



Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia de Alimentos

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

MARINA LEVORATO DE MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus helveticus*
ADICIONADO DE EXTRATO DE HIBISCO ENCAPSULADO**

LONDRINA

2022

MARINA LEVORATO DE MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus helveticus*
ADICIONADO DE EXTRATO DE HIBISCO ENCAPSULADO**

**DEVELOPMENT OF MILK FERMENTED BY *Lactobacillus helveticus* ADDED
WITH ENCAPSULATED HIBISCUS EXTRACT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Francisco Beltrão e Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração: Tecnologia de alimentos

Linha de Pesquisa: Tecnologia de origem animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Marly Sayuri Katsuda

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Dra. Fernanda Vitória Leimann

LONDRINA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina



MARINA LEVORATO DE MORAES

DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR LACTOBACILLUS HELVETICUS ADICIONADO DE EXTRATO DE HIBISCO ENCAPSULADO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 15 de Fevereiro de 2022

Prof.a Marly Sayuri Katsuda, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Ana Paula Stafussa, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Prof.a Fernanda Vitoria Leimann, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marianne Ayumi Shirai, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/02/2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sempre iluminar o meu caminho e abençoar os momentos mais difíceis.

Agradecer aos meus pais, Ana Cristina Levorato de Moraes e Jaci Oliveira de Moraes, por apoiarem minhas escolhas e dedicarem todo amor e incentivo durante minha vida.

Ao meu marido Márcio Henrique Ribeiro, por sempre estar ao meu lado, me dando amor e confiança.

À Thaysa Fernandes Moya Moreira, pelos seus conhecimentos e principalmente por sua amizade e incentivo. E a Rafaela Soares Kanai, amizade que ganhei durante essa etapa e que com certeza levarei para vida, obrigada pelas conversas e apoio durante o mestrado.

Às minhas professoras e orientadoras Marly Sayuri Katsuda e Fernanda Vitória Leimann, pela disposição em me orientar e por toda ajuda e ensinamento.

À Vanessa Rodrigues e a Adriele Rodrigues dos Santos, técnicas dos laboratórios, pela disponibilidade e ajuda durante minhas análises.

Por fim, a todos, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

MORAES, Marina Levorato de. **Desenvolvimento de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* adicionado de extrato de hibisco encapsulado**. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Cidade de Londrina, 2022.

RESUMO

O consumo de alimentos lácteos funcionais expandiu-se rapidamente pela sua qualidade nutricional e seu elevado valor biológico. Dentre estes produtos, destacam-se os leites fermentados por bactérias ácido lácticas (BAL), que contribuem na melhora das características sensoriais e nutricionais. Outro fator que vem demonstrando visibilidade é a aplicação de plantas que podem conferir características tecnológicas e sensoriais em substituição a compostos sintéticos, além de também proporcionarem o aumento do valor nutricional devido a presença de compostos bioativos. Portanto, esse trabalho propôs desenvolver um leite fermentado com a cultura *L. helveticus* (LH) e *S. thermophilus* (ST), adicionado de extrato de hibisco livre (LHExL e LHSTExL) ou encapsulado com PVP e Tween 80 (LHExE e LHSTExE), os quais foram avaliados o pH, acidez titulável, atividade antioxidante (DPPH e FRAP), perfil protéico por eletroforese, contagem das BALs e cor ao longo dos 30 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C. A associação das culturas permitiu melhorar o desempenho tecnológico reduzindo o tempo de fermentação. O pH do leite fermentado LHExL e LHExE apresentou-se inferior comparado aos demais tratamentos no tempo inicial, e após 15 dias houve redução significativa nos leites fermentados por ambas as BALs. Em relação a atividade antioxidante frente ao radical DPPH, os leites fermentados exibiram valores significativos, porém, foram resultados obtidos exclusivamente pela alta atividade proteolítica do *L. helveticus*, de forma que a adição dos extratos de hibisco não proporcionou diferença entre as amostras. O ensaio FRAP também exibiu efeito positivo na capacidade antioxidante em todas as amostras, os resultados demonstraram que a aplicação dos extratos de hibisco contribuiu com a estabilidade da atividade durante o armazenamento. O estudo do perfil protéico demonstrou que após 15 dias de armazenamento, houve uma provável relação sinérgica entre as culturas contribuindo com a redução da banda das proteínas α -caseína e β -caseína das amostras e que as caseínas foram hidrolisadas em todos os tratamentos aos 30 dias de armazenamento. Os parâmetros de texturas demonstraram que todos os tratamentos apresentaram estrutura de gel macio e frágil. Os leites fermentados por LHST adicionados ou não de extratos de hibisco apresentaram alterações de cor nos primeiros 15 dias de estocagem. O LH não alterou este parâmetro ao longo do tempo de estocagem. Ao comparar a diferença de coloração entre os leites fermentados, observou-se que o LH apresentou diferenças significativas, o qual a adição do extrato encapsulado resultou em uma maior intensidade de cor comparado ao leite sem adição ao longo dos 30 dias de estocagem. Enquanto o tratamento LHST apresentou diferenças significativas na intensidade de cor com os extratos de hibiscos somente aos 30 dias de estocagem. Por fim, nos resultados sobre o potencial corante do extrato de hibisco foi possível observar que a tendência a coloração vermelha mais intensa é proporcional à concentração de extrato adicionada. Com isso, é possível concluir que a cultura de *L. helveticus* pode desenvolver atividade antioxidante em leites fermentados, e os extratos de hibisco podem ser uma alternativa em substituição a corantes sintéticos.

