

**HENRIQUE SIMÃO MORAES**

**DESENVOLVIMENTO DE REFRIGERANTE COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE  
*Baccharis dracunculifolia*: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIOXIDANTES**

**GUARAPUAVA**

**2020**

**HENRIQUE SIMÃO MORAES**

**DESENVOLVIMENTO DE REFRIGERANTE COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE  
*Baccharis dracunculifolia*: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti

**GUARAPUAVA**

**2020**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe **Marilda**, aos meus irmãos **Gustavo e Daniela**, e também ao **Fabio**, à **Láís** e à **Luísa**. Obrigado por fazerem parte desta jornada comigo, por estarem sempre presentes, por todo o amor e carinho e pela capacidade de vocês em acreditarem em mim, me incentivando a chegar até aqui.

Dedico este trabalho ao meu pai **João** (*in memoriam*), que me apoiou em todas as escolhas que já fiz. Sou muito grato por tudo o que você me ensinou durante a vida, e sei que mesmo não estando presente fisicamente, você me acompanha e vigia cada passo em minha vida. Espero que você esteja bem e que possamos nos encontrar novamente algum dia.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a **Deus**, por esta oportunidade e por sempre me guiar em todas as escolhas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti**, por ter aceitado me orientar, pela ajuda e pela paciência durante todo o caminho. Espero que tenha se deixado orgulhoso por este trabalho e esta pesquisa, a qual espero que possa ser continuada no futuro.

À **Profa. Katielle Córdova** (*in memorian*), pela sua ajuda e pelas dicas que me deu. Tivemos pouco tempo juntos, mas sua ajuda foi de ouro.

Ao **Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima**, por toda sua paciência e ajuda perante a parte de análises estatísticas.

À **Profa. Dra. Cristina Maria Zanette**, por toda sua ajuda, disponibilidade e paciência. Sei que não foi fácil, mas conseguimos achar uma luz nesse caminho em que nós dois não tínhamos conhecimento.

À **Denise Mendes**, por toda a disponibilidade e ajuda com as análises microbiológicas.

Aos estagiários de laboratórios: **Larissa, Vanessa e Ednilson**, por sempre estarem dispostos a ajudar, a disponibilizar laboratórios e equipamentos.

Às minhas colegas de laboratório **Ana e Maiara**, esses dois anos não foram fáceis. Tenho a agradecer por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

Eu gostaria de agradecer em especial aos meus amigos, **Angelo e Jean**, por estarem comigo em todos os momentos, mesmo que não presentes. Vocês sempre estiveram dispostos a fazer algo para melhorar meu humor, sempre me fazendo rir e sempre me ajudando. Eu agradeço de todo o meu coração. Obrigado por aguentarem meus desabafos, meu mau humor e meu estresse.

Gostaria de agradecer as minhas amigas **Bruna, Carla e Flávia**, por me ajudarem com todas as dúvidas que tive sobre técnicas e com seus conhecimentos.

Gostaria de agradecer à **Central de Análises – UTFPR Campus Pato Branco** e à **Anaclara** (*in memorian*) pela ajuda com as análises de cromatografia líquida e infravermelho.

À **CAPES** pelo suporte financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado.

”Conhecimento não é aquilo que você sabe,  
mas o que você faz com aquilo que você sabe.”

**Aldous Huxley**

## RESUMO

O refrigerante é um gênero de bebida não-alcoólico e não fermentado, normalmente com elevadas quantidades de corantes e conservantes, e que quando não são nas suas versões light ou diet, contêm também um elevado teor de açúcar. 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 sua interação com insetos e por possuir diversidade de compostos fenólicos. 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. Quando adicionados aos alimentos, os 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 refrigerante de laranja com adição de extrato de *B. dracunculifolia* para observar seus resultados e, em um futuro, poder produzir em larga escala. Sob as condições deste trabalho, foi obtido 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* apresentou poder antioxidante mesmo em suas menores concentrações.

**Palavras-chave:** *Baccharis dracunculifolia*. Antioxidante. Diabetes. Edulcorantes.

## ABSTRACT

Soda is a type of non-alcoholic and non-fermented drink, usually with high amounts of dyes and preservatives, and which when not in their light or diet versions, also contain a high sugar content. The consumption of soft drinks has increased in recent decades, and is associated with an increased prevalence of obesity, weight gain and diabetes. Studies show a direct relationship between diet and health that, added to the growing interest of some individuals in consuming healthier foods, has raised the interest of the food industry in developing new products. Field rosemary (*Baccharis dracunculifolia*) is known for its interaction with insects and for its diversity of phenolic compounds. The use of *B. dracunculifolia* has been studied in different models, as in the study by Pereira (2014), which observed 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, 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 analyzes and antioxidant properties of orange soda with the addition of *B. dracunculifolia* extract to observe its results and, in the future, to be able to produce on a large scale. Under the conditions of this work, high levels of total phenolic compounds (515.1 $\mu$ g Eq GAE/g) and high capacity to eliminate free radicals ABTS (12356.6  $\mu$ M trolox/g) and DPPH (0.851  $\mu$ M trolox/g) were obtained, and in addition to a high antioxidant iron-reducing power III (18354  $\mu$ M ferrous sulfate/g). The orange soda enriched with *B. dracunculifolia* extract showed antioxidant power even at its lowest concentrations.

**Keywords:** *Baccharis dracunculifolia*. Antioxidant. Diabetes. Sweeteners.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Reação do DPPH.....	18
FIGURA 2 – <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	19
FIGURA 3 – Etapas do preparo de extrato de <i>B. dracunculifolia</i> .....	23
FIGURA 4 – Gráfico das concentrações de cada teste no método de CFT.....	27
FIGURA 5 – Tubos de ensaio após a reação dos CFT.....	28
FIGURA 6 – Redução do complexo TPTZ com Fe <sup>3+</sup> .....	28
FIGURA 7 – Gráfico das concentrações de cada teste no método FRAP.....	29
FIGURA 8 – Tubos após a reação de FRAP.....	29
FIGURA 9 – Gráfico das concentrações de cada teste no método DPPH.....	30
FIGURA 10 – Tubos de ensaio após a reação de redução de DPPH.....	31
FIGURA 11 – Gráfico das concentrações de cada teste no método de ABTS <sup>•+</sup> .....	32
FIGURA 12 – Tubos de ensaio após a reação de redução de ABTS <sup>•+</sup> .....	32
FIGURA 13 – Gráfico dos resultados dos níveis de pH.....	34
FIGURA 14 – Gráfico dos resultados da acidez titulável.....	35
FIGURA 15 – Gráfico dos resultados de Grau Brix.....	36
FIGURA 16 – Placas de Petri após incubação para análise de bolores e leveduras.....	38
FIGURA 17 – Tubos após incubação de coliformes totais.....	39
FIGURA 18 – Tubos positivos para teste de coliformes totais.....	39
FIGURA 19 – Gráfico da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	40
FIGURA 20 – Gráfico da análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	42



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Resultados dos níveis de pH.....	36
TABELA 2 – Resultados da acidez titulável.....	37
TABELA 3 – Resultado da leitura de Grau Brix.....	38
TABELA 4 – Resultado das UFC de Bolores e leveduras.....	39
TABELA 5 – Resultado da leitura de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43

**LISTA DE ABREVIACES**

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromol
$\mu\text{Mol}$	Micromolar
ABTS	(2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfnico))
CFT	Compostos Fenólicos Totais
DPPH	(2,2-difenil-1-picril-hidrazil)
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
 INPM	Grau INPM - Instituto Nacional de Pesos e Medidas
L	Litro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanmetro
RPM	Rotação por minuto
TEAC	Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TPTZ	(2,4,6- tripiridil-s-triazina)
TROLOX	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
UFC	Unidades Formadoras de Colnias

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 REFRIGERANTE .....	15
2.2 EDULCORANTE.....	15
2.3 ANTIOXIDANTES .....	16
2.3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	17
2.3.2 FRAP .....	17
2.3.3 ABTS .....	17
2.3.4 DPPH .....	18
2.4 <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	18
2.5 DIABETES .....	20
2.5.1 ESTRESSE OXIDATIVO NA DIABETES .....	20
2.5.2 PLANTAS MEDICINAIS E DIABETES .....	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 ELABORAÇÃO DO REFRIGERANTE .....	23
4.2 PREPARO DO EXTRATO DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	23
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	24
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) .....	24
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DE CAPTURA DO DPPH .....	25
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DA CAPTURA DO ABTS <sup>+</sup> .....	25
4.7 ANÁLISE DE pH.....	26
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL .....	26
4.9 LEITURA DE GRAU BRIX (°Bx).....	26

