

## Desenvolvimento de Refrigerante com Adição de Extrato de *Baccharis*

### *dracunculifolia*: Análises Físico-Químicas e Antioxidantes

Development of Soft Drink with Addition of *Baccharis dracunculifolia* Extract: Physicochemical and Antioxidant Analyzes

Desarrollo de un refresco con adición de extracto de *Baccharis dracunculifolia*: Análisis Físico-Químico y Antioxidante

Recebido: 16/03/2022 | Revisado: 22/03/2022 | Aceito: 29/03/2022 | Publicado: 05/04/2022

**Henrique Simão Moraes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1181-5312>

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil

E-mail: [henriquesimaomoraes@gmail.com](mailto:henriquesimaomoraes@gmail.com)

**Carlos Ricardo Maneck Malfatti**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1039-3034>

Universidade Estadual do Centro-Oeste

E-mail: [crmalfatti@gmail.com](mailto:crmalfatti@gmail.com)

#### Resumo

O consumo de refrigerantes tem aumentado nas últimas décadas, e está associado ao aumento da prevalência de obesidade, ganho de peso e diabetes. Estudos mostram uma relação direta entre dieta e saúde que, somados ao crescente interesse de alguns indivíduos em consumir alimentos mais saudáveis, tem elevado o interesse da indústria alimentícia em desenvolver novos produtos. O alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) é conhecido por possuir uma diversidade de compostos fenólicos. Dentre os efeitos do uso de *B. dracunculifolia* já observados na literatura, pode-se citar queda dos níveis de glicemia capilar de jejum e proteção de danos em órgãos, como fígado, rins e pâncreas. Quando adicionados aos alimentos, seus compostos antioxidantes são capazes de retardar a formação de produtos oxidativos, manter a qualidade nutricional do alimento e aumentar o seu prazo de validade. O presente trabalho realizou análises químicas e de propriedades antioxidantes de um refrigerante de laranja com a adição de extrato de *B. dracunculifolia*. Sob as condições deste trabalho, foram obtidos altos teores de compostos fenólicos totais (515,1 µg Eq GAE/g) e alta capacidade de eliminação de radicais livres ABTS (12356,6 µM trolox/g) e DPPH (0,851 µM trolox/g), além de um elevado poder antioxidante redutor de ferro III (18354 µM sulfato ferroso/g). O refrigerante de laranja enriquecido com extrato de *B. dracunculifolia* desenvolvido neste trabalho apresentou poder antioxidante mesmo em suas menores concentrações.

**Palavras-chave:** *Baccharis*; Antioxidante; Diabetes; Obesidade.

#### Abstract

Consumption of soft drinks has increased in recent decades, and is associated with increased prevalence of obesity, weight gain and diabetes. Studies show a direct relationship between diet and health which, added to the growing interest of some individuals in consuming healthier foods, has increased the interest of the food industry in developing new products. Rosemary (*Baccharis dracunculifolia*) is known to have a diversity of phenolic compounds. Among the effects of the use of *B. dracunculifolia* already observed in the literature, we can mention a drop in fasting capillary blood glucose levels and protection from damage to organs such as the liver, kidneys and pancreas. When added to foods, their antioxidant compounds are able to delay the formation of oxidative products, maintain the nutritional quality of the food and increase its shelf life. The present work carried out chemical and antioxidant analysis of an orange soft drink with the addition of *B. dracunculifolia* extract. Under the conditions of this work, high levels of total phenolic compounds (515.1 µg Eq GAE/g) and high free radical scavenging capacity ABTS (12356.6 µM trolox/g) and DPPH (0.851 µM trolox/g) were obtained in addition to a high iron III reducing antioxidant power (18354 µM ferrous sulfate/g). The orange soft drink enriched with extract of *B. dracunculifolia* developed in this work showed antioxidant power even in its lowest concentrations.

**Keywords:** *Baccharis*; Antioxidant; Diabetes; Obesity.

#### Resumen

El consumo de refrescos ha aumentado en las últimas décadas y se asocia con una mayor prevalencia de obesidad, aumento de peso y diabetes. Los estudios muestran una relación directa entre dieta y salud que, sumado al creciente interés de algunas personas por consumir alimentos más saludables, ha incrementado el interés de la industria alimentaria por desarrollar nuevos productos. Se sabe que el romero de campo (*Baccharis dracunculifolia*) tiene una

diversidad de compuestos fenólicos. Entre los efectos del uso de *B. dracunculifolia* ya observados en la literatura, podemos mencionar la disminución de los niveles de glucosa en sangre capilar en ayunas y la protección del daño a órganos como el hígado, los riñones y el páncreas. Cuando se añaden a los alimentos, sus compuestos antioxidantes son capaces de retrasar la formación de productos oxidativos, mantener la calidad nutricional del alimento y aumentar su vida útil. El presente trabajo realizó el análisis químico y antioxidante de un refresco de naranja con la adición de extracto de *B. dracunculifolia*. Bajo las condiciones de este trabajo se obtuvieron altos niveles de compuestos fenólicos totales (515.1 µg Eq Eq GAE/g) y alta capacidad de captación de radicales libres ABTS (12356.6 µM trolox/g) y DPPH (0.851 µM trolox/g), además a un alto poder antioxidante reductor de hierro III (18354 µM sulfato ferroso/g). Lo refresco de naranja enriquecida con extracto de *B. dracunculifolia* desarrollada en este trabajo mostró poder antioxidante incluso en sus concentraciones más bajas.

**Palabras clave:** *Baccharis*; Antioxidante; Diabetes; Obesidad.

## 1. Introdução

A *Baccharis dracunculifolia* é uma planta do gênero *Asteraceae* reconhecida internacionalmente devido às suas propriedades biológicas e terapêuticas, além de possuir interação com insetos, especialmente as abelhas *Apis mellifera*, e por produzir uma diversidade de compostos fenólicos (Alonso, 2018; Piantino, 2004). Suas folhas são pontuadas por tricomas secretores ricos em metabólitos secundários e apresentam dutos secretores, que produzem e armazenam os óleos essenciais, os quais possuem importância comercial para indústria de cosméticos, pois estão relacionados diretamente com a concentração dos compostos nerolidol e espatulenol (Ferronato et al., 2007).

O uso de *B. dracunculifolia* tem sido estudado em diferentes modelos, como no estudo de Pereira (2014), o qual observou queda dos níveis de glicemia capilar de jejum e proteção de danos em órgãos, como fígado, rins e pâncreas. O estudo de Hocayen et al. (2016) relatou a ocorrência de proteção das ilhotas pancreáticas e prevenção de danos celulares irreversíveis em modelos de diabetes e obesidade. O estudo feito por Fabri et al. (2011) revelou interessante atividade antimicrobiana da *B. dracunculifolia*, visto que os componentes antimicrobianos dessa espécie podem ser diluídos 22.000 vezes e ainda conseguem inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*.

Compostos antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, mesmo presentes em baixas concentrações, atrasam ou inibem a oxidação de outro substrato oxidável de uma maneira eficaz. Sendo assim, quando é feito o consumo de alimentos que possuam atividade antioxidante, uma ação protetora efetiva contra esses processos oxidativos que ocorrem no organismo pode ser obtida (Rufino et al., 2007). Além do poder antioxidante decorrente do conteúdo de polifenóis presentes nas frutas utilizadas na preparação do suco concentrado para o refrigerante, o ácido ascórbico (vitamina C) presente na fruta não deve ser esquecido (Preedy, 2014), pois desempenha papel significativo em doar elétrons a enzimas humanas, na biossíntese de hormônios e aminoácidos e também pode reduzir espécies reativas de oxigênio (Vannucchi & Rocha, 2012).

Refrigerante é um gênero de bebida que normalmente apresenta elevadas quantidades de corantes e conservantes, e quando não são apresentados nas suas versões *light* ou *diet*, contêm também um elevado teor de açúcar (Oliveira, 2007). Pertencem ao grupo de bebidas não alcoólicas e não fermentadas, fabricadas industrialmente à base de água mineral, açúcar ou edulcorante, extratos ou aromas sintéticos de frutas ou outros vegetais e gás carbônico (Santos & Bressan, 2011). O consumo de refrigerantes tem aumentado nas últimas décadas, e está associado ao aumento da prevalência de obesidade, ganho de peso e diabetes (Rombaldi et al., 2011). A diabetes *mellitus* é um importante e crescente problema de saúde para todos os países. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes estimou que 8,8% da população mundial entre 20 e 79 anos de idade (por volta de 415 milhões de pessoas) vivia com diabetes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017).

Estudos mostram uma relação direta entre dieta e saúde que, somados ao crescente interesse de alguns indivíduos em consumir alimentos mais saudáveis, tem aumentado o interesse da indústria alimentícia em desenvolver novos produtos, cujas funções pretendem ir além do fornecimento de nutrientes básicos e da satisfação do paladar do consumidor (Behrens, Roig & Silva, 2001), devendo envolver uma prévia identificação de necessidades do consumidor ou tendências de mercado. Idealmente,

o produto deve possuir características únicas que o destaquem dos demais produtos do mercado e que sejam atrativas para o consumidor (Ribeiro, 2011).

O presente trabalho realizou análises químicas e de propriedades antioxidantes de refrigerante de laranja com adição de extrato de *B. dracunculifolia* para observar seus resultados e, em um futuro, poder prepará-lo em larga escala.

## 2. Metodologia

### 2.1 Elaboração do refrigerante

Para o preparo do refrigerante, uma revisão de literatura foi conduzida para encontrar uma receita que fosse possível de se realizar nos laboratórios da universidade, visto que os refrigerantes são produzidos em larga escala por grandes fábricas. Foi necessário seguir as adequações que a Portaria N°. 544, de 16 de novembro de 1998 que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresenta, em que o refrigerante de laranja deve conter, obrigatoriamente, o suco da fruta, açúcar da escolha, água e dióxido de carbono.

A fruta selecionada para este estudo foi laranja bahia (*Citrus sinensis*), adquirida em comércio local. Cada fruta foi lavada em água corrente com ajuda de uma escova e posteriormente teve seu suco espremido. A quantidade de água foi aquecida para remoção de impurezas e diminuição de risco de contaminação, e após o resfriamento, o edulcorante escolhido foi adicionado. A essa mistura, foi adicionado o suco, e em seguida, o extrato de *B. dracunculifolia*. Por se tratar de uma bebida voltada para o público diabético, optou-se pelo uso de frutose para adoçar a bebida.

Em seguida, a bebida foi resfriada e nela inserido o gás carbônico, elemento que confere as características de refrescância e acidez própria dos refrigerantes comerciais. Depois de pronto, o refrigerante foi acondicionado em garrafas e lacrado com a tampa.

### 2.2 Preparo do extrato de *Baccharis dracunculifolia*

As folhas de alecrim do campo foram coletadas no mês de setembro de 2019, no Campus Cedeteg da Universidade Estadual do Centro-Oeste, no município de Guarapuava-PR (Latitude Sul 25°38'23" e Longitude Oeste 51°49'10"). Em seguida, as folhas foram arrancadas dos galhos e submetidas à secagem em estufa a 50°C por 6 horas. Na sequência, as folhas secas de *B. dracunculifolia* passaram por 1 minuto de trituração até a forma de pó. Para cada 250 g de folha moída, foi utilizado 1 L de álcool etílico hidratado 70° INPM da marca Araucária. Esta mistura ficou sob agitação magnética durante 24 horas. Em seguida, foi feita uma filtração simples seguida de uma rota evaporação a 25 rpm a 60 °C.

O material rota-evaporado foi para banho-maria por um período de 24 horas a 80 °C, e então, novamente foi passado por uma filtração simples. Para chegar no produto final, foi feita uma diluição de 1:8 com água destilada. Neste estudo, foram utilizadas quatro concentrações diferentes de extrato por amostra. Foram testadas amostras sem adição de extrato de *B. dracunculifolia* (T0), amostras com 1% do volume total de extrato (T1), amostras com 5% do volume total de extrato (T5) e amostras com 10% do volume total de extrato (T10).

### 2.3 Atividade antioxidante *in vitro* através dos compostos fenólicos totais

A atividade antioxidante através dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. Para as análises foram utilizadas alíquotas de 500 µL de cada amostra, de concentrações diferentes, seguidos pela adição de 2,5 mL de reagente Folin a 10%. Após 5 minutos de reação, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 2 horas de reação, em espectrofotômetro a 740 nm. A curva analítica foi construída através da diluição da concentração do ácido gálico. Os resultados foram expressos

em microgramas equivalente de ácido gálico por grama ( $\mu\text{g Eq GAE/g}$ ), que foram calculados a partir da equação da reta ( $y = 0,0199x - 0,0369/R^2 = 0,9971$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

#### **2.4 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do ferro (frap)**

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro, foi utilizada a metodologia descrita por Rufino et al. (2006). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M, 2,5 mL de solução de TPTZ 10mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Para a realização das análises, alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  de cada amostra, de concentrações diferentes, foram adicionadas aos tubos de ensaio, juntamente com 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C em banho-maria por 30 minutos. O espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. As leituras de absorbância foram feitas em 595 nm. A curva de calibração foi construída através da utilização da solução de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), em um intervalo de concentrações de 200 a 2000  $\mu\text{M}$ . Os resultados foram expressos em micromol de ferro por grama de amostra ( $\mu\text{Mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) através da equação da reta ( $y = 0,0005x - 0,0463/R^2 = 0,9985$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicata.

#### **2.5 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método de captura do dpph**

A atividade antioxidante sobre o radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rufino et al. (2007). A solução de DPPH foi preparada a 2 mM em solvente etanol. Para as análises, foram utilizadas alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra, de concentrações diferentes, seguido da adição de 3 mL de etanol e 300  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 517 nm., o qual foi zerado com etanol P.A. Foram realizadas análises de DPPH expressas em micro mol de trolox por grama de amostra ( $\mu\text{M trolox/g}$ ), através da construção de uma curva de trolox no intervalo de concentrações de 100 a 1000  $\mu\text{M}$  na equação da reta ( $y = -5,1834x + 0,3168/R^2 = 0,9874$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicata.

#### **2.6 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método da captura do abts<sup>++</sup>**

A atividade antioxidante pelo método da captura de  $\text{ABTS}^{++}$  foi realizada conforme a metodologia descrita por Rufino et al. (2007). A reação foi formada pela solução ABTS a 7 mM com persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 140 mM, que foi incubada a 27°C durante 16 horas. Em seguida, foi diluída em etanol até obter valor de absorbância de 0,700 a 734 nm. Para a realização da análise, alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra, de concentrações diferentes, foram transferidas para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 3 mL da solução de  $\text{ABTS}^{++}$  7 mM. As leituras de absorbância foram realizadas após 6 minutos de reação em espectrofotômetro a 734 nm, que foi zerado com etanol P.A. A curva analítica foi construída no intervalo de concentrações de 100 a 2000  $\mu\text{M}$  de trolox. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de trolox por grama da amostra ( $\mu\text{Mol TEAC/g}$ ), que foram calculados a partir da equação da reta ( $y = -0,0003x + 0,6267/R^2 = 0,9924$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicata.

#### **2.7 Análise de ph**

A análise da escala de pH de cada amostra foi verificada no medidor de pH de bancada – modelo Simpla PH140. Antes da leitura, foi verificado se o aparelho estava em condições padrões. Os eletrodos foram limpos primeiramente com água destilada e calibrados com soluções conhecidas, para depois serem mergulhados nas soluções de refrigerante de diferentes concentrações. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

## 2.8 Quantificação de acidez titulável

Primeiramente, a solução de hidróxido de sódio 0,1N foi padronizada com biftalato de potássio. Em seguida, alíquotas de 5 mL de amostra de refrigerante em diferentes concentrações foram colocadas em Erlenmeyer juntamente com 25 mL de água destilada. Duas gotas de fenolftaleína a 1% foram adicionadas a cada Erlenmeyer. Foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N até a coloração rosa se manter por 30 segundos. Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico por 100 mL de cada amostra. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

## 2.9 Leitura de grau brix (°Bx)

Brix é uma escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis em uma solução, sendo utilizada na indústria de alimentos para medir a quantidade aproximada em sucos de frutas e vinhos (SANTOS et al. 2016). Para a verificação do Grau Brix da bebida, utilizou-se o refratômetro de bancada tipo Abbe modelo RTA-100, o qual foi limpo com água destilada antes das leituras. Para se ter certeza dos resultados, as leituras também foram realizadas no refratômetro portátil modelo RHB-32. Alíquotas de cada concentração de refrigerante foram preparadas e lidas nos equipamentos. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

## 2.10 Análise de bolores e leveduras

Para se fazer a análise de bolores e leveduras, primeiramente foi necessário preparar o meio de cultura PDA acidificado com ácido tartárico. Foram preparadas as diluições em série com água peptonada 0,1% em tubos. As placas de Petri foram esterilizadas em autoclave, e em cada uma, foi adicionado 0,1 mL de cada amostra diluída, espalhando com alça de Drigalski de maneira uniforme. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 22°C por cinco dias para crescimento. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

## 2.11 Análise de coliformes

Para realizar a análise de coliformes, 10 mL de cada amostra foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 72 horas. O resultado foi expresso como ausência (-) ou presença (+) desse grupo de microrganismos.

## 2.12 Cromatografia líquida de alta eficiência

A identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato de *B. dracunculifolia* foi realizada no equipamento Varian 900-CL Series iHPLC (VARIAN Inc., Walnut Creek, CA, USA). A eluição da coluna foi realizada em método gradiente e os solventes utilizados foram água (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente de solventes utilizados foi: fase móvel A (70 %) e B (30 %) ao 1 minuto; A (36 %) e B (64 %) aos 15 minutos; A (25%) e B (75 %) aos 26 minutos; A (5 %) e B (95 %) aos 28 minutos; A (5 %) e B (95 %) aos 31 minutos; A (70 %) e B (30 %) aos 32 minutos; A (70 %) e B (30 %) aos 40 minutos.

## 2.13 Análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier

A análise foi feita em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Frontier (Perkin Elmer, USA), na região de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução 2 cm<sup>-1</sup> e 256 acumulações.

## 2.14 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foram utilizados os métodos de Análise de Componentes Principais, Análise de Cluster e Modelo Linear Generalizado. Foram utilizados os programas Origin Pro versão 8.5 e STATISTICA versão 8.0. Os resultados das análises antioxidantes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey, através do programa SPSS.

## 3. Resultados e Discussão

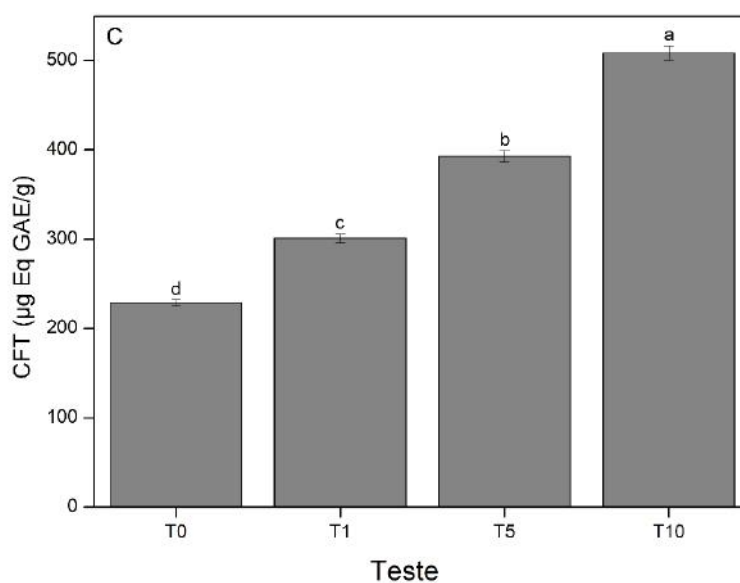
### 3.1 Análises antioxidantes

#### 3.1.1 Atividade antioxidante através dos compostos fenólicos totais

O método de CFT é amplamente utilizado para a avaliação antioxidante de alimentos e extrato de plantas. Basicamente, o teste tem como base a redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos sob condições alcalinas. O reagente Folin-Ciocalteu contém complexos dos ácidos fosfomolibdato-fosfotungstato que, quando são reduzidos, exibem uma coloração azulada (Nascimento, 2016).

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante através dos CFT.

**Figura 1.** Gráfico das concentrações de cada teste no método de CFT.



Fonte: Autores.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

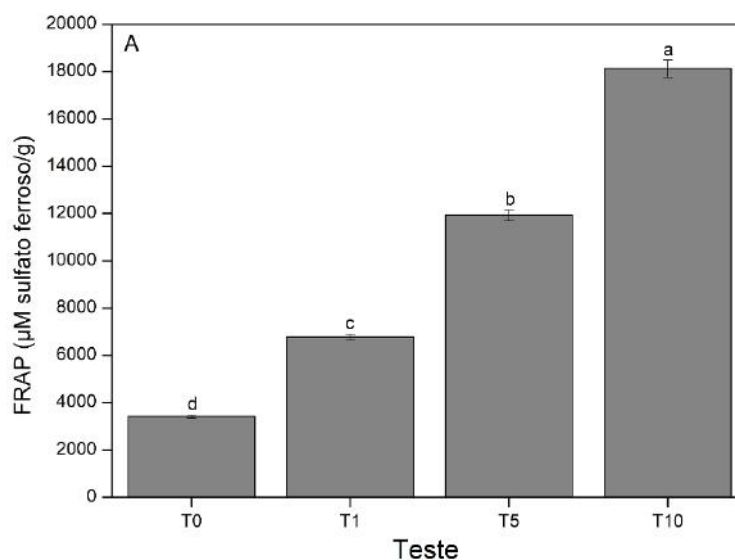
Pode-se perceber que, conforme a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia* aumenta, maior é a atividade antioxidante. É possível perceber que o T0 apresenta valores altos, visto que o suco de laranja também contribui com suas propriedades antioxidantes. Em um estudo feito por Jordão (2018), foi demonstrado que o suco de laranja tem a capacidade de manter a estabilidade dos compostos fenólicos e reduzir a perda da atividade antioxidante entre os outros sabores de sucos que foram analisados.

### 3.1.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro

Quando o íon  $\text{Fe}^{3+}$  presente no complexo TPTZ é reduzido para a forma  $\text{Fe}^{2+}$ , uma alteração na tonalidade da mistura de reação acontece, passando a apresentar um tom azul intenso. Quanto maior a absorbância e mais intensa a tonalidade, maior é o potencial antioxidante (Urrea-Victoria et al. 2016).

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de FRAP podem ser observados na Figura 2.

**Figura 2.** Gráfico das concentrações de cada teste no método FRAP



Fonte: Autores.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

É possível verificar que, com o aumento da concentração de extrato de *B. dracunculifolia*, maior era a atividade antioxidante pela redução de ferro. Os antioxidantes que reagem no ensaio FRAP são aqueles que reduzem, como por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido úrico, a bilirrubina e os compostos polifenólicos, como as catequinas e outros flavonóides em alimentos à base de plantas (Benzie & Devaki, 2018).

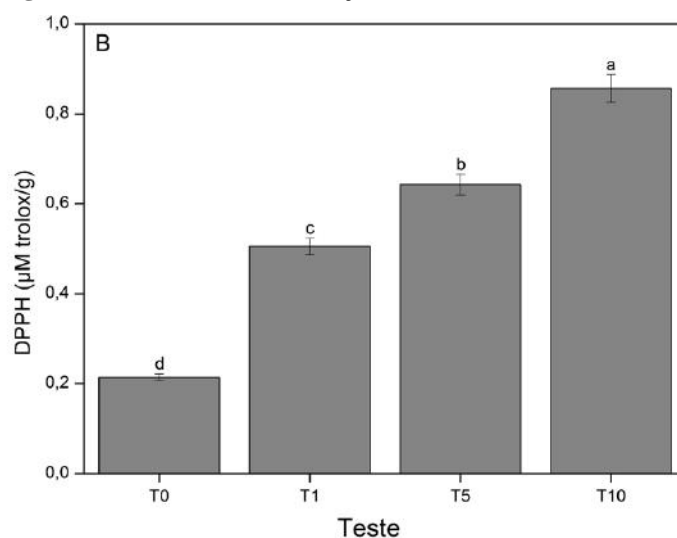
Em um estudo feito por Queirós, Tafulo e Sales (2013), foram testadas 18 amostras de refrigerante, analisando os sabores laranja, limão, maçã e abacaxi. Foi constatado que, pelo método FRAP, o sabor de refrigerante que apresentava os maiores valores de média de atividade antioxidante foi o de maçã, enquanto o de laranja apresentou os menores valores. No estudo feito por Pellegrini et al. (2003), foram testados 30 tipos de frutas diferentes para os testes de FRAP. Foi constatado que, por esse método, a amora foi a fruta que apresentou maior atividade antioxidante, devido ao seu alto conteúdo de ácidos fenólicos e flavonóides, como por exemplo, as antocianinas. As frutas cítricas exibiram capacidade antioxidante intermediária, sendo as laranjas as mais eficazes, seguidas pelas toranjas.

### 3.1.3 Atividade antioxidante pelo método de captura do DPPH

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo. Hoje em dia, vem sendo utilizado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e amostras biologicamente relevantes (Silva, 2017).

Na Figura 3 está representado o resultado da captura do DPPH.

**Figura 3.** Gráfico das concentrações de cada teste no método DPPH.



Fonte: Autores.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

É possível observar que conforme a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia* aumenta, maior é a atividade antioxidante nesse método. Paroul et al. (2016) fizeram análise do extrato de *B. dracunculifolia* pelo método DPPH, e verificaram que o resultado de atividade antioxidante do extrato aquoso foi aproximadamente 100 vezes superior ao obtido com o óleo essencial da mesma planta.

#### 3.1.4 Atividade antioxidante pelo método da captura do $abts^{++}$

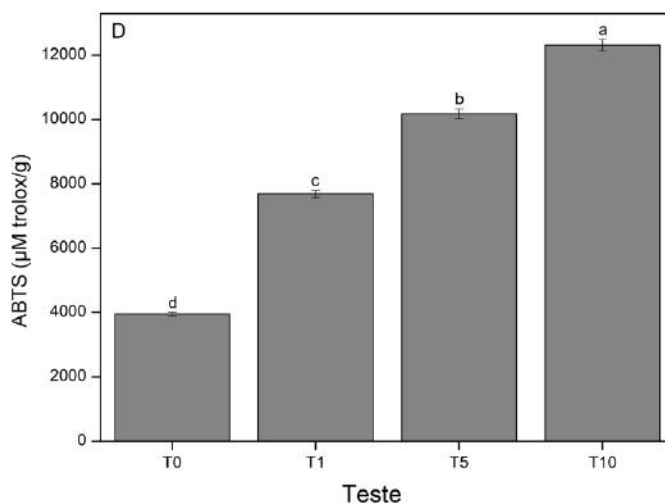
A vantagem do teste  $ABTS^{++}$  consiste na sua simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório, podendo-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O valor de TEAC (trolox equivalente antioxidant capacity) caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com  $ABTS^{++}$ , bem como em inibir os processos oxidativos (Borges et al., 2011). O ABTS é uma substância utilizada em vários ensaios enzimáticos, servindo como marcador de reação. Recentemente, vem sendo utilizado em ensaios colorimétricos, para estimar o potencial antioxidante de substâncias ou misturas (Torres et al., 2017).

Em um estudo feito por Sádecká et al. (2014), foi verificado uma diminuição com caráter diversificado na capacidade de eliminação de radicais caracterizada pelo ensaio  $ABTS^{++}$ , pois as alterações mais significativas foram percebidas durante as primeiras 5 semanas de armazenamento, com uma diminuição nos valores de TEAC de 2,28 para aproximadamente 1,35 na 5ª semana de armazenamento.

Na Figura 4 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante através do método da captura do  $ABTS^{++}$ .



**Figura 4.** Gráfico das concentrações de cada teste no método de ABTS•+



Fonte: Autores.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Pode-se notar que, conforme a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia* aumenta, maior é a atividade antioxidante.

### 3.2 Análises físico-químicas

#### 3.2.1 Análise de pH

A vitamina C tem a estabilidade influenciada pelo pH presente no alimento, fator que determina a velocidade nas decomposições (Barnabé, 2003).

No estudo feito por Hanan e Marreiro (2009), foi analisado uma amostra de refrigerante local, fabricado na cidade de Manaus, Amazonas. O pH do refrigerante de laranja analisado apresentou valor médio de 3,29. O pH ácido das bebidas industrializadas é proporcionado pela adição de conservantes e flavorizantes, como por exemplo, o ácido cítrico. No estudo feito por Dantas (2017), as amostras de Fanta® laranja analisadas apresentaram nível de pH de 3,66.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores dos resultados dos níveis de pH.

**Tabela 1.** Resultados dos níveis de pH.

Teste	pH
Teste 0	3,64 ± 0,04
Teste 1	3,74 ± 0,02
Teste 5	3,92 ± 0,03
Teste 10	4,08 ± 0,01

Fonte: Autores.

Comparando os estudos com este trabalho, verifica-se que não há uma grande diferença de valores, apenas quando comparados ao Teste 10. Então, pode-se notar que a presença do extrato de *B. dracunculifolia* influencia o pH da amostra.

### 3.2.2 Análise de acidez titulável

Na Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998, é exigido que a acidez titulável para refrigerante de laranja, em ácido cítrico anidro, tenha valor mínimo de 0,1 g/100 mL. Não se tem valores máximos estipulados para essa análise. Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos resultados da acidez titulável.

**Tabela 2.** Resultados da acidez titulável.

Teste	Acidez titulável g/100 mL
Teste 0	0,97 ± 0,01
Teste 1	1,31 ± 0,01
Teste 5	1,44 ± 0,03
Teste 10	1,67 ± 0,02

Fonte: Autores.

No estudo feito por Dantas (2017), amostras de Fanta® laranja foram analisadas para verificar a acidez titulável, e apresentaram resultados de 0,15 g de ácido cítrico por 100 mL de amostra, mostrando estar dentro do que a legislação exige. No estudo feito por Figueira et al. (2010), foram analisadas 11 amostras de refrigerante de laranja que apresentaram resultados entre 0,12 até 0,25 g de ácido cítrico por 100 mL de amostra. Os resultados do presente trabalho apresentam valores acima do que a literatura traz, mostrando que por conta da adição do extrato de *B. dracunculifolia*, os valores de acidez titulável aumentaram.

### 3.2.3 Leitura de grau brix (°Bx)

Na Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é exigido que o valor de Grau Brix para refrigerante de laranja seja de no mínimo 10%(V/V). Não se tem valores máximos estipulados para essa análise. Na Tabela 3 estão representados os valores dos resultados da leitura de Grau Brix.

**Tabela 3.** Resultado da leitura de Grau Brix.

Teste	°Bx
Teste 0	10,52 ± 0,03
Teste 1	12,13 ± 0,02
Teste 5	12,31 ± 0,01
Teste 10	12,44 ± 0,02

Fonte: Autores.

Em um estudo feito por Criveletto (2011), o Grau Brix de amostras de refrigerantes de laranja foram analisadas e mostraram que as amostras que ficaram em temperatura ambiente variaram entre 11,4 e 11,83 °Bx, e as mostras que ficaram armazenadas em temperatura controlada variaram entre 11,5 e 11,8 °Bx.

O estudo feito por Dantas (2017) analisou amostras de refrigerantes comerciais, entre eles Fanta® laranja, que apresentou valores de 6,25 °Bx, estando fora do que é exigido pelo MAPA.

As análises feitas neste trabalho estão um pouco acima dos refrigerantes comerciais, mas não apresentam valores muito diferenciados da literatura.

### 3.3 Análises microbiológicas

#### 3.3.1 Análise de bolores e leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, apresentando células geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas, e possuem divisão celular por brotamento. Crescem abundantemente em habitats onde há a presença de açúcares, como frutas e flores (Gubolino, 2007). Como são células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rápido do que os bolores (Borges, 1999).

Os bolores são células cilíndricas e tem valor considerável, sendo utilizados para produzir a penicilina e muitos outros produtos. Porém, eles também são responsáveis pela deterioração de materiais e são capazes de causar algumas doenças em humanos (Borges, 1999).

A presença de bolores e leveduras em refrigerantes causa mudanças indesejáveis tanto na composição química, quanto na aparência. Dessa forma, o produto passa a ser rejeitado, causando prejuízo econômico (Taniwaki & Silva, 2001). A presença do suco de fruta em refrigerantes aumenta a suscetibilidade à contaminação microbiológica, devido à maior quantidade de nutrientes (Rocha et al., 2004).

Os resultados foram expressos em UFC/mL na Tabela 4, considerando-se a contagem das placas que apresentassem entre 5 e 50 colônias para bolores e 25 a 250 colônias para leveduras, a partir das diluições seriadas feitas.

**Tabela 4.** Resultado das UFC de Bolores e leveduras.

Teste	Resultados
Bolores e leveduras: Teste 0	5,2 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
Bolores e leveduras: Teste 1	2,75 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
Bolores e leveduras: Teste 5	1,6 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
Bolores e leveduras: Teste 10	5,8 x 10 <sup>5</sup> UFC/mL

Fonte: Autores.

A Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 da Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabelecia os limites de 20 UFC de bolores e leveduras por mL da amostra. Mas, a partir de 2 de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária adotou a Resolução nº 12, que aboliu a contagem de bolores e leveduras das análises deste alimento, deixando o controle higiênico por conta própria das indústrias (Rocha, 2006).

#### 3.3.2 Análise de coliformes a 35 °C

A Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 da Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabelecia que as amostras de refrigerante deveriam apresentar ausência de coliformes totais.

Todas as amostras testadas nesse trabalho apresentaram ausência para coliformes totais, mostrando que este trabalho está dentro da legislação vigente, visto que quando um tubo é positivo para esse teste, também é possível visualizar bolhas na superfície da amostra, porque conforme a bactéria fermenta, ocorre a liberação de álcool e CO<sub>2</sub>.

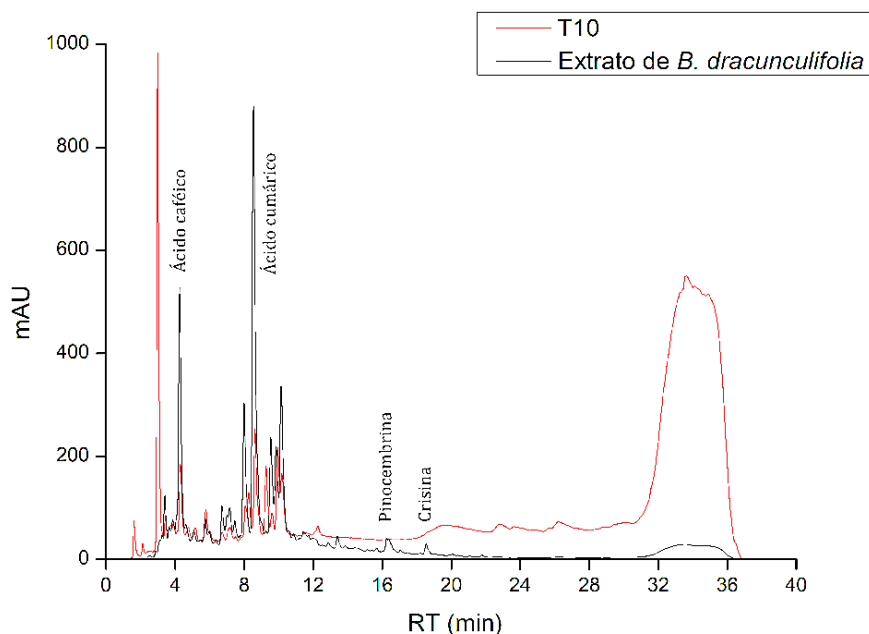
### 3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é uma técnica baseada na migração de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária, que retém elementos, e a fase móvel, que conduz a mistura por meio de um soluto. É uma técnica que pode ser utilizada para purificação de substâncias, na detecção de substâncias ou auxiliar a separação de substâncias indesejáveis. Existem quatro tipos de cromatografia: cromatografia em papel, cromatografia gasosa, cromatografia de camada delgada e cromatografia

líquida de alta eficiência, e a seleção da técnica deve ser feita de acordo com o material que se deseja isolar (Goulart, 2012; Peres, 2002).

O gráfico da análise de cromatografia líquida de alta eficiência feita no extrato de *B. dracunculifolia* e no teste 10 (com 10% de extrato) está representado na Figura 5.

**Figura 5.** Gráfico da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. T10: Teste 10 (com 10% de extrato); mAU: Unidades de Mili-Absorbância; RT: Tempo de Retenção.



Fonte: Autores.

A Tabela 5 apresenta os resultados da leitura da cromatografia líquida de alta eficiência realizada.

**Tabela 5.** Resultado da leitura de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Padrões Cromatográficos	RT (min)	Comprimento de onda de máxima absorção (nm)	Equação da regressão	R <sup>2</sup>	Concentração mg/mL de extrato de <i>B. dracunculifolia</i>	Concentração mg/mL para T10
Ácido Caféico	5,09	323	$y=0,2955x-0,1008$	0,9895	11,0	5,8
Ácido Cumárico	6,79	309	$y=0,2780x-0,1548$	0,9879	46,5	1,2
Pinocembrina	17,28	289	$y=0,0873x-0,1025$	0,9906	15,9	-
Crisina	18,56	267-313	$y=0,2431x-0,0849$	0,991	18,0	-

Fonte: Autores.

O estudo de Park et al. (2004) relatou o mesmo pico de ácido cumárico, próximo dos 10 minutos, quando estudou o extrato de *B. dracunculifolia*. O estudo de Midorikawa et al. (2001) também relatou o pico de ácido cumárico no extrato de *B.*

*dracunculifolia*. Além disso, o pico de ácido caféico também foi possível de ser visualizado, próximo dos 6 minutos. O estudo de Chang et al. (2008) também relatou os mesmos picos de ácido cumárico e ácido caféico no extrato de *B. dracunculifolia*.

O perfil cromatográfico do refrigerante revelou a presença dos ácidos caféico e cumárico, que também estão presentes no extrato de *B. dracunculifolia*, indicando a incorporação do extrato ao produto. O estudo de Ghafoor et al. (2019) relatou que os ácidos caféico e cumárico sofrem diminuição de valores quando expostos ao calor, onde o ácido caféico sofre mais. Como essa análise foi feita pela Central de Análises – UTFPR Campus Pato Branco, o tempo de viagem e a exposição a variação de temperatura podem ter causado a diminuição nos valores em ambos os compostos.

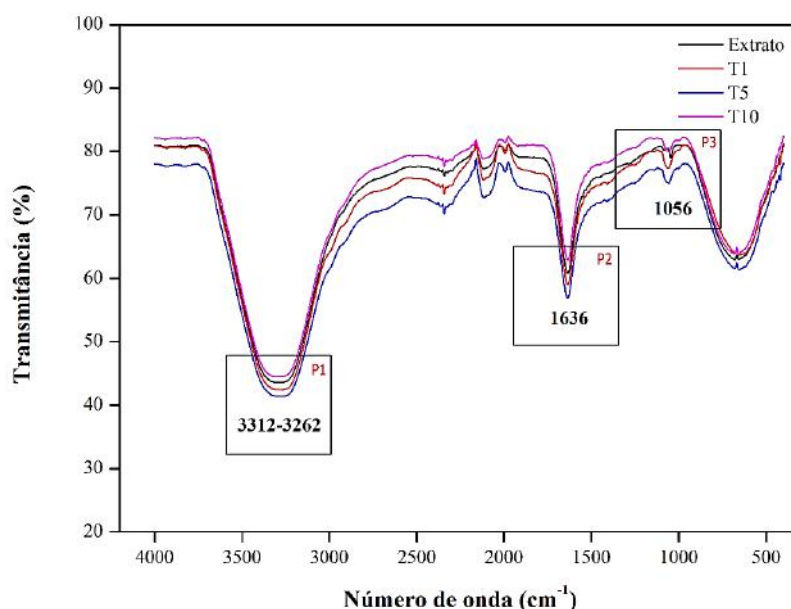
O presente trabalho está de acordo com o que a literatura já relatou. Entre os 31 e 36 minutos de análise, um pico foi observado. Dentre as possíveis explicações para esse achado, incluem-se problemas na coluna, alterações na amostra ou algum padrão que não foi utilizado na análise. O estudo de Park et al. (2004) traz os compostos pinobanksina e kaempferol nessa faixa de tempo. Já o estudo de Midorikawa et al. (2001) traz os compostos artepeline C, ácido isocupressivo, ácido agático e ácido agatálico nessa faixa de tempo.

### 3.5 Análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas, em linhas de produção e no controle de processos industriais (Lopes & Fascio, 2004).

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentaram três picos característicos que puderam ser identificados (Figura 6).

**Figura 6.** Gráfico da análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato).



Fonte: Autores.

O pico P1, entre número de onda 3312-3262  $\text{cm}^{-1}$ , foi identificado como estiramento de hidroxila ( $\nu\text{O-H}$ ). O pico P2 em 1636  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento carbonila ( $\nu$  entre 1820 a 1630  $\text{cm}^{-1}$ ) e o pico P3 em 1068  $\text{cm}^{-1}$  provavelmente é devido ao estiramento carbono-oxigênio ( $\nu\text{C-O}$ ) de álcoois. Esses grupos funcionais identificados no espectrograma de infravermelho

para amostras de refrigerantes com adição de *B. dracunculifolia* pertencem a compostos tais como: álcoois orgânicos, ácidos carboxílicos, aldeídos.

O trabalho de Iurckevicz (2019) também relatou os picos de estiramento de hidroxila em  $3384\text{ cm}^{-1}$ , picos de estiramento carbonila em torno de  $1690\text{ cm}^{-1}$  e picos de estiramento de álcool e fenol entre  $1260$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Além desses picos citados, o estudo também relatou picos de compostos aromáticos com deformação axial C=C entre  $1603$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$  e picos de grupos aromáticos com deformações angulares de CH entre  $900$  e  $700\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível verificar que o refrigerante de laranja com adição de *B. dracunculifolia*, mesmo em sua menor concentração, apresenta atividade antioxidante por todos os métodos testados, o que torna o produto interessante para o mercado comercial, que busca cada vez mais ir além com receitas nutritivas.

Por conter frutose em sua formulação, é uma boa opção para diabéticos substituírem os refrigerantes comerciais de sua alimentação, que possuem grandes quantidades de açúcares.

As características físico-químicas e microbiológicas deste produto encontraram-se em conformidade com as legislações vigentes e estão de acordo com dados já apresentados na literatura.

As formulações enriquecidas com extrato da planta apresentaram aumento do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em comparação ao refrigerante base formulado nesse trabalho.

Sugerimos que, em trabalhos futuros, sejam realizadas análises com outras espécies de frutas, para que possa ser feita uma comparação de qual fruta possui maior poder antioxidante em formulações de refrigerantes. Além disso, uma análise sensorial seria de grande importância para descobrir qual sabor teria maior índice de aprovação entre os avaliadores.