Palavras chaves: Composição proximal; DPPH; Cor; Estocagem; *S. thermophilus*.

MORAES, Marina Levorato de. **Development of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* added with encapsulated hibiscus extract**. 2022. 67 f. Dissertation (Master in Food Technology) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Functional dairy food consumption has expanded rapidly due to its quality and high biological value. Among these products, milk fermented by lactic acid bacteria (LAB) stands out, which increase the improvement of sensory and nutritional characteristics. Another factor that has been showing visibility is the application of plants that can provide technological and sensorial characteristics in substitution of synthetic compounds, in addition to providing an increase in nutritional value due to the presence of bioactive compounds. Therefore, this work proposed to develop a milk fermented with the culture *L. helveticus* (LH) and *S. thermophilus* (ST), added with free hibiscus extract (LHE_xL and LHST_xL) or encapsulated with PVP and Tween 80 (LHE_xE and LHST_xE), which were evaluated for pH, titratable acidity, antioxidant activity (DPPH and FRAP), protein profile by electrophoresis, LAB count and color over 30 days of storage at 4 ± 1 °C. The association of cultures made it possible to improve technological performance by reducing time and fermentation. The pH of LHE_xL and LHE_xE fermented milk was lower compared to the other treatments at the initial time, and after 15 days there was a significant reduction in milks fermented by both BALs. Regarding the antioxidant activity against the DPPH radical, the fermented milks showed significant values, however, these results obtained were developed exclusively by the high proteolytic activity of *L. helveticus*, so that the addition of hibiscus extracts did not provide any difference between the samples. The FRAP assay also showed a positive effect on the antioxidant capacity in all samples, the results showed that the application of hibiscus extracts contributed to the stability of the activity during storage. The study of the protein profile showed that after 15 days of storage, there was a probable synergistic relationship between the cultures contributing to the reduction of the α-casein and β-casein protein band of the samples and that the caseins were hydrolyzed in all treatments at 30 storage days. The texture parameters showed that all treatments presented a soft and fragile gel structure. The LHST fermented milks with or without hibiscus extracts showed color changes in the first 15 days of storage. LH did not change this parameter along the storage time. When comparing the color difference between the fermented milks, it was observed that the LH showed significant differences, in which the addition of the encapsulated extract resulted in greater color intensity compared to the milk without addition over the 30 days of storage. While the LHST treatment showed significant differences in color intensity with the hibiscus extracts only at 30 days of storage. Finally, in the results on the coloring potential of the hibiscus extract, it was possible to observe that the tendency to a more intense red color is proportional to the concentration of extract added. With this, it is possible to conclude that the culture of *L. helveticus* can develop antioxidant activity in fermented milks, and hibiscus extracts can be an alternative to synthetic dyes.

Keywords: Proximal composition; DPPH; Color; Storage; *S. thermophilus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de fabricação dos leites fermentados.	29
Figura 2 – Aparência dos extratos livre e encapsulado e suas soluções.	35
Figura 3 – Análise térmica diferencial (DTA) do extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.	36
Figura 4 – Curvas termogravimétricas (TG) do extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.	37
Figura 5 – Curvas derivadas (DTG) para o extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.	38
Figura 6 – Acidez titulável durante o processo de fermentação	39
Figura 7 – Evolução do pH (A) e acidez titulável (B) do leite fermentado por <i>L. helveticus</i> (LH) e <i>L. helveticus</i> e <i>S. thermophilus</i> (LHST) adicionado de extrato de hibisco (LHExL ou LHSTExL) ou extrato encapsulado (LHExE ou LHSTExE) ao longo dos 30 dias de estocagem a 4 °C.	42
Figura 8 – Leites fermentados com <i>L. helveticus</i> adicionado ou não de <i>S. thermophilus</i> aos 30 dias de estocagem a 4 ± 1°C.	44
Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos tratamentos fermentados.	53
Figura 10 – Aparência dos leites fermentados adicionado de diferentes concentrações de extrato de hibisco.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Técnicas utilizadas para a encapsulação de extrato de hibisco.....	22
Quadro 2 - Produtos lácteos adicionados de extrato de hibisco.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição proximal dos leites fermentados com <i>L. helveticus</i> adicionados ou não de <i>S. thermophilus</i>	40
Tabela 2 – Resultados médios do parâmetro L* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a 4 ± 1°C.....	44
Tabela 3 – Resultados médios do parâmetro a* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a 4 ± 1°C.....	45
Tabela 4 – Resultados médios do parâmetro b* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a 4 ± 1°C.....	46
Tabela 5 – Diferença de cor (ΔE^*) dos leites fermentados ao longo do armazenamento (4 ± 1°C) com relação ao dia inicial de preparo.....	46
Tabela 6 – Diferença de cor (ΔE^*) dos leites fermentados adicionados de extrato de hibisco ou extrato encapsulado ao longo do armazenamento com relação ao leite fermentado controle.....	47
Tabela 7 – Capacidade de inibição do radical DPPH pelos leites fermentados produzidos, ao longo do tempo de armazenamento (expresso em % de inibição) a 4 ± 1 °C.	48
Tabela 8 – Resultados da análise de atividade antioxidante pelo método FRAP para os leites fermentados ao longo do tempo de armazenamento,	50
Tabela 9 – Parâmetros de textura instrumental (firmeza, coesividade, viscosidade e consistência) dos leites fermentados ao longo do tempo de armazenamento.	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. LEITE FERMENTADO	14
3.2. <i>Lactobacillus helveticus</i>	15
3.3. <i>Streptococcus thermophilus</i>	17
3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
3.5. HIBISCO	19
3.5.1. Antocianinas	20
3.6. ENCAPSULAÇÃO	21
3.7. PRODUTOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE EXTRATO DE HIBISCO ...	23
4. METODOLOGIA	26
4.1. MATERIAL	26
4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE HIBISCO	27
4.2.1. Rendimento dos extratos.....	27
4.2.2. Análise termogravimétrica (TGA) e diferencial calorimetria de varredura (DSC)	
28	
4.3. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO LEITE FERMENTADO	28
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO LEITE FERMENTADO.....	30
4.4.1. Análise da composição proximal e das propriedades físico químicas .	30
4.4.2. Contagem das Bactérias ácido lácticas.....	31
4.4.3. Análise de cor	31
4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.5.1. Determinação de atividade antioxidante por DPPH.....	32
4.5.2. Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)	32

4.6. TEXTURA	33
4.7. ANÁLISE DE PERFIL PROTÉICO POR ELETROFORESE SDS-PAGE	33
4.8. POTENCIAL CORANTE DOS EXTRATOS	34
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS	35
5.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E DIFERENCIAL CALORIMETRIA DE VARREDURA (DSC) DAS MICROCÁPSULAS.....	36
5.3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO	38
5.4. A COMPOSIÇÃO PROXIMAL E MICROBIOLÓGICAS DOS LEITES FERMENTADOS.....	40
5.5. ESTABILIDADE FERMENTATIVA AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO	41
5.6. ESTUDO DA ESTABILIDADE DA COR	43
5.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
5.7.1. Atividade antioxidante por DPPH.....	48
5.7.2. Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)	49
5.8. TEXTURA	50
5.9. ANÁLISE DE PERFIL PROTÉICO.....	52
5.10. POTENCIAL CORANTE DOS EXTRATOS DE HIBISCO	54
6. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A preocupação mundial com a saúde tem aumentado a demanda por produtos considerados saudáveis nos últimos anos. O consumo de alimentos lácteos funcionais expandiu-se rapidamente pela sua qualidade nutricional e pelas proteínas de elevado valor biológico. Dentre esses produtos lácteos, destaca-se o leite fermentado, sendo um dos mais populares do mundo (BORGONNOVI, 2018; CAPITANI *et al.*, 2014).

Uma característica intrínseca do leite fermentado é a fermentação por diferentes bactérias ácidos lácticas que possuem sistemas proteolíticos que contribuem para o bom desenvolvimento no leite e na liberação de peptídeos potencialmente bioativos através da ação conjunta de proteinases e peptidases (SAH *et al.*, 2014).

Os *Lactobacillus helveticus* são de grande interesse biotecnológico pela alta atividade proteolítica liberando peptídeos a partir das proteínas do leite. Suas cepas são capazes de liberar compostos bioativos com diferentes propriedades, como anticancerígenos e antioxidantes (ELFAHRI *et al.*, 2016). A associação de outros tipos de culturas lácticas contribui com o aprimoramento de propriedades tecnológicas e características sensoriais, entre eles o mais usual o *Streptococcus thermophilus*, uma cultura láctica frequentemente utilizada na produção de leite fermentado devido a sua imensa contribuição no sabor e na textura (NASCIMENTO, 2017).

As plantas podem ser fontes naturais de compostos bioativos com diversas aplicações nos alimentos (BEZERRA *et al.*, 2017). Nesse contexto, a flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) se destaca pelas suas propriedades antioxidantes e, sua capacidade corante. Sua cor está relacionada ao teor de antocianinas, pigmentos naturais solúveis em água, que está sendo bastante explorado como potencial corante natural em alimentos (ARAÚZ, 2017). Entretanto, sua eficácia depende da preservação da estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos. Por essa razão uma alternativa promissora é a encapsulação, que é uma tecnologia que consiste na formação de estruturas que promovam a proteção, veiculação e liberação controlada do composto de interesse (GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019; MOURA, 2018)

Portanto, o objetivo do trabalho foi elaborar um leite fermentado por *L. helveticus* associado ou não por *S. thermophilus* adicionado de extrato de hibisco e

avaliar sua capacidade proteolítica durante a fermentação e estocagem, bem como determinar sua atividade antioxidante e o potencial corante do extrato adicionado.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar um leite fermentado com *L. helveticus* associado ou não com *S. thermophilus*, adicionado de extrato de hibisco encapsulado e avaliar as características físico-química, cor, atividade antioxidante e perfil proteolítico durante o período de armazenamento sob refrigeração.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Obter extrato de hibisco seguido de encapsulação e determinar o rendimento e caracterizar fisicamente a estrutura das microcápsulas;
- Elaborar um leite fermentado com *L. helveticus* associado ou não com a bactéria ácido láctica *S. thermophilus*, determinar a composição proximal e contagem total das bactérias ácido lácticas;
- Avaliar as características físico-químicas, a cor, a atividade antioxidante, textura e perfil proteico dos leites fermentados pelas culturas lácticas em estudo adicionados de extrato de hibisco encapsulado ou não ao longo dos 30 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C;
- Avaliar o potencial corante do extrato de hibisco encapsulado ou não nas proporções de 1,0; 2,0; 2,5 e 3,0% v/v.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. LEITE FERMENTADO

As razões para o processo de fermentação do leite são variadas, destacando-se como principal função a preservação de um alimento altamente perecível e nutricional. Dentre os diversos produtos lácteos obtidos por esse processo, o leite fermentado apresenta destaque comercial e popularidade pela tradição, características sensoriais e sua associação a produtos saudáveis (LAW, 1997).

Conforme a legislação brasileira entende-se por leites fermentados os produtos obtidos pela coagulação e diminuição do pH do leite fluído, ou em pó reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes devem ser viáveis, ativos e abundantes durante todo o prazo de validade do produto final (BRASIL, 2007).

Os métodos de fabricação variam significativamente conforme o país de origem, as matérias-primas utilizadas e a formulação. Mas basicamente consiste nas etapas de recepção e tratamento do leite, inoculação da cultura específica seguida da incubação, resfriamento e adição ou não de ingredientes como pré mistura de frutas e aromas, embalagem e armazenamento refrigerado (STAFF, 1998).

O leite, utilizado na fabricação dos fermentados, deve ser cuidadosamente avaliado para garantir a completa ausência de resíduos de antibióticos e detergentes que podem desacelerar a fermentação láctica e com consequência resultar em uma baixa acidificação. Outro fator importante avaliado, é a qualidade microbiológica que deve ser excelente em relação a estimativa de microrganismos e esporos resistentes ao calor que podem estar associados a presença de enzimas capazes de produzir alterações sensoriais e texturais (BAGLIO, 2014).

O leite cru não deve ser destinado diretamente a pasteurização. Primeiramente é necessário realizar o processo de centrifugação para remoção de substâncias físicas estranhas e a homogeneização para ruptura dos glóbulos de gordura do leite evitando a formação de cremes durante a etapa de fermentação. Então, procede-se com o tratamento térmico com finalidade de eliminar agentes contaminantes e patógenos (BAGLIO, 2014).

O processo fermentativo, geralmente, ocorre pela ação das bactérias ácido lácticas, pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Streptococcus e *Lactobacillus*. O leite pasteurizado é resfriado a temperatura de incubação da cultura, variando entre 40-45 °C por um período de aproximadamente 2,5 a 4 horas. Embora, em alguns casos, o período de incubação pode ser prolongado devido a temperatura ser mais baixa proporcionando formação de géis mais viscosos e menos propensos à sinérese do soro de leite ou defeitos como grânulos no processo de agitação. Por fim, o leite fermentado é resfriado controlando a atividade metabólica da cultura e podendo ser adicionado de frutas e/ou aroma (TAMIME, 2006).

Outras espécies bacterianas, como as dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, estão sendo aplicadas no processo de fabricação de leites fermentados devido aos benefícios à saúde dos consumidores e a contribuição para novos perfis de sabor (TAMIME, 2006). O interesse dos consumidores pelos leites fermentados têm crescido devido ao seu teor de proteínas e aos ingredientes benéficos como probióticos (RENTERO, 2018). Institutos de pesquisas indicam que a preocupação com a saúde e o bem estar deve continuar direcionando os consumidores a compra de alimentos funcionais (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2019). Os consumidores também estão cada vez mais conscientes e preocupados com os ingredientes dos alimentos que consomem, demonstrando interesse por alimentos com menos aditivos (TETRA PAK, 2019). Nesse contexto, produtos lácteos apresentam vantagens, pela quantidade de nutrientes e, em sua maioria, pelo preço acessível à população (ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO, 2017).

3.2. *Lactobacillus helveticus*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* destacam-se entre as espécies de bactérias ácido lácticas mais utilizadas como probióticas, juntamente com as *Bifidobacterium*. Essas culturas são aceitas como seguras para o consumo devido ao histórico de uso em produtos fermentados convencionais (FORSYTHE, 2013).

O gênero *Lactobacillus* compreende 106 espécies descritas, e conforme suas características fermentativas podem ser divididas em homofermentativos, resultando primordialmente em ácido láctico, ou heterofermentativas, resultando em ácido láctico, CO₂ e outros produtos de fermentação (NASCIMENTO, 2017; SILVA, *et al.*, 2017). Entre as espécies destaca-se o *L. helveticus*, pertencente à flora intestinal humana, com propriedades tecnológicas importantes na produção de lácteos fermentados. Estudos realizados com isolados desta espécie possuem atividade proteolítica em

comparação com outras bactérias ácido lácticas, favorecendo a liberação de peptídeos biologicamente ativos (FARNWORTH, 2003). Portanto, esta espécie vem sendo amplamente utilizadas em estudos de laticínios devido ao seu rápido crescimento no leite e sua capacidade de crescer sob estresse ácido (ELFAHRI *et al.*, 2016).

Durante o processo fermentativo do leite, apenas 1-2% das proteínas sofrem proteólise e o substrato principal são as caseínas. Essa atividade fornece às células das bactérias ácido lácticas aminoácidos essenciais para o seu crescimento no leite, além de também contribuir para o desenvolvimento das propriedades sensoriais dos produtos lácteos. Os *L. helveticus* apresentam auxotrofias de múltiplos aminoácidos, e para garantir suas necessidades nutricionais quando cultivado em leite apresenta uma alta atividade proteolítica capaz de produzir peptídeos curtos e liberar aminoácidos, por isso destaca-se entre a maioria dos lactobacilos (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013; SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006).

O sistema *L. helveticus* é conhecido por produzir abundantes enzimas proteolíticas intracelulares, incluindo proteinases de envelope celular (CEP), endopeptidases, aminopeptidases e X-prolil dipeptidil aminopeptidase (PepX) (NAMDARI; NEJATI, 2016). A atividade proteolítica do *L. helveticus* ocorre através das proteinases que inicialmente hidrolisam as caseínas em grandes peptídeos, as peptidases (intracelulares) que degradam esses peptídeos em pequenas peptídeos e aminoácidos essenciais, e as proteínas de transporte específicas que realizam o transporte desses através da membrana citoplasmática (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

O leite fermentado por cepas de *L. helveticus* apresenta a capacidade de liberar compostos bioativos capazes de exercer importantes propriedades multifuncionais, como por exemplo atividades antioxidantes e anticâncer. As características e atividades desses compostos demonstraram ser altamente dependentes da cepa e do tempo de fermentação (ELFAHRI *et al.*, 2016). A revisão de Griffiths e Tellez (2013) descreve, mais especificamente os sistemas proteolíticos do *L. helveticus* relatando que vários peptídeos com funções fisiológicas, como peptídeos de ligação mineral, imunoestimulantes, antimicrobianos, opióides, e anti-hipertensivos foram isolados de produtos fermentados com *L. helveticus*.

3.3. *Streptococcus thermophilus*

O *Streptococcus thermophilus* são amplamente utilizados na produção de iogurtes, leites fermentados e queijos. Sua morfologia é esférica ou ovoide e geralmente dispostos em cadeia curta. Anaeróbicos facultativos e crescem rapidamente em leite a 45 °C (SILVA *et al.*, 2017). Apresentam função bioajustadora em processos fermentativos na presença de bactérias probióticas que tem crescimento lento no leite (SILVA; DIAS, 2021).

S. thermophilus é normalmente utilizado como cultura inicial para produção de iogurte, juntamente com o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, outras culturas podem ser adicionadas como probióticas, mas não são necessárias. (FARIAS *et al.*, 2016; TAMIME, 2005). O *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* apresentam uma relação simbiótica, os lactobacilos estimulam o crescimento do *S. thermophilus* pela liberação de aminoácidos e peptídeos das proteínas do leite, permitindo que ele cresça rapidamente na fase inicial da fermentação, e em troca produz ácido fórmico e CO₂, diminuindo o pH do meio e beneficiando os lactobacilos (FARNWORTH, 2003). A relação sinérgica das culturas proporciona melhores propriedades tecnológicas; ambas as espécies crescem rapidamente e metabolizam ativamente lactose em ácido láctico completando o processo de fermentação em menor tempo (TAMIME, 2006)

Muitas bactérias do ácido láctico são conhecidas por produzir exopolissacarídeos de alto peso molecular (EPS) durante a fermentação do leite. O EPS secretado pelo *S. thermophilus* tem atraído crescente atenção por melhorar as propriedades físicas de produtos lácteos, por ele ser uma bactéria comumente utilizada na produção de iogurtes. Esses exopolissacarídeos mostraram a capacidade de melhorar as propriedades reológicas de leites fermentados, e poderiam ser utilizados como substituto a estabilizantes comerciais. Entretanto, a aplicação do EPS ainda é limitada devido ao baixo rendimento produtivo e o mecanismo de funções pouco claros (CAO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2018).

Estudos como o de Uriot *et al.* (2017) demonstram o potencial do *S. thermophilus* como probiótico promissor. Embora a própria cepa bacteriana não sobreviva ao trato digestivo humano exibe efeitos benéficos para saúde, como alívio da intolerância a lactose, prevenção de gastrite e prevenção de diarreia infecciosa. Seu modo de ação ocorre através da produção de compostos antimicrobianos, como

as termofilinas, e por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e sua capacidade de aumentar a função da barreira epitelial.

3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os leites fermentados são alimentos com elevada capacidade antioxidante. O leite, devido às suas proteínas, principalmente a β e κ -caseínas, pode ser um substrato único para liberação de peptídeos bioativos por meio da fermentação de bactérias ácido lácticas. Compostos bioativos derivados das proteínas do leite, além da sua importância nutricional, estão associados a atividade biológicas significativas, como ação antioxidante (ELFAHRI *et al.*, 2016; NAMDARI; NEJATI, 2016).

O radical livre é um átomo ou grupo de átomos que possuem um ou mais elétrons não emparelhados. Quando produzidos a partir das mitocôndrias, os radicais de oxigênio são envolvidos em reações enzimáticas essenciais para os processos metabólicos, mas quando produzidos no organismo resultam na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem não ser adequadamente controlados devido à baixa disponibilidade de antioxidantes, sendo responsáveis pelo estresse oxidativo afetando adversamente as células e os tecidos do corpo (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

Os danos celulares podem ser efetivamente neutralizados pelos antioxidantes, moléculas que interagem com os radicais livres através de reações de transferência de elétrons (NIMSE; PAL, 2015). Esses compostos antioxidantes podem ser constantemente produzidos pelo metabolismo do corpo ou obtidos a partir dos alimentos, ou ainda de forma sintetizada; sendo essenciais para prevenção e combate de vários tipos de doenças relacionadas com as atividades dos radicais livres (ANTUNES, 2017).

A oxidação pode afetar também a qualidade dos alimentos, provocando alterações nutricionais e sensoriais, além de reduzir a vida útil do produto (HERNÁNDEZ-LEDESMA; AMIGO, 2004). Muitas reações de oxidação envolvem componentes alimentares como carboidratos, proteínas e lipídeos, entretanto, os carboidratos são menos suscetíveis ao processo oxidativo (SAH *et al.*, 2017).

Com relação ao seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos atuam quebrando e removendo os radicais livres através da conversão dos compostos

oxidativos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os antioxidantes não enzimáticos são de dois tipos, naturais e sintéticos, e agem interrompendo as reações em cadeia dos radicais livres (NIMSE; PAL, 2015).

Os antioxidantes naturais tem se estendido para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal que podem possuir atividade antioxidante significativa (DAMASCENO *et al.*, 2016; NOVAES *et al.*, 2014). Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados, mas apesar dos seus benefícios o seu uso tem sido restringido devido ao favorecimento de efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Por esses efeitos adversos causados, o uso de antioxidantes naturais tem sido estimulado, tais como catequinas, tocoferóis, ácido ascórbico, ácido rosmarínico e vários extratos fenólicos de plantas.

Peptídeos derivados de proteínas do leite são capazes de eliminar os radicais livres. As bactérias ácido lácