesmas condições.

Os Compostos Voláteis estão presentes no Refresco Misto devido à sua solubilidade em água, logo são considerados importantes quando se tratar de uma avaliação qualitativa, sensorial e tecnológica do produto. Além disso, tem o aspecto da adequação da matéria-prima, devido às características de cada ingrediente, pois, na composição volátil, foi observada uma satisfatória variação de substâncias químicas, que podem ter sido influenciadas por diversos fatores, podendo citar condições climáticas, fatores culturais, época de colheita e maturação do material vegetal utilizado (DAMIANI *et al.*, 2009).

7 CONCLUSÃO

O Refresco Misto elaborado com abacaxi, couve, limão e gengibre pode ser considerado um produto inovador, ainda pouco explorado comercialmente. O presente estudo auxilia no impacto que esse produto pode ter no mercado, por ser de baixo risco para o desenvolvimento microbiano – é classificado como bebida muito ácida – e por apresentar razoável teor de sólidos solúveis totais, que aproveita o grau de doçura, expressado apenas pelo conteúdo de açúcares solúveis que estão naturalmente presente no material vegetal, sem emprego de aditivo alimentar. Apesar de apresentar diferença estatística, o estudo mostrou que os dois métodos são capazes de determinar ácido cítrico em refrescos mistos de frutas e hortaliças, todavia acidez por titulação pode não ser o mais adequado para determinar a concentração real do ácido orgânico, visto que os métodos cromatográficos apresentam maior seletividade, precisão e exatidão. O *ratio* indica um sabor mais ácido e menos doce.

Na análise de CV's, após o experimento de otimização, o método que emprega o uso da fibra PA (85 µm), extraída por *HS-SPME*, exposta a uma temperatura de 65 °C por 20 minutos de exposição, a fibra apresentou a melhor eficiência para identificação dos compostos voláteis, sendo 90 ao todo. No perfil volátil, foram classificados 17 compostos majoritários voláteis divididos nas classes químicas, sendo 5,88% aldeído, 5,88% organossulfurado, 17,65% álcool, 23,53% ésteres, 23,53% terpenos e 23,53% sesquiterpenos.

O estudo de estabilidade dos CV's mostrou uma degradação muito perceptível de 90 para 60 compostos no período de 15 dias. Possíveis causas dessa redução na quantidade de compostos são os fatores externos ao abrir a garrafa de vidro contendo o Refresco Misto até o momento da análise. Tratando-se do perfil volátil, alguns compostos se mostraram estáveis no intervalo de 3 a 5 dias, com níveis percentuais de estabilidade abaixo de 27,72%, podendo garantir as propriedades funcionais e biológicas do Refresco Misto com validade de até 5 dias, armazenado sobre refrigeração em ambiente doméstico.

Como perspectivas de trabalho, são necessários mais estudos com diferentes temperaturas de armazenamento e tipos de embalagem com o propósito de investigar como estes fatores influenciariam no comportamento dos compostos orgânicos voláteis, no perfil volátil majoritário e na estabilidade dos compostos presentes nos refrescos mistos de frutas e hortaliças, como também averiguar a influência microbiológica no produto ao longo do armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. A.; JABBAR, I.I.; ABDUL, H.E.; MUSTANSIRIYA, A.L. Study the antibacterial activity of Zingiber officinale roots against some of pathogenic bacteria. **Al-Mustansiriya Journal Science**, v.23, n.3, p.63-70, 2012.

AHN, J-H.; DEEP, A.; KIM, K-H. The storage stability of biogenic volatile organic compounds (BVOCs) in polyester aluminum bags. **Atmospheric Environment**, v. 141, p. 430-434, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.019>

ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 95, n. 2, p. 69–77, 2004. <https://dx.doi.org/10.52590/M3.P620>

ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Constituintes voláteis do fruto de *Caryocar brasiliensis* Camb. (pequi). PN-194, **Anais**, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2007. Disponível em <http://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1333-2.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2021.

ANDRADE, T. U.; BRASIL, G. A.; ENDRINGER, D. C.; NOBREGA, F. R.; SOUSA, D. P. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1539, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22091539>

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis** – AOAC International. 19th ed. Maryland, USA, 2012.