#### Referências

- Alonso, C. F. (2018). Obtenção e caracterização de diferentes extratos de folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- Barnabé, D. (2003). Refrigerantes de acerola produzidos a partir de suco desidratado e extrato seco da fruta: análise química, sensorial e econômica. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.
- Behrens, J., Roig, S., & Da Silva, M. (2001). Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. *Boletim SBCTA*, 34(2), 99-106.
- Benzie, I., & Devaki, M. (2018). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, 77-106.
- Borges, L. L., Lúcio, T. C., Gil, E. d. S., & Barbosa, E. F. (2011). Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais, (v. 7, pp. 1-12).
- Borges, L. R. (1999). Análise de qualidade microbiológica (bolors e leveduras) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e identificação dos fungos potencialmente micotoxigenicos.
- Chang, R., Piló-Veloso, D., Morais, S. A., & Nascimento, E. A. (2008). Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 549-556.
- Criveletto, R. (2011). Estabilidade físico-química e sensorial de refrigerante sabor laranja durante armazenamento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Dantas, M. V. C. (2017). Caracterização físico-química em diferentes tipos de refrigerantes. (Química Industrial) – Universidade Estadual da Paraíba.
- Fabri, R., Nogueira, M., Dutra, L., Bouzada, M., & Scio, E. (2011). Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 13, 183-189.
- Ferronato, R., Marchesan, E. D., Pezenti, E., Bednarski, F., & Onofre, S. B. (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 224-230.
- Figueira, R., Nogueira, A. M. P., Venturini Filho, W. G., Ducatti, C., Queiroz, É. C., & Pereira, A. G. d. S. (2010). Análise físico-química e legalidade em bebidas de laranja Physical-chemical analysis and legality in orange beverages. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 21(2), 267-272.
- Ghafoor, K., Ahmed, I. A. M., Doğu, S., Uslu, N., Fadimu, G. J., Al Juhaimi, F., . . . Özcan, M. M. (2019). The effect of heating temperature on total phenolic content, antioxidant activity, and phenolic compounds of plum and mahaleb fruits. *International Journal of Food Engineering*, 15(11-12).

- Goulart, D. S. (2012). Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnóstico toxicológico. *Programa de pós-graduação em ciência animal*. Universidade Federal de Goiás.
- Gubolino, S. I. F. (2007). Qualidade físico-química e microbiológica de refrigerantes sabor guaraná em embalagens PET-2000mL e ocorrência de leveduras. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Hanan, S. A., & Marreiro, R. d. O. O. (2009). Avaliação do pH de refrigerantes, sucos e bebidas lácteas fabricados na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 9(3), 347-353.
- Hocayen Pde, A., Grassioli, S., Leite, N. C., Pochapski, M. T., Pereira, R. A., da Silva, L. A., . . . Malfatti, C. R. (2016). *Baccharis dracunculifolia* methanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. *Pharm Biol*, 54(7), 1263-1271.
- Iurkevicz, G., Dahmer, D., & Santos, V. (2019). Produção e Caracterização de Micropartículas de Extrato de *Baccharis dracunculifolia* e Lasiodiplodana (1® 6)-b-D-GLUCANA.
- Jordão, A. M. J. B. (2018). Phenolic Compounds in Fruit Beverages. In (Vol. 4, pp. 35): Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Lopes, W. A., & Fascio, M. (2004). Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química nova*, 27, 670-673.
- Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., . . . Kadota, S. (2001). Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 12(6), 366-373.
- Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1998). Portaria N°. 544. Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo.
- Nascimento, K. S. d. (2016). Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul. Universidade de São Paulo.
- Oliveira, E. d. (2007). Controle de qualidade em refrigerante. Monografia, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção com enfoque em Pesquisa Operacional.
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., & Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1100-1103.
- Paroul, N., Rosa, R. L. D., Piazza, S. P., Bertella, T., Puton, B. M. S., Falcão, L., . . . Cansian, R. L. (2016). Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* PERS e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Rev Perspect*, 40, 55-64.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr*, 133(9), 2812-2819.
- Pereira, R. A. (2014). Efeitos do tratamento do extrato metanólico de *Baccharis dracunculifolia* sobre alterações bioquímicas e histológicas de um modelo animal de diabetes. *Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas*. Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- Piantino, C. R. (2004). Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico.
- Preedy, V. (2014). Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. *Elsevier*.
- Queirós, R. B., Tafulo, P. A., & Sales, M. G. (2013). Assessing and comparing the total antioxidant capacity of commercial beverages: application to beers, wines, waters and soft drinks using TRAP, TEAC and FRAP methods. *Comb Chem High Throughput Screen*, 16(1), 22-31.
- Ribeiro, T. I. B. (2011). Desenvolvimento de um novo conceito de refrigerante. Faculdade de Ciências e Tecnologia,
- Rocha, C., Schmidt, H., Monteiro, C., & Odebrecht, E. (2004). Deterioração de refrigerantes por leveduras. *Visão Acadêmica*, 5(2).
- Rocha, C. D. (2006). Determinação dos pontos críticos de contaminação por leveduras em indústria de refrigerantes. *Universidade Federal do Paraná. Curitiba*.
- Rombaldi, A. J., Neutzling, M. B., Silva, M. C. d., Azevedo, M. R., & Hallal, P. C. (2011). Fatores associados ao consumo regular de refrigerante não dietético em adultos de Pelotas, RS. *Revista de Saúde Pública*, 45(2), 382-390.
- Rufino, M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Moraes, S. M., Sampaio, C. d. G., Pérez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Sadecka, J., Polovka, M., Kolek, E., Belajova, E., Tobolkova, B., DAŠKO, L., & Durec, J. (2014). Orange juice with pulp: impact of pasteurization and storage on flavour, polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity. *Journal of Food & Nutrition Research*, 53(4).
- Santos, E., & Bressan, K. (2011). Anteprojeto Indústria de Refrigerantes de Sabores Exóticos. *Florianópolis: UFSC*.
- Silva, I. d. S. (2017). Efeito da luz na atividade antioxidante de refrigerante sabor guaraná acondicionado em diferentes embalagens. Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sociedade Brasileira De Diabetes. (2017). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes*. São Paulo.

Taniwaki, M., & Silva, N. d. (2001). Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. *Campinas: Núcleo de microbiologia/ITAL*.

Torres, P. B., Pires, J. S., Santos, D., & Chow, F. (2017). Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, 1-4.

Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P. B., Santos, D., & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências: Universidade de São Paulo*.

Vannucchi, H., & Rocha, M. d. M. (2012). Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Ácido ascórbico (Vitamina C). *São Paulo: Brasil International Life Sciences Institute do Brasil*.