	12
4.10 ANÁLISE DE BOLORES E LEVEDURAS.....	26
4.11 ANÁLISE DE COLIFORMES À 35°C.....	27
4.12 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	27
<u>4.13 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....</u>	<u>27</u>
<u>4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</u>	<u>27</u>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 ANÁLISES ANTIOXIDANTES.....	28
5.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	28
5.1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO.....	29
5.1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO DPPH .....	31
5.1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA CAPTURA DO ABTS <sup>•+</sup> .....	32
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	33
5.2.1 ANÁLISE DE pH .....	33
5.2.2 ANÁLISE DE ACIDEZ TITULÁVEL .....	34
5.2.3 LEITURA DE GRAU BRUX (°Bx).....	36
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	37
5.3.1 ANÁLISE DE BOLORES E LEVEDURAS.....	37
5.3.2 ANÁLISE DE COLIFORMES A 35 °C.....	38
5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	39
5.5 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	41
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS .....	44

## 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 apresentam importância comercial para indústria de cosméticos, pois estão relacionados diretamente com a concentração dos compostos nerolidol e espatulenol (FERRONATTO 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. (2015) 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, com aroma sintetizado de fruta e gás carbônico dando o aspecto borbulhante (OLIVEIRA, 2007). Pertencem ao grupo de

bebidas não alcoólicas e não fermentadas, fabricadas industrialmente à base de água mineral, açúcar ou edulcorante, extratos ou aroma sintetizado 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). Em 2019, a Federação Internacional de Diabetes publicou que já são 463 milhões de pessoas no mundo que são acometidas pelo diabetes, sendo 90% dos casos de diabetes tipo 2.

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, 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 preparar em larga escala para ajudar pacientes que são acometidos pelo diabetes *mellitus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REFRIGERANTE

O comércio de bebidas apresenta crescimento contínuo em todo o mundo, por conta da crescente demanda. Só no Brasil existem cerca de 830 fábricas que produzem refrigerante, sendo produzidos, por ano, cerca de 14 bilhões de litros da bebida, valor que mantém o país na terceira posição de maior produtor de refrigerante do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e o México (CRIVELETTO, 2011). Nas últimas décadas, os consumidores têm estado cada vez mais interessados em produtos que contribuam diretamente para a sua saúde. Assim, a indústria de refrigerantes tem tentado ir ao encontro dessas necessidades, procurando novos sabores e ingredientes não comuns, fazendo com que o produto tenha características únicas que o destaque dos demais, tornando-o mais atrativo para os consumidores (RIBEIRO, 2011).

O aumento no consumo de bebidas à base de frutas foi promovido pela preocupação com a saúde, o que elevou o desenvolvimento e a procura por bebidas com características nutricionais importantes para a prevenção e controle de doenças (FIGUEIRA et al., 2010). O WEWI<sup>®</sup> é o primeiro refrigerante orgânico do Brasil e o primeiro refrigerante orgânico de guaraná do mundo, sendo produzido com ingredientes 100% naturais e orgânicos derivados de frutas ou extratos de origem vegetal (APAS SHOW, 2017). Também existe a opção do LEMONAID<sup>®</sup>, uma marca que fabrica e comercializa refrigerantes e outras bebidas orgânicas na Europa. Em geral, o refrigerante orgânico tende a ser menos doce, pois não contém açúcar refinado, mas ainda assim continua sendo um excelente substituto, principalmente para aqueles que consomem refrigerantes diariamente (CAMPOS, 2017).

Os refrigerantes, diferente de outros grupos de alimentos, têm sofrido pressão de grandes grupos científicos, comerciais e industriais, devido ao seu envolvimento gigantesco com diferentes grupos etários e a enorme diversidade de bebidas disponíveis (MARTINEZ; BENEDETTI, 2016).

### 2.2 EDULCORANTE

Os edulcorantes são substâncias adicionadas aos alimentos em substituição ao açúcar. Alguns destes adoçantes, chamados de “edulcorantes intensos”, proporcionam um sabor doce intenso, sem adição de calorias, ou com uma quantidade reduzida destas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Os açúcares são responsáveis por muitas das propriedades dos alimentos, por isso, a remoção ou substituição do açúcar altera as características do alimento; sabor, textura e aparência, sendo em alguns casos, necessário alterar toda a formulação da receita, o que resultará em um produto novo e diferente, respeitando os gostos e expectativas do consumidor (MARTINEZ; BENEDETTI, 2016). A frutose é considerada um açúcar, sendo um composto sólido, incolor, cristalino e que é solúvel em água. É um carboidrato de baixo custo, utilizada na indústria alimentícia em vários produtos (BARREIROS, 2005; BRAGA, 2016).

Na prática nutricional, a ingestão moderada de frutose presente nos alimentos naturais tem efeitos benéficos a partir da sua utilização como elemento energético. A frutose é vista como uma possível substituta da glicose na dieta dos diabéticos, pelo fato de possuir estrutura química semelhante à da glicose, mas não necessitar da insulina para o seu metabolismo (BARREIROS, 2005). O estudo feito por Oliveira e Franco (2010) demonstrou que o motivo mais citado para o uso de edulcorantes foi a presença de diabetes, e quase metade dos entrevistados que usam edulcorantes deixaria de usar se fosse possível a utilização do açúcar.

### 2.3 ANTIOXIDANTES

Até a década de 80, as espécies reativas de oxigênio (EROs) eram tidas como agentes tóxicos capazes de produzir modificações oxidativas irreversíveis, tendo capacidade de alterar o equilíbrio bioquímico celular de forma letal. Entretanto, nos últimos anos, as EROs vêm ganhando um novo papel nos sistemas biológicos, a partir de estudos que têm mostrado que elas podem atuar como mediadores químicos na comunicação intercelular (CARDOSO et al., 2006).

O organismo humano possui um complexo sistema de proteção antioxidante como mecanismo de defesa contra os radicais livres, que são formados constantemente no metabolismo celular normal. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem nas mitocôndrias, que são as principais fontes geradoras desses radicais por conta da cadeia transportadora de elétrons nas membranas celulares e no citoplasma (DUDA, 2013). Estudos comprovam que os antioxidantes obtidos pela alimentação saudável desaceleram o processo de envelhecimento, combatendo ou inativando os radicais livres, pela quantidade de vitamina C, vitamina E, carotenoides, entre outros compostos providos pelos alimentos (ROCHA, 2016).

Quando adicionados aos alimentos, os compostos antioxidantes são capazes de retardar a formação de produtos oxidativos, manter a qualidade nutricional do alimento e



aumentar o seu prazo de validade. Devido às preocupações de segurança sobre o uso de antioxidantes sintéticos, o interesse sobre os antioxidantes naturais obtidos de materiais comestíveis tem aumentado (NASCIMENTO, 2016)

### 2.3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo também, seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos pelo reino vegetal, englobando desde moléculas simples, como por exemplo, os ácidos fenólicos e os flavonoides, até outras com alto grau de polimerização, como os taninos (RODRIGUES et al., 2018).

São originados através do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse, como por exemplo, infecções, ferimentos, radiações ultravioletas, entre outras condições (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos totais em sucos de frutas podem ser influenciados por diversos fatores, como a seleção da variedade de frutas para produzir o suco, métodos de processamento e condições de armazenamento. O processamento comercial de sucos de frutas, como clarificação, filtração e pasteurização, afeta fortemente o conteúdo fenólico dos sucos (FRÖHLING ET AL., 2012).

### 2.3.2 FRAP

O método do FRAP foi originalmente desenvolvido como uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos isolados (URREA-VICTORIA et al., 2016).

Este método não envolve geração radical ou eliminação de radicais adicionados, mas sim em uma reação de redução simples, realizada em condições fixas, nas quais a molécula oxidante muda de cor quando é reduzida (BENZIE; DEVAKI, 2018).

### 2.3.3 ABTS

Por meio da adição do persulfato de potássio, o radical ABTS é formado, apresentando uma cor esverdeada. Na medida que o composto antioxidante é adicionado a esse radical, a redução de  $ABTS^{*+}$  a ABTS ocorre, provocando a perda dessa coloração (TIVERON, 2010).

O método  $ABTS^{*+}$  é simples e pode ser avaliado em diferentes faixas de pH, o que torna essa metodologia importante para o conhecimento do efeito do pH em diferentes mecanismos oxidantes. Contudo, esse método tem a limitação de não ser um

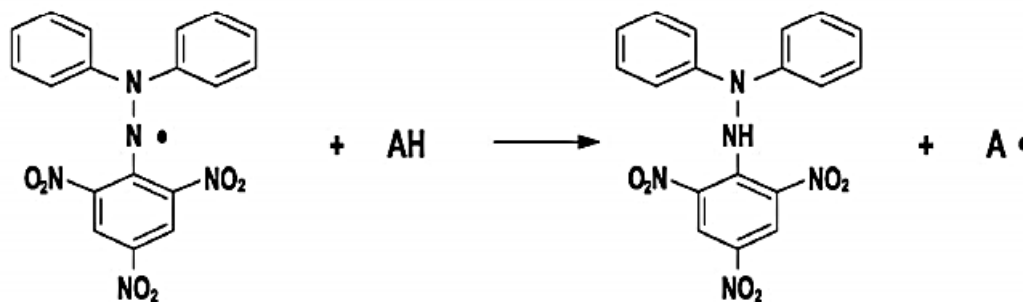
representante das biomoléculas e nem mesmo sem encontrado em nenhum sistema biológico (SOUZA, 2013).

#### 2.3.4 DPPH

O radical DPPH possui uma coloração púrpura. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente diminuição da absorbância. Isso pode ser observado na Figura 1.

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe  $H^+$  sendo então reduzido. A utilização do método DPPH é recomendado por ser um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (TOMEI; SALVADOR, 2007).

**Figura 1.** Reação do DPPH



Fonte: PISOSCHI; CHEREGI; DANET. *Molecules*, 2009, vol. 14, p. 480-493.

#### 2.4 *Baccharis dracunculifolia*

As plantas medicinais são usadas desde o início da história, por possuírem princípios ativos capazes de melhorar a saúde do indivíduo. Atualmente, o uso de plantas medicinais se popularizou, por conta do preço elevado e dos efeitos colaterais que os fármacos possuem (ALONSO, 2018).

A *B. dracunculifolia* (Figura 2) também conhecida como alecrim do campo, ou vassourinha do campo, pertence à família *Asteraceae* e é uma planta arbustiva que apresenta características de colonizadora e invasora.

No Brasil estão descritas pelo menos 120 espécies de *Baccharis*, as quais já foram utilizadas em estudos químicos e ensaios biológicos (HOCAYEN, 2012).

**Figura 2.** *Baccharis dracunculifolia*



**Fonte:** O autor.

Os metabólitos secundários do alecrim do campo são usados pelas abelhas para a produção de própolis verde, que é extremamente valorizada pelas indústrias farmacêuticas por apresentar atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, anticariogênica, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante (ACKERMANN, 1991). Estudos que avaliaram a atividade anti-ulcerogênica do óleo essencial dessa planta demonstraram que a mesma foi capaz de reduzir a área total de lesões ulcerativas estomacais, bem como a quantidade de lesões (MASSIGNANI et al., 2009). As plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, e algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, e inseticidas, dentre outros produtos (PAROUL et al., 2016).

A matéria-prima de própolis é composta, aproximadamente, por 50% de resina, 30% de cera de abelha, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, entre elas, componentes introduzidos durante a produção de própolis (SFORCIN et al., 2012). O Japão e alguns países da Ásia adquirem quase toda a produção bruta de própolis do Brasil e a empregam no desenvolvimento de medicamentos protetores do fígado e para inibição de tumores cancerígenos (SANTOS et al., 2011).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu grande uso na medicina caseira na América Latina. Sua fitoquímica destaca a presença de flavonóides, diterpenos e triterpenos, sendo nitidamente observado maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (FERRONATTO, 2007).

## 2.5 DIABETES

O diabetes é uma das dez principais causas de morte nos países ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas consequências letais. É caracterizado como um distúrbio crônico, que afeta o metabolismo de carboidratos, de gorduras e proteínas no organismo (NEGRI, 2005).

A diabetes *mellitus* tipo 2 é a mais comum, representando cerca de 90 a 95% dos casos. Os pacientes acometidos produzem insulina, mas suas células não conseguem utilizá-la adequadamente devido à diminuição da sua ação, caracterizando resistência à insulina. Dessa forma, não há efetiva ação hipoglicêmica da insulina e a diminuição da captação de glicose pelas células resulta no aumento da produção de glicose hepática, o que colabora ainda mais com o aumento da glicemia e se associa com altos níveis de insulina no sangue (BERTONHI; DIAS, 2018; ROCHA et al., 2006).

O diabetes tipo 2 tem se tornado uma preocupação de saúde pública, pelo fato de estar associado aos fatores socioeconômicos, sendo um fato de política social nada favorável à qualidade de vida (XAVIER; NUNES, 2018).

### 2.5.1 ESTRESSE OXIDATIVO NA DIABETES

O diabetes causa anormalidades funcionais no sistema pulmonar, tais como redução no recolhimento elástico, nos volumes pulmonares e na capacidade de difusão. Um dos fatores responsáveis pelas alterações pulmonares pode ser o estresse oxidativo, visto que, o mecanismo responsável pelo desenvolvimento é a hiperglicemia, que ativa a via dos polióis, elevando a produção de sorbitol, ocasionando um estresse celular que leva à diminuição das defesas antioxidantes intracelulares (JUNIOR et al., 2009).

A hiperglicemia prolongada causa uma variedade de mudanças patológicas em pequenos vasos, artérias e nervos periféricos. As células do endotélio vascular tornam-se alvos primários dos danos hiperglicêmicos por causa do fluxo contínuo de glicose através deles (ROCHA et al., 2006).

### 2.5.2 PLANTAS MEDICINAIS E DIABETES

No Brasil, a população possui um grande conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico devido a miscigenação do povo, decorrente dos colonizadores e escravos vindos do oriente, somados ao conhecimento indígena local (HOCAYEN, 2012).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas, quando avaliadas farmacologicamente, apresentam atividade hipoglicemiante e constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes (NEGRI, 2005).

O uso de plantas medicinais deve ser fortalecido por estudos que comprovem a eficácia em seres humanos para o tratamento de diabetes, contribuindo para estabelecer o perfil de toxicidade de cada planta, visto que, mesmo com o avanço na ciência e na medicina, muitos portadores de diabetes ainda recorrem ao uso de plantas medicinais (DEFANI; OLIVEIRA, 2015).

*Enicostemma littorale* Blume, uma pequena erva de família Gentianaceae, é comumente usada por pessoas da zona rural de Gujarat, na Índia. Esta planta apresentou propriedade similar a glibencamida quanto ao efeito hipoglicêmico pelo estímulo da produção de insulina pelas células beta pancreáticas (MAROO et al., 2002; PEREIRA, 2014).

Em um estudo feito por Kasiviswanath e colaboradores (2005), foi descrito que *Gmelina asiatica* possuía atividade hipoglicemiante associada a inibição dos canais de ATPase de K<sup>+</sup> em células beta pancreáticas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho apresenta a possibilidade de formular um refrigerante orgânico de laranja, com adição de extrato de *B. dracunculifolia*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaboração de refrigerante orgânico de laranja com adição de extrato de *B. dracunculifolia*.

Avaliação de atividades antioxidantes de cada uma das amostras de refrigerante.

Avaliação e análises físico-químicas sobre cada uma das amostras de refrigerante.

Análise de presença de coliformes, bolores e leveduras em cada uma das amostras de refrigerante.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 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.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO DE *Baccharis dracunculifolia*

As folhas de alecrim do campo (Fig. 3 A) foram coletadas no mês de setembro de 2019, no Campus Cedeteg da Universidade Estadual do Centro-Oeste, no município de Guarapuava-PR. Com as seguintes coordenadas geográficas Latitude Sul 25°38'23" e Longitude Oeste 51°49'10". As folhas foram levadas para o Laboratório de Biomed, localizado no mesmo campus. Em seguida, as folhas foram arrancadas dos galhos e submetidas à secagem em estufa à 50°C por 6 horas. Em seguida, as folhas secas de *B. dracunculifolia* passaram por 1 minuto de trituração até forma de pó (Fig. 3 B). 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 (Fig. 3 C). Em seguida, foi feita uma filtragem simples seguida de uma rota evaporação a 25 rpm à 60 °C (Fig. 3 D).

**Figura 3.** Etapas do preparo de extrato de *B. dracunculifolia*. A: folhas arrancadas dos galhos. B: pó obtido da centrifugação. C: agitação magnética do líquido. D: rota evaporação do líquido.



**Fonte:** O autor.

O material rota-evaporado foi para banho-maria por um período de 24 horas à 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).

#### 4.3 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 (µg 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.

#### 4.4 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 µL de cada amostra, de concentrações diferentes, foram adicionadas aos tubos de ensaio, juntamente com 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos de ensaio foram incubados à 37°C em banho-maria por 30 minutos. O espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. As leituras de absorbância foram feitas a 595 nm. A curva de calibração foi construída através da utilização da solução de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), em um intervalo de concentrações de 200 a 2000 µM. Os resultados foram expressos em micromol de ferro por grama de amostra (µMol Fe<sup>2+</sup>/g) através da equação da reta ( $y = 0,0005x - 0,0463/R^2 = 0,9985$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

#### 4.5 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 µL de cada amostra, de concentrações diferentes, seguido da adição de 3 mL de etanol e 300 µL 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 (µM trolox/g), através da construção de uma curva de trolox no intervalo de concentrações de 100 a 1000 µM na equação da reta ( $y = -5,1834x + 0,3168/R^2 = 0,9874$ ). Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* PELO MÉTODO DA CAPTURA DO ABTS<sup>•+</sup>

A atividade antioxidante pelo método da captura de ABTS<sup>•+</sup> foi realizada conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2007). A reação foi formada pela solução ABTS a 7 mM com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 140 mM, que foi incubada à 27°C, durante 16 horas. Em seguida, foi diluída em etanol até obter valor de absorbância de 0,700 a 734 nm. Para realização da análise, alíquotas de 30 µL de cada amostra, de concentrações diferentes, foram transferidas para tubos de ensaio, os quais foram adicionados 3 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> 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 triplicatas.

#### 4.7 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 para medir. 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 triplicatas.

#### 4.8 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 triplicatas.

#### 4.9 LEITURA DE GRAU BRUX ( $^{\circ}\text{Bx}$ )

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 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 triplicatas.

#### 4.10 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 à 22°C por cinco dias para crescimento. Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

#### 4.11 ANÁLISE DE COLIFORMES À 35°C

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 à 35°C por 72 horas. O resultado foi expresso como ausência (-) ou presença (+) desse grupo de microrganismos.

#### 4.12 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.

#### 4.13 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  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução 2  $\text{cm}^{-1}$  e 256 acumulações.

#### 4.14 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.

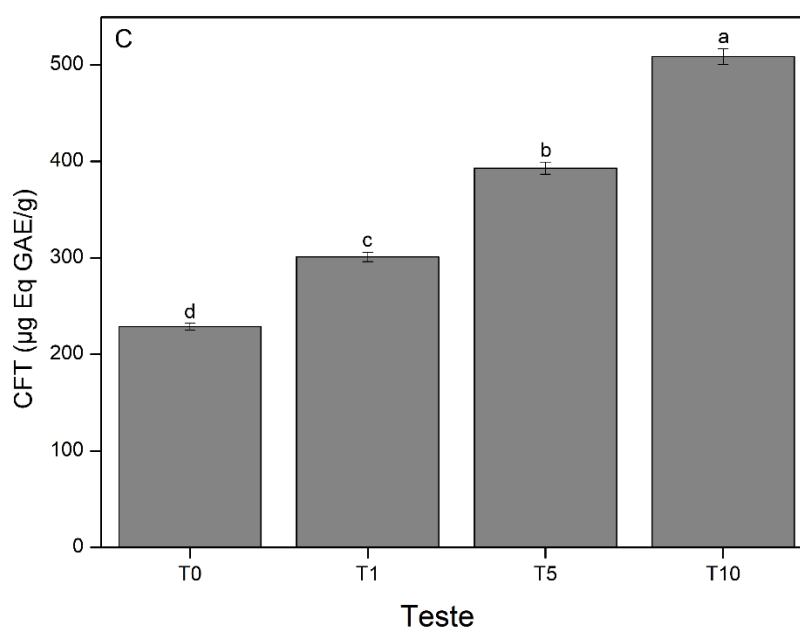
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES ANTIOXIDANTES

#### 5.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Na Figura 4 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante através dos CFT. 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.

**Figura 4.** Gráfico das concentrações de cada teste no método de CFT



**Fonte:** O autor.

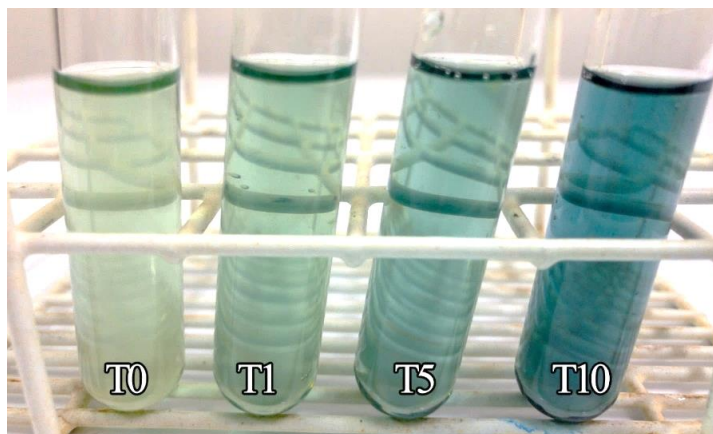
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

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.

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 5 está apresentado como os tubos ficaram após o tempo de reação ocorrer, mostrando que, quanto maior a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia*, maior a redução, por isso a coloração azulada.

**Figura 5.** Tubos de ensaio após a reação dos CFT. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato)

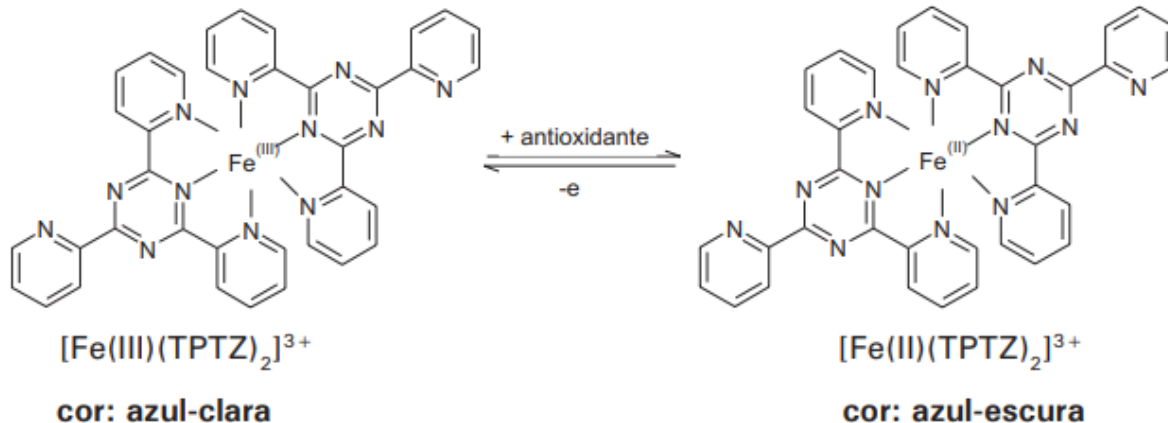


Fonte: O autor.

### 5.1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO

Quando o íon  $\text{Fe}^{3+}$  presente no complexo TPTZ é reduzido para a forma  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 6), 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).

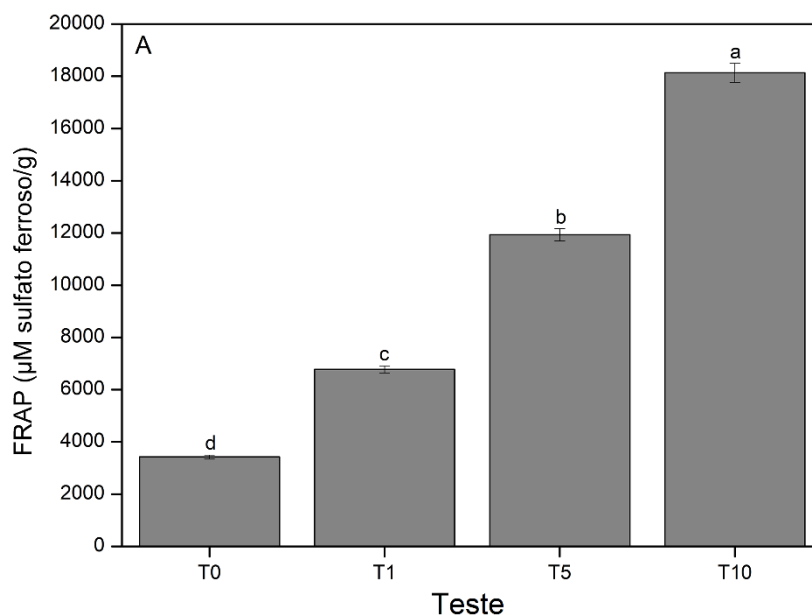
**Figura 6.** Redução do complexo TPTZ com  $\text{Fe}^{3+}$



Fonte: Comunicado Técnico – EMBRAPA

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de FRAP podem ser observados na Figura 7. É possível verificar que, com o aumento da concentração de extrato de *B. dracunculifolia*, maior era a atividade antioxidante pela redução de ferro.

**Figura 7.** Gráfico das concentrações de cada teste no método FRAP

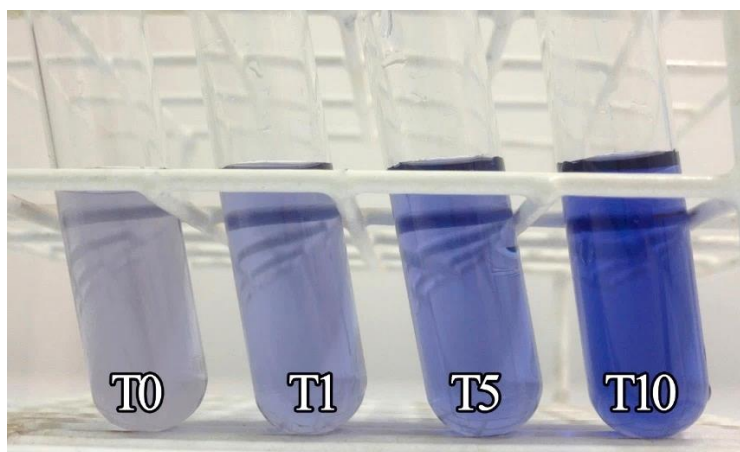


**Fonte:** O autor.

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

Na Figura 8 está apresentado como os tubos de ensaio ficaram após a reação ocorrer, apresentando variação na coloração.

**Figura 8.** Tubos após a reação de FRAP. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato)



**Fonte:** O autor.

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 o método FRAP, o sabor de refrigerante que apresentava os maiores

valores de média de atividade antioxidante foi de maçã, enquanto o de laranja apresentou os menores valores.

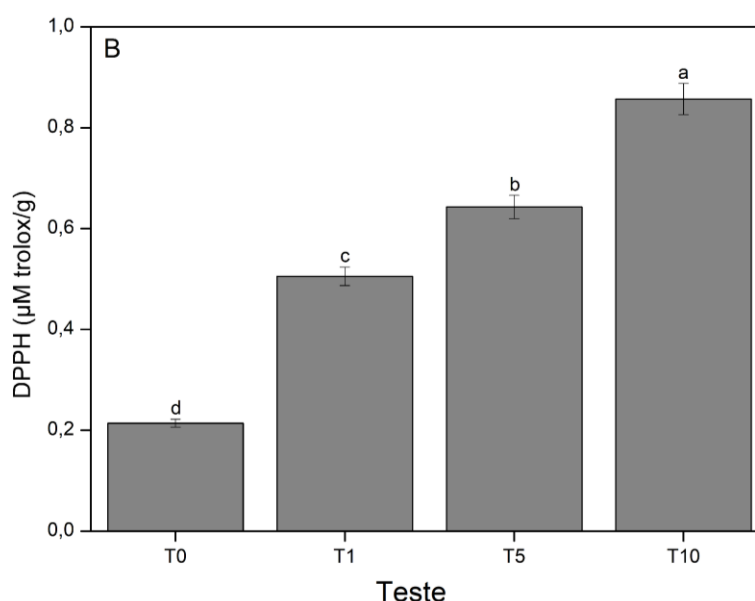
No estudo feito por Pellegrini et al. (2003), foram testados 30 tipos de frutas diferentes para os testes de FRAP. Foi constatado que, pelo método, a amora foi a que apresentou maior atividade antioxidante, devido ao seu alto conteúdo de ácidos fenólicos e flavonóides, como por exemplo, as antocianinas. As frutas cítricas exibiram capacidade antioxidante intermediária, sendo as laranjas as mais eficazes, seguidas pelas toranjas.

### 5.1.3 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 9 está representado o resultado da captura do DPPH. Assim, é possível ver que, conforme a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia* aumenta, maior é a atividade antioxidante nesse método.

**Figura 9.** Gráfico das concentrações de cada teste no método DPPH

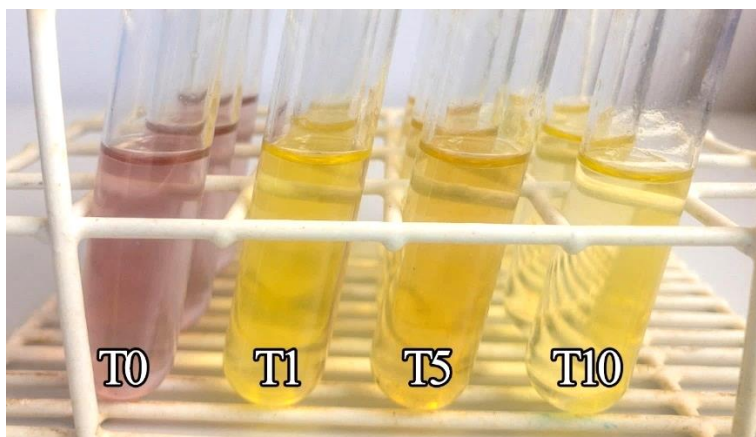


**Fonte:** O autor.

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

Na figura 10 está apresentado como os tubos de ensaio ficaram após a reação ocorrer, mostrando que, somente o suco de laranja não consegue realizar a reação de redução do DPPH, mantendo a coloração roxa, diferente das amostras contendo o extrato, que ficaram amarelas após o tempo de reação.

**Figura 10.** Tubos de ensaio após a reação de redução de DPPH. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato)



Fonte: O autor.

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.

#### 5.1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA CAPTURA DO ABTS<sup>•+</sup>

A vantagem do teste ABTS<sup>•+</sup> 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 caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com ABTS<sup>•+</sup>, bem como em inibir os processos oxidativos (BORGES et al., 2011).

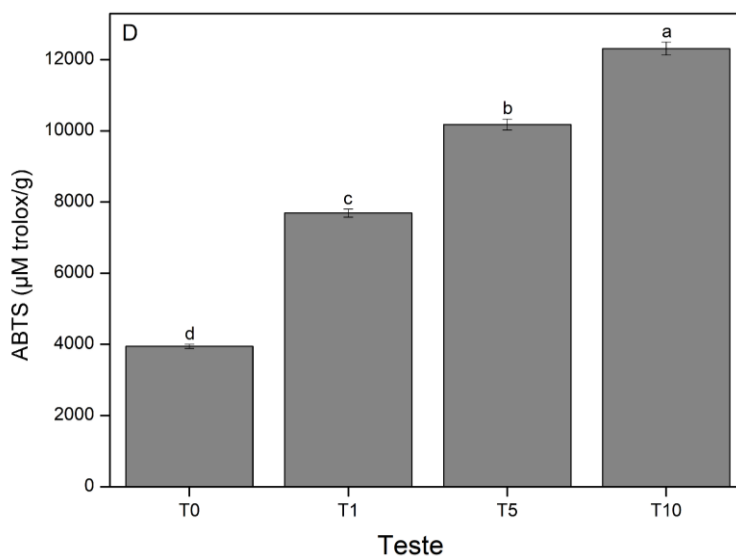
O ABTS é uma substância utilizada em vários ensaios enzimáticos, servindo como marcador de reação. Recentemente, vem sendo utilizado em ensaios colorimétricos, para estimar o potencial antioxidante de substâncias ou misturas (TORRES et al., 2017).

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<sup>•+</sup>, 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 11 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante através do método da captura do ABTS<sup>•+</sup>. Pode-se notar que, conforme a quantidade de extrato de *B. dracunculifolia* aumenta, maior é a atividade antioxidante.



**Figura 11.** Gráfico das concentrações de cada teste no método de ABTS•+

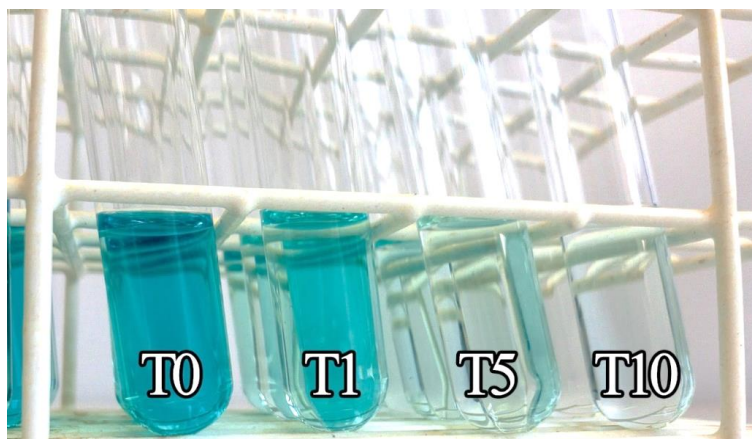


**Fonte:** O autor.

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

Na Figura 12 é possível observar como os tubos ficaram após o tempo de reação, exibindo que, quanto maior o valor de extrato na amostra, maior a redução de ABTS<sup>•+</sup> em ABTS, causando a perda da cor.

**Figura 12.** Tubos de ensaio após a reação de redução de ABTS<sup>•+</sup>. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato)



**Fonte:** O autor.

## 5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 5.2.1 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 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 (HANAN; MARREIRO, 2009).

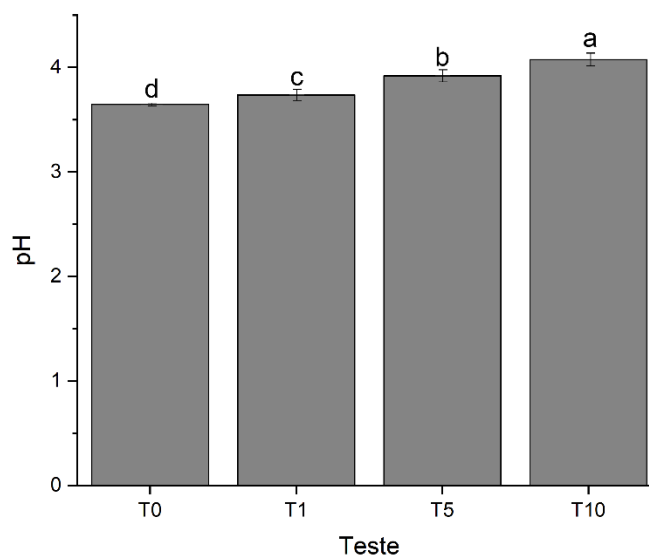
Na Tabela 1 e na Figura 13 estão apresentados os valores dos resultados dos níveis de pH.

**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: O autor.

**Figura 13.** Gráfico dos resultados dos níveis de pH



Fonte: O autor.

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

No estudo feito por Dantas (2017), as amostras de Fanta® laranja analisadas apresentaram nível de pH de 3,66. 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.

### 5.2.2 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.

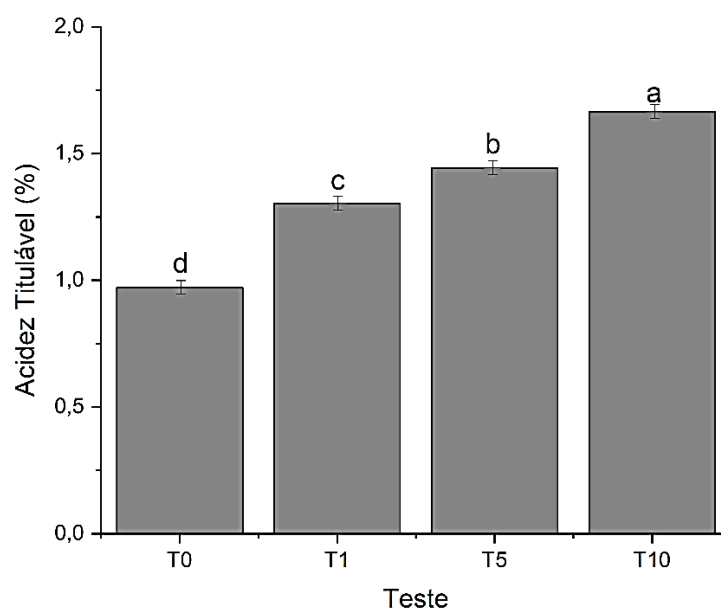
Não se tem valores máximos estipulados para essa análise. Na Tabela 2 e na Figura 14 estão apresentados os valores dos resultados da acidez titulável.

**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: O autor.

**Figura 14.** Gráfico dos resultados da acidez titulável



Fonte: O autor.

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

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 deste 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.

### 5.2.3 LEITURA DE GRAU BRUX (°Bx)

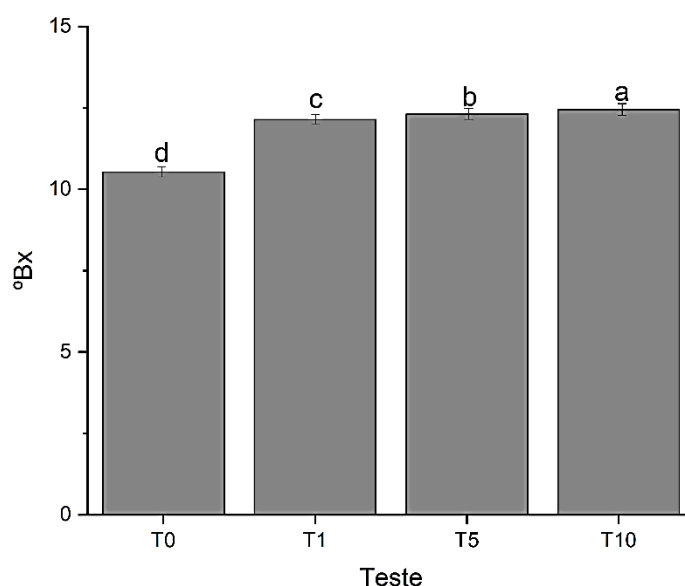
Na Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é exigido que, o valor de Grau Brix para refrigerante de laranja tenha valor no mínimo de 10%(V/V). Não se tem valores máximos estipulados para essa análise. Na Tabela 3 e na Figura 15 estão representados 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: O autor.

**Figura 15.** Gráfico dos resultados de Grau Brix



Fonte: O autor.

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

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. Comparando os resultados do estudo feito por Criveletto com os deste trabalho, não há uma diferença nos valores de Grau Brix para as amostras de refrigerante comercial para os refrigerantes feitos neste estudo.

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.

### 5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

#### 5.3.1 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 microbológica, 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 a 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

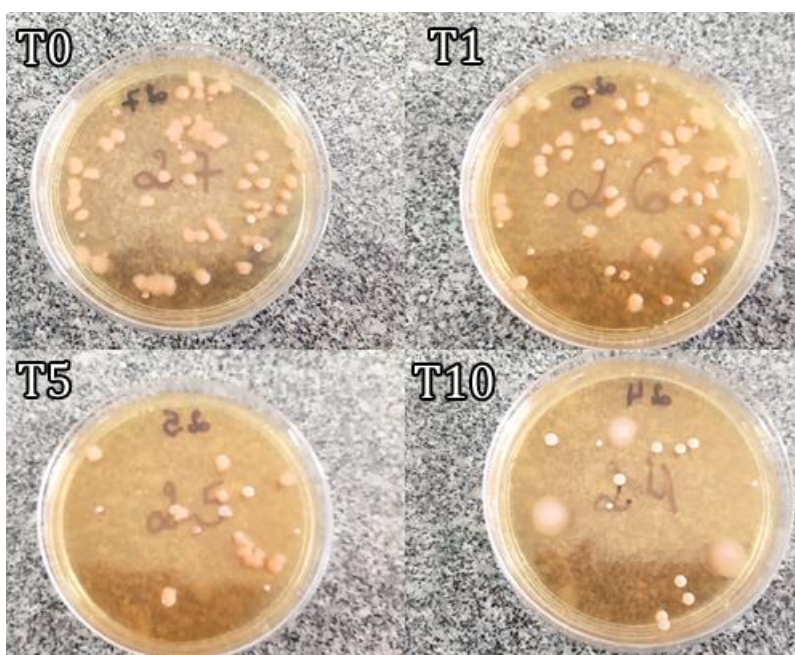
Fonte: O autor.

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).

Na Figura 16 está apresentado como ficaram as colônias após o tempo de incubação a 22°C. É possível ver que, conforme a quantidade de extrato vai aumentando, menor é a quantidade de colônias formadas.

**Figura 16.** Placas de Petri após incubação para análise. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato)



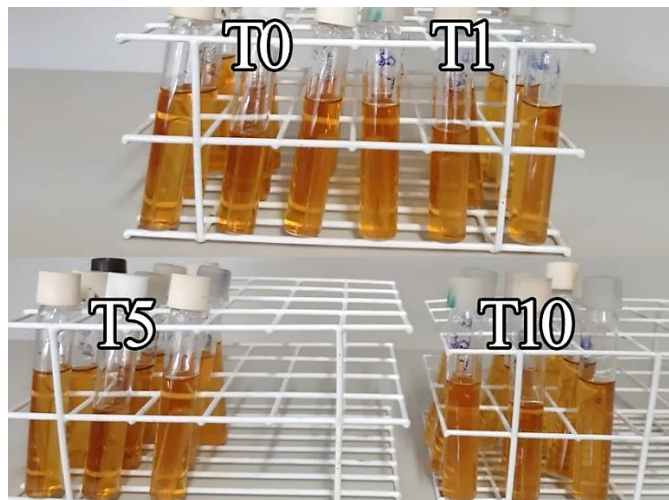
Fonte: O autor.

### 5.3.2 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.

De acordo com a Figura 17, é possível que ver que todas as amostras testadas nesse trabalho apresentaram ausência para coliformes totais, mostrando que este trabalho está dentro da legislação vigente.

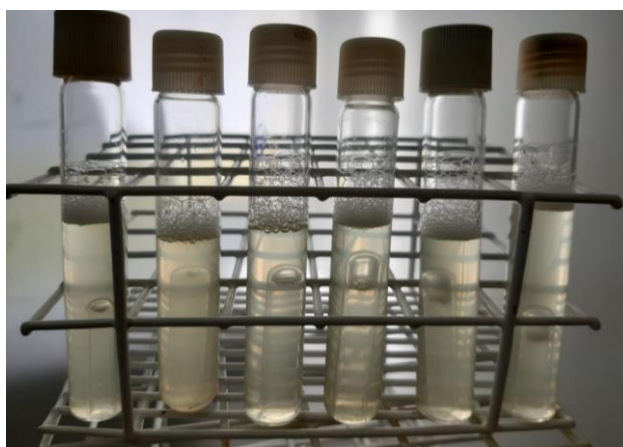
**Figura 17.** Tubos após incubação de coliformes totais. T0: Teste 0 (sem adição de extrato), T1: Teste 1 (com 1% de extrato), T5: Teste 5 (com 5% de extrato) e T10: Teste 10 (com 10% de extrato).



**Fonte:** O autor.

A título de curiosidade, os tubos positivos para o teste de coliformes totais ficaram como mostra a Figura 18, os quais apresentam uma bolha no meio do tubo. Quando um tubo é positivo para esse teste, também é possível de visualizar bolhas na superfície da amostra, porque conforme a bactéria fermenta, ocorre a liberação de álcool e  $\text{CO}_2$ .

**Figura 18.** Tubos positivos para teste de coliformes totais.



**Fonte:** O autor.

#### 5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

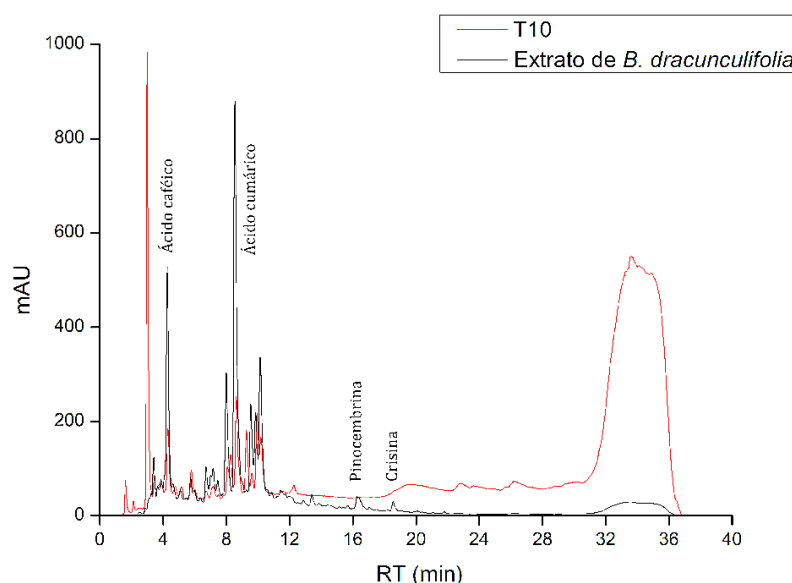
A cromatografia é uma técnica baseada na migração de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária que retém elementos e a fase móvel que conduz a mistura por meio de um soluto. É uma técnica que pode ser utilizada para purificação de substâncias, na detecção de substâncias ou auxiliar 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).

Na Figura 19 está representado o gráfico de como ficou a análise de cromatografia líquida de alta eficiência feita no extrato de *B. dracunculifolia* e no teste 10 (com 10% de extrato).

**Figura 19.** Gráfico da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. T10: Teste 10 (com 10% de extrato); mAU: Unidades de Mili-Absorbância; RT: Tempo de Retenção



Fonte: O autor.

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: O autor.



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 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 trouxe. Entre os 31 a 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 artepelinina C, ácido isocupressivo, ácido agático e ácido agatálico nessa faixa de tempo.

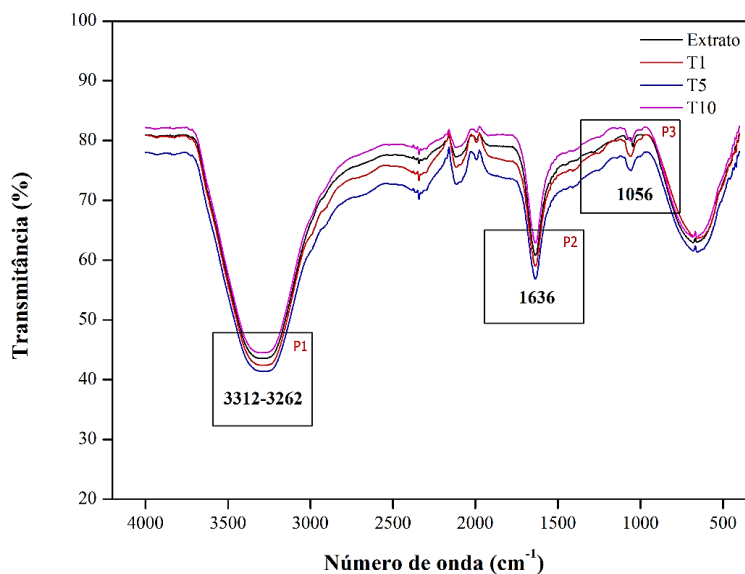
## 5.5 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

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).

Esta técnica apresenta como vantagens, o fato de simples preparação de amostra e um tempo de análise muito curto, permitindo que, em caso de necessidade, se proceda a uma resposta no local de fabricação para que o produto seja refeito nas condições corretas (ALMEIDA, 2009).

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentaram três picos característicos que puderam ser identificados (Figura 20).

**Figura 20.** 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: O autor.

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  $\text{cm}^{-1}$ .

## 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.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crudes. **Food Chemistry**. England: v. 42, nº 2, p. 135-138, ago./nov., 1991.
- ALONSO, C. F. Obtenção e caracterização de diferentes extratos de folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná, 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, vol. 66, nº 1, p. 1-9, 2007.
- APAS SHOW. Sobre o refrigerante Wewi. 2017, 2p. Disponível em: <http://www.apasshow.com.br/wp-content/uploads/2017/04/refrigerante-Wewi.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2019.
- BARNABÉ, D. Refrigerantes de acerola produzidos a partir de suco desidratado e extrato seco da fruta: análise química, sensorial e econômica. (Energia na Agricultura) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Botucatu, 164 p., 2003.
- BARREIROS, R. C., BOSSOLAN, G., TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**. Campinas: v. 18, nº 3, p. 377-389, maio/jun., 2005.
- BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos da funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Boletim SBCTA**, p. 99-106, 2001.
- BENZIE, I. F. F.; DEVAKI, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications**, 1ª Ed., 30 p., 2018.
- BERTONHI, L. G.; DIAS, J. C. R. Diabetes mellitus tipo 2: aspectos clínicos, tratamento e conduta dietoterápica. **Revista Ciências Nutricionais Online**, São Paulo, vol. 2, nº 2, p. 1-10, 2018.
- BORGES, et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, vol. 7, nº 12, p. 20, 2011.

BORGES, L. R. Análise de qualidade microbiológica (bolores e leveduras) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil) e identificação dos fungos potencialmente micotoxigênicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BRAGA, B. K. M. Intolerâncias À Frutose: Revisão de Literatura e Compilados de Tabelas de Composição. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos.