ARAUJO, J. K.; SENA, M. D. D. Avaliação físico-química de polpas de frutas comercializadas em Montes Carlos-MG. **Anais**, 18ª CONIC-SEMESP, Universidade Paulista, v. 6, 2018. Disponível em: <https://conic-semesp.org.br/anais/files/2018/trabalho-1000002001.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGENS - ABRE. **Consumo de suco integrais vai crescer 36,3 % até 2018**. Disponível em: <http://www.abre.org.br/noticias/consumo-de-sucos-integrais-vai-crescer-363-ate-2018>. Acesso em: 20 jun. 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIA DE REFRIGERANTES E DE BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS – ABIR. **Del Valle Frutas + Vegetais chega ao mercado de São Paulo**. Disponível em: <https://abir.org.br/del-valle-frutas-vegetais-chega-ao-mercado-de-sao-paulo/>. Acesso em: 27 set. 2020.

ASSUNÇÃO, D. A. *et al* Caracterização dos compostos voláteis do kiwi empregando-se HS-SPME/CG-MS. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, e55491110054, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10054>

ATALLA, M. **Os sucos detox funcionam?** Revista Época, 2017. Disponível em: <https://epoca.oglobo.globo.com/saude/marcio-atalla/noticia/2017/04/os-sucos-detox-funcionam.html>. Acesso em: 16 fev. 2022.

AZAMBUJA, W. **Citral**. Óleos Essenciais, 2009. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/citral/> Acesso em 24 de janeiro de 2022

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BAPTISTELLA, L. H.; IMAMUR, P. M.; MELO, L. N.; CASTELLO, C. Preparação do (+)- $\pm$ -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1069-1071, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400042>

BONG, W.C.; VANHANEN, L.P.; SAVAGE, G.P. Addition of calcium compounds to reduce soluble oxalate in a high oxalate food system. **Food Chemistry**., v.221, p.54-57, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.031>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 19, de 10 de junho de 2013**. Estabelece em todo território nacional a complementação dos padrões de identidade e qualidade para refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto

para consumo e soda. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 de jun. 2013, edição: 117, seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017**. Dispõe critérios de para validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de jul. 2017, edição 141, seção 1, p. 87, 2017. Disponível em:

https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017. Acesso em: 11 nov. 2021.

BUSSE, D. *et al.* A synthetic sandalwood odorant induces wound healing processes in human keratinocytes via the olfactory receptor OR2AT4. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 11, p. 2823–2832, 2014. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.273>

CASTRO, J. J. L.; MACCA, M. F. Desarrollo de um método analítico de preparación de muestras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COP) mediante cromatografía. **Revista Colombiana de Química**, v. 47, n. 3, p. 41-51, 2018. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.72437>

CASTRO-VÁRQUEZ, L.; ALAÑON, M. E.; GONZALEZ-VIÑAS, M. A.; PÉREZ-COELLO, M. S. Changes in the volatile fractions and sensory properties of 57iferen honey during storage under 57iferente temperatures. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 185-193, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1756-1>

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. (Ed.). Lavras: UFLA, 2005.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006, 452p.

CONCEIÇÃO, S. R.; NETA, L. S. F.; GOMES, F. C. O.; MACHADO, A. M. R. Perfil cromatográfico da cerveja do fundo de dorna recuperada por microfiltração. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n.4, p.17884-17897, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-092>

COSTA, W. S.; FILHO, J. S.; MATA, M. E. R. M. C.; QUEIROZ, A. J. M. Influência da concentração de sólidos solúveis totais no sinal fotoacústico de polpa de manga. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 141-147, 2004. <http://dx.doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v6n2p141-147>

COSTA, C. D. Micro-extração em fase sólida (SPME) *in situ* e comparação de compostos voláteis em variedades de manga (*Mangifera indica* L.) resistentes e suscetíveis à mosca-das-frutas *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae). **Tese (Doutorado em Química)**, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2014, 128 p.

DAMIANI, C. *et al.* Volatile compounds profile of fresh-cut peki fruit stored under diferente temperature. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 435-439, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200032>

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L.; SILVA, G. J. Jr.; MIZUBUTI, E. S. Essentials oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 683-686, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600017>

DUDAREVA, N.; PICHERSK, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, pp. 1893–1902, 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049981>

EL-SHATANNOVI, G.A.T.A.; ASHOUSH, I. S.; AHMED, E.; ALI, S. A Antiatherogenic properties of vegetable juice rich in antioxidants in cholesterol-fed rats. **Annals of Agricultural Sciences**, v.57, n.2, p.167-173, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2012.08.011>

EMWAS, A-H.; AL-TALLA, Z. A.; YANG, Y.; KHARBATIA, N. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. In: BJERRUM, J. T. (ed.). **Methods in Molecular Biology (Clifron, N. J.)**, v. 1277, New York: Springer Science+Business Media, p. 91-112, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_8

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aroma e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>

FIB -Food Ingredients Brasil. Conservação de Alimentos por Aditivos Químicos. **Revista Food Ingrediets**, nº 22, 2012. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060331891001467132636.pdf. Acesso em: 09 nov. 2021.

FOGAÇA, J. R. V. **Alcadienos**. Manual da Química, 2022. Disponível em: <https://www.manualdaquimica.com/quimica-organica/alcadienos.htm>. Acesso em: 28 mar. 2022.

FOUCHY, M. V. *et al.* Desenvolvimento de suco detox sem aditivos e sua aceitabilidade em relação a uma formulação comercial. **Brazilian Journal of Technology**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 601-607, 2019.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GARCÍA, Y. M. *et al.* SPEM fiber evaluation for volatile organic compounds extraction from acerola. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 2, p. 247-255, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180173>

GARCÍA, Y. M. *et al.* Extração e análise de compostos orgânicos voláteis por SPME-HS e GC-MS – um breve referencial teórico. In: MELO, J. O. F. (Org.). **Ciências Agrárias o avanço da ciência no Brasil**, v. 1, Guarujá, São Paulo: Científica Digital, p. 68-83, 2020. <https://dx.doi.org/10.37885/210504640>

GOFF, S.A.; KLEE, H.J. Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? **Science**, v. 311, p. 815-819, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1112614>

GOMES, M. S. *et al.* Elaboração de suco misto de maracujá, laranja, hortelã e limão-toranja. In: Química: Tencologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. **Anais**, 56° Congresso de Química, Belém, Para, 2016. Disponível em:

<http://www.abq.org.br/cbq/2016/trabalhos/10/9508-22744.html>. Acesso em: 10 nov. 2021.

GOECKI, P. *et al.* Perioperative supplementation with a fruit and vegetable juice powder concentrate and postsurgical morbidity: a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, v.37, n.5, p.1448-1455, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.08.004>

HELENO, F. F. Desenvolvimento, otimização e validação de metodologias analíticas (HS-GC-FID, HS-GC-MS e HS-SPME-GC-MS) para determinação de BTEX em matrizes aquosas ambientais. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)**, Universidade Federal de Ouro Preto, 2009. Disponível em

https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3310/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_DesenvolvimentoOtimiza%C3%A7%C3%A3oValida%C3%A7%C3%A3o.pdf. Acesso em: 20 out. 2021.

HEERINGTON, J. Storage stability of 66 volatile organic compounds (VOCs) in silicon-lined air conisters for 30 days. **Technical Note**, Environmental Applications, 2021.

Disponível em: <https://www.restek.com/globalassets/pdfs/literature/evan2066-unv.pdf>.

Acesso em: 02 dez. 2021.

JOFRÉ, V. P. *et al.* Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of 60úlfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry. **Analítica Chimica Acta**, v. 683, n. 1, p. 126-135, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.010>

KIM, D-S. *et al.* Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-kB pathway in mouse peritoneal macophages. **The Americam. Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 4, p. 731-742, 2015.

<https://doi.org/10.1142/s0192415x15500457>

KIM, M. J. *et al.* H. Lemon detox diet reduced body fat, insulin resistance, and serum hs-CRP level without hematological changes in overweight Korean women. **Nutrition Research**, v.35, n.5, p.409-420, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.04.001>

LEONE, R. S. Desenvolvimento de suco misto de frutas e hortaliça para melhoria da qualidade nutricional e funcional. **Dissertação (Ciência e Tecnologia em Alimentos)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/2859/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2021.

LIMA, L. L. A. *et al.* Otimização e validação para determinação de ácidos orgânico em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1186-1189, 2010.

LIMA, M. A. *et al.* Avaliação do suco misto de acerola com manjeriço. In: DALLAMUTA, J. (Org.). **Estudos Transdisciplinares nas Engenharias**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, v. 1, p. 93-101, 2019. 10.22533/at.ed.55219300511

LÓPEZ, R.; LAPEÑA, A. C.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Quantitative determination of wine highly volatile 61 sulfur compounds by using automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. Critical study and optimization of a new procedure. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1-2, p. 8-15, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.053>

LUCENA, B. F. F. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2015. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>

MACHADO, P. G. *et al.* Elaboração de suco misto de frutas com potencial funcional e comparação com suco comercial “Detox”. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2017.

MARQUES, S. Influência de diferentes porta-enxertos na composição química dos óleos essenciais e do suco de tangerina Fremont IAC 543. **Dissertação (Química)**, Instituto de

Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-25092019-090235/publico/StephanoMarquesrevisada.pdf>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

MARTINS, K. S. *et al.* Parâmetros físicos e químicos de limas ácidas ‘Tahiti’ e limões ‘Galego’ produzidos no cerrado brasileiro. **Centro Científico Conhecer**, v. 15, n. 27, p. 194-199, 2017. http://dx.doi.org/10.18677/EnciBio_2018A64

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. **Current Opininion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 274-280, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.002>

MEDEIROS, W. J. F. *et al.* Qualidade química em frutos de maracujeiro-amarelo cultivado em solo com biofertilizantes bovino. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 26, n. 2, p. 156-168, abr./jun., 2014.

MATSUO, A. L. *et al.* α -pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n. 2, p. 449-454, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.176>

MO, X.; XU, Y.; FA, W. Characterization of aroma compounds in chinese rice wine qu by solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2462-2469, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf903631w>

MÜLLER, C.; HEMMERSBACH, S.; SLOT, C. V.; HOFMANN, T. Synthesis and structure determination of covalent conjugates formed from the sulfury-roasty-smelling 2-furfurylthiol and di- or trihydroxybenzenes and their identification in coffee brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10076-10085, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf062728q>

MURAKAMI, M. L. K. P.; RODRIGUES, E. C.; ANTUNES, V. C.; CASTRO, W. F. Análise físico-química e sensorial de suco misto de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, Var.

pera-rio) e couve (*Brassica oleracea* L. Var. acephala). **Sinergia**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 89-94, 2020.

NAGENDRA CHARI, K.L.; MANASA, D.; SRINIVAS, P.; SOWBHAGYA, H. B. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food Chemistry**, v. 15 n. 139, p. 509-514, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.099xz>

NAKAYAMA, V.L.T. **A importância das hortaliças na alimentação humana**. Manual da Horta, cap. 02, p. 08-11, 2010. Disponível em: https://www.cdn.ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2013/09/02manualhorta_1253891788.pdf. Acesso em: 20 jun. 2020.

NAM, S-Y. *et al.* The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 273-282, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.010>

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. **Cromatografia Gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.

NASCIMENTO, G. A. *et al.* Efeitos Bradicárdicos e Antiarrítmicos do D-Limoneno em Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 5, p. 925-932, 2019.
<https://dx.doi.org/10.5935/abc.20190173>

NIST – National Institute of Standards and Technology. **NIST Livro de Química na web, SRD 69**. U. S. Departmente of Commerce, 2022. Disponível em <https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>. Acesso em: 30 mar. 2022.

NUNES, M. G. S.; BERNARDINO, A. O.; MARTINS, R. D. Uso de plantas medicinais por pessoas hipertensão. **Revista de Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 16, n. 6, p. 775-781, 2015. 10.15253/2175-6783.2015000600002

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 123, p. 13-23, 2017. <https://doi.org/10.1002/jib.389>

OLIVEIRA, C. J.; ARAUJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 9, n. 1, p. 93-105, 2007. <https://doi.org/10.5216/ree.v9i1.7138>

PAGE, T. *et al.* Geographic and Phenotypic Variation in Heartwood and Essential-Oil Characters in Natural Populations of *Santalum austrocaledonicum* in Vanuatu. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 8, p. 1990–2006, 2010. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900382>

PAIVA, A. C. Caracterização de cervejas utilizando a GC x GC-MS e análise de multivariada de dados. **Dissertação (Mestrado em Química)**, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1164818?guid=1648038010167&returnUrl=%2fresultado%2flistar%3fguid%3d1648038010167%26quantidadePaginas%3d1%26codigoRegistro%3d1164818%231164818&i=3>. Acesso em: 20 out. 2021.

PAKDEL, H.; PANTEA, D. M.; ROY, C. Production of dl-limonene by 64acum pyrolysis of used tires. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 57, n. 1, p. 91-107, 2001. <https://doi.org/10.1016/S0165-2370%2800%2900136-4>

PALATTY, P. L. *et al.* Gingerin the prevention of nausea and vomiting: a review. **Revista Food Science and Nutrition**, Índia, p. 659-669, 2013. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.553751>

PAWLISZYN, J. **Handbook of solid phase microextraction**. Beijin: Chemical Industry Press, 2009. 406 p.

PEIXOTO, M. I.; LIMA, E. L. M.; ANDRADE, E. T. S.; BÚ, E. A. Plantas medicinais utilizadas por idosos da zona rural de Fagundes-PB. **Anais do 4º Congresso Internacional de Envelhecimento Humano**, Campina Grande: Realize Editora, v. 2, n. 1, 2015. Disponível

em: <https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/12679>. Acesso em: 24 jan. 2022.

PEREIRA, J.A. *et al.* Composição química e actividade antioxidante das folhas internas da couve tronchuda. **Actas** do 8º Encontro de Química dos Alimentos, Beja, Portugal, p. 71-74, 2007. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6040/1/PAC%20-%202014.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2022.

PINO, J. A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C. E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Food Science and Tchenology**, v. 30, n. 1, p. 183-187, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000100028>

PRIMAK, T. K.; LIMA, C. S. M. Ácido salicílico nas características agronômicas e físico-químicas de couve folha. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 32, dezembro, 2017. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YbWwtKFHXdunlvO_2018-1-25-15-0-33.pdf. Acesso em: 24 jan. 2022.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), **National Center for Biotechnology Information**; 2021. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 de mar. 2022.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information; 2004-. **Resumo do composto PubChem para CID 643941, cis-3-Hexenal**, atualizado em 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-3-Hexenal>. Acesso em: 28 nov. 2021.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information; 2004-. **Resumo do composto PubChem para CID 5281167, cis-3-Hexen-1-ol**, atualizado em 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-3-Hexen-1-ol>. Acesso em: 28 nov. 2021.

RANI, K. Cyclisation of farnesyl pyrophosphate into sesquiterpenoids in ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 568-574, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00090-8)

RAVINDRA, N.S., KULKARNI, R.N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 31–35, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.023>

ROBERTO, D. *et al.* Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 1, p. 38-44, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x>

RODRIGUES, D. B. *et al.* J. Characterization of volatile compounds and bioactive compounds os Pulp and jelly of cagaita by soli phase microextraction in the headspace mode and mass spectrometry by paper spray. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e25610111735, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11735>

SA-NGUANPUAG, K. *et al.* Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: a case study in shredded green papaya. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.13, n. 6, p.895-901, 2011.

SANTOS, B. O. *et al.* Avaliação da extração de compostos voláteis presentes no pericarpo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) empregando-se a fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno. **Anais**, XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X CIGR Setion, IV International Technical Symposium, FAURGS, Gramados, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/1613.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SANTOS, B. O. *et al.* Otimização das condições de extração dos compostos voláteis da casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) utilizando HS-SPME. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e919974893, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4893>

SAMPELAYO, M. R. S.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.; BOZA, Y. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 42-63, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.017>

SCHERER, R. *et al.* Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. **Food Chemistry**, v. 135, p.150-154, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>

SCHNEE, C. *et al.* The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 4, p. 1129-1134, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508027103>

SILVA, J.; SILVA, E. S.; SILVA, P. S. L. Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis nas diferentes partes do fruto da pimenta (*Annona squamona* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 562-564, 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000200057>

SILVA, R.M.; FIGUEIREDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; FEITOSA, R.M. Processamento e caracterização físico-química do suco misto melancia com pepino. **Revista Verde**, Pombal, PB, v. 11, n. 3, p. 65-68, jul-set., 2016. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v11i3.4087>

SILVA, E. B. M. Bebidas mistas industrializadas de frutas e vegetais “detox”: caracterização química, potencial antioxidante e estudo da rotulagem geral e nutricional. **Dissertação (Ciência de Alimentos)**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/30769/1/disserta%C3%A7%C3%A3o%20Eliane%20final%2022-8.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2021.

SILVA, M. R. *et al.* Determination of Chemical Profile of *Eugenia dysenterica* Ice Cream Using PS-MS and HS-SPME/CG-MS. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 129-136, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170680>

SILVA, T. V. *et al.* Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 3, p.545-550, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300007>

SILVA, A. C. R. *et al.* Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305-6316, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>

SILVA, A. *et al.* Propriedades Terapêuticas (*Zingiber officinale* R.). **Portal de Plantas Medicinais e Fitoterápicas - Boletim Fitoterápico Gengibre** (*Zingiber officinale* R.), Pará, v. 1, ed. 1, 2017. Disponível em: <https://docplayer.com.br/61968344-Boletim-fitoterapico-gengibre-zingiber-officinale-r-propriedades-terapeuticas-zingiber-officinale-r-a-atividade-anti-inflamatoria-do-gengibre.html>. Acesso em: 24 jan. 2022.

SILVA, C. M. *et al.* Avaliação da eficiência do método TO-15 para determinação de compostos orgânicos voláteis em condições típicas de ambiente urbano. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1245-1253, 2016. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170776>

SOUSA, D. P.; MESQUITA, R. F.; RIBEIRO, L. A. A.; LIMA, J. T. Spasmolytic Activity of Carvone and Limonene Enantiomers. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1893-1896, 2015. PMID: 26749818

SOUZA, A. M. Estabilidade do perfil voláteis do suco de laranja (néctar) industrializado. **Anais do 4º Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins**, São Carlos, SP: Instituto Internacional de Cromatografia, 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/876200/1/2010163.pdf>. Acesso em: 08 fev.2022

SOUTELO, A. C. M. *et al.* Análise dos compostos voláteis presentes em bebidas isotônicas comercializadas em Belo Horizonte – MG. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 4, p.16908-16918, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-019>

STATSOFT. **Statistica for Windows** –Computer program manual, versão 10.0. Tulsa: Statsoft Inc, 2011.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007. PMID: 18072821

TGSC - The Good Scents Company. **Fragrance and Flavor Demo Formulas**. Information System Providing information for the Flavor, Fragrance, Food and Cosmetic industries. Disponível em: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1008952.html>. Acesso em: 29 nov. 2021.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim SBCTA**, v. 34, n. 1, p. 52-59, 2000.

UEKANE, T M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; REZENDE, C. M. Compostos sulfurados no aroma do café: origem e degradação. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 891-911, 2013. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130064>

VALE, A. S. Fermentação de café com o uso de culturas mista de *Pichia Fermentans* E *Pediococcus Acidilactici*: impacto na formação de compostos aromáticos. **Dissertação (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/63734/R%20-%20D%20-%20ALEXANDER%20DA%20SILVA%20VALE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 19 out. 2021.

VANDENBERGUE, C. *et al.* Tricaprylin Alone Increases Plasma Ketone Response More Than Coconut Oil or Other Medium-Chain Triglycerides: An Acute Crossover Study in Healthy Adults. **Current Developments in Nutrition**, v. 1, n. 4, e000257, 2017. <https://dx.doi.org/10.3945%2Fcdn.116.000257>

VERSTREPEN, K. J. *et al.* Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110–118, 2003. PMID: 16233495

VILAR, S. B. O. *et al.* Caracterização físico-química de suco misto em pó obtido pelo método de secagem em camada de espuma. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e416985539, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5539>

XU, J. *et al.* New materials in solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p.68-83, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.012>

XU, C-H. *et al.* Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 12-20, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.022>

XU, X. *et al.* Comprehensive investigation on volatile and non-volatile metabolites in broccoli juices fermented by animal- and plant-derived *Pediococcus pentosaceus*. **Food Chemistry**, v. 341, 128118, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128118>

YANG, K. -L.; LAI, C. -H.; WANG, J. -L. Construction and validation of an automated spray-and-trap gas chromatograph for the determination of volatile organic 94 compounds in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 41-48, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.081>

YOUSUFI, M. K. To Study Antiacterial Activity of *Allium Sativum*, *Zingiber officinale* and *Allium Cepa* by Kirby-Bauer Method. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. v.4, n.5, p.6-8, 2012. <http://dx.doi.org/10.9790/3008-0450608>

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7th edition, Cambridge: Cambridge University Press, 2010. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511841477>

WOOTTON, M.; EDWARDS, R. A.; FARAJI-HAREM, R.; WILLIAMS, P. J. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of australian honeys 3. changes in volatile components. **Journal of Apicultural Research**, v. 13, n. 3, p. 167-172, 1978. <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099921>

ZHOU, W. *et al.* Tissue-Specific Emission of (E)- α -Bergamotene Helps Resolve the Dilemma When Pollinators Are Also Herbivores. **Current Biology**, v. 27, n. 9, p. 1336-1341, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.017>