CAMPOS, T. Você sabe porque o Refrigerante Orgânico é melhor para Saúde? 2017. Disponível em: <http://thiagoorganico.com/refrigerante-organico/>. Acesso em: 23 jan. 2019.

CARDOSO et al. Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. **Medicina**, Ribeirão Preto, vol. 39, nº 1, p. 77-88, jan./mar. 2006.

CARVALHO, L. C. Estudos termoanalíticos dos edulcorantes acessulfame-K, aspartame, ciclamato, esteviosídeo e sacarina. (Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 102 p., 2007.

CHANG et al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, vol. 18, nº 4, p. 549-556, out./dez., 2008.

CRIVELETTO, R. Estabilidade físico-química e sensorial de refrigerante sabor laranja durante armazenamento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 52 p., 2011.

DANTAS, M. V. C. Caracterização físico-química em diferentes tipos de refrigerantes. (Química Industrial) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 30 p., 2017.

DEFANI, M. A.; OLIVEIRA, L. E. N. Utilização das Plantas Medicinais por Diabéticos do Município de Colorado (PR). **Saúde e Pesquisa**, Maringá, vol. 8, nº 3, p. 413-421, set./dez., 2015.

DUDA, N. C. B. Estresse Oxidativo. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9 p., 2013.

FABRI et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. Bras. Pl. Med**, Botucatu, vol. 13, nº 2, p. 183-189, 2011.

FERRONATTO et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteracea). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba: v. 17, nº 2, p. 224-230, abr./jun. 2007.

FIGUEIRA et al. Análise Físico-Química e Legalidade em Bebidas de Laranja. **Alim. Nutr.**, Araraquara, vol. 21, nº 2, p. 267-272, abr./jun. 2010.

FRÖHLING et al. Anthocyanins, total phenolics and antioxidant capacities of commercial red grape juices, black currant and sour cherry nectars. **Fruit Process**, German, p. 100-104, maio/jun. 2012.

GHAFOOR et al. The Effect of Heating Temperature on Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Plum and Mahaleb Fruits. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, vol. 15, nº 11-12, 11 p., 2019.

GOULART, D. S. Aplicações das Técnicas de Cromatografia no Diagnóstico Toxicológico. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

GUBOLINO, S. I. F. Qualidade físico-química e microbiológica de refrigerantes sabor guaraná em embalagens pet - 2000 ml e ocorrência de leveduras. Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 73 p., 2007.

HANAN, S. A.; MARREIRO, R. O. O. Avaliação do pH de Refrigerantes, Sucos e Bebidas Lácteas Fabricados na Cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, Paraíba, vol. 9, nº 3, p. 347-353, 2009.

HOCAYEN, P. A. S. Efeito da administração oral do extrato de *Baccharis dracunculifolia* na obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 108 p., 2012.

HOCAYEN, P. A. S. *Baccharis dracunculifolia* methanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. **Pharmaceutical Biology**. United States of America: v. 54, nº 7, p. 1263-1271, 2015.

IURCKEVICZ, G. Produção e caracterização de microencapsulado de extrato de *Baccharis dracunculifolia* e *Lasiodiplodana* (1→6)-β-d-glucana. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Paraná, 110 p., 2019.

JORDÃO, A. M. Phenolic compounds in fruit beverages. **Beverages**, Portugal, vol. 4, n° 35, 4 p., 2018.

JUNIOR et al. Estresse oxidativo e alterações estruturais pulmonares no diabetes mellitus experimental. **Jornal Brasileiro de Epidemiologia**, vol. 35, n° 8, agosto, 2009.

MASSIGNANI, J. J. et al. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**. United Kingdom: vol. 23, p. 1355-1360, 2009.

MIDORIKAWA et al. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Propolis. **Phytochemical Analysis**, vol. 12, p. 366-373, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. Portaria N°. 544, de 16 de novembro de 1998. 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. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellífera* do estado do Rio Grande do Sul. 83 p. (Área de Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, vol. 41, n° 2, p. 121-142, abr./jun., 2005.

OLIVEIRA, E. A. Controle de qualidade em refrigerante. 44 p. (Pesquisa Operacional) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

OLIVEIRA, P. B.; FRANCO, L. J. Consumo de adoçantes e produtos dietéticos por indivíduos com diabetes melito tipo 2, atendidos pelo Sistema Único de Saúde em Ribeirão Preto, SP, 2010.

PARK et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 52, p. 1100-1103, 2004.

PAROUL et al. Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* pers e *Baccharis dracunculifolia* DC (asteraceae). **Perspectiva**, Erechim, vol. 40, nº 151, p. 55-64, 2016.

PELEGRINI et al. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **The Journal of Nutrition**, vol. 133, nº 9, p. 2812-2819, 2003.

PEREIRA, R.A. Efeitos do tratamento do extrato metanólico de *Baccharis dracunculifolia* sobre alterações bioquímicas e histológicas de um modelo animal de diabetes. Guarapuava: Unicentro, 2014. 69 p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, 2014.

PIANTINO, C. R. Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico. Universidade Estadual de Campinas, 114 p., 2004.

PREEDY, V. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. 1 Ed. Londres: Elsevier, 2014.

QUEIRÓS, R. B.; TAFULO, P. A. R.; SALES, G. F. Assessing and Comparing the Total Antioxidant Capacity of Commercial Beverages: Application to Beers, Wines, Waters and Soft Drinks Using TRAP, TEAC and FRAP Methods. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Portugal, vol. 16, p. 22-31, 2013.

RIBEIRO, T. I. B. Desenvolvimento de um novo conceito de refrigerante. 160 p. (Qualidade Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011.

ROCHA, E. C.; SARTORI, C. A.; NAVARRO, F. F. A Aplicação de Alimentos Antioxidantes na Prevenção do Envelhecimento Cutâneo. **Revista Científica da FHO**, Rio Claro, vol. 4, nº 1, 8 p., 2016.

ROCHA, C. D. Determinação dos pontos críticos de contaminação por leveduras em indústria de refrigerantes. 49 p. (Pós Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROCHA et al. Deterioração de refrigerantes por leveduras. **Visão Acadêmica**, Curitiba, vol. 5, nº 2, p. 95-100, jul.-dez. 2004.



ROCHA et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Rev. Bras. Farm.**, vol. 87, n° 2, p. 49-54, 2006.

RODRIGUES et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de casca, folha e fruto de muricizeiro. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, vol. 12, n° 5, p. 55-60, dez. 2018.

ROMBALDI et al. Fatores associados ao consumo regular de refrigerante não dietético em adultos de Pelotas, RS. **Rev Saúde Pública**, Pelotas, vol. 45, n° 2, p. 382-390, 2011.

RUFINO et al. Comunicado técnico on-line: Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Embrapa**, 4p., dez., 2006.

RUFINO et al. Comunicado técnico on-line: Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa**, 4p., julho, 2007.

RUFINO et al. Comunicado técnico on-line: Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup>. **Embrapa**, 4p., julho, 2007.

SÁDECKÁ, et al. Orange juice with pulp: impact of pasteurization and storage on flavour, polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity. **Journal of Food and Nutrition Research**, Slovakia, vol. 53, n° 4, p. 371-388, 2014.

SANTOS, E.; BRASSAN, K. Anteprojeto Indústria de Refrigerantes de Sabores Exóticos. Universidade Federal de Santa Catarina, 61 p., 2011.

SANTOS et al. Produtividade do óleo essencial de alecrim-do-campo em função da adubação orgânica. **Hortic. bras.**, São Paulo, vol. 29, n° 2, 7 p., julho, 2011.

SFORCIN et al. *Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SILVA, I. S. Efeito da luz na atividade antioxidante de refrigerante sabor guaraná acondicionado em diferentes embalagens. 39 p. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Campo Mourão, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am J Enol Vitic**, vol. 16, p. 144-158, janeiro, 1965.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes**. 2017-2018 São Paulo: 2017.

SOUZA, W. Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 37 p., 2013.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos – ocorrência e detecção. Campinas: ITAL/Núcleo de Microbiologia, 82 p., 2001.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 103 p., 2010.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. Universidade do Vale do Paraíba, 5 p., 2007.

TORRES et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro de ABTS em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 4 p., 2017.

URREA-VICTORIA et al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 6 p., 2016.

VANNUCHI, H.; ROCHA, M. M. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido ascórbico (Vitamina C). **International Life Sciences Institute do Brasil**. São Paulo, vol. 21, 22 p., julho, 2012.

XAVIER, A. T.; NUNES, J. S. Tratamento de Diabetes Mellitus com Plantas Mediciniais. **Revista Científica FAEMA**, Rondônia, vol. 9, n° ed esp, p. 603-609, maio/jun., 2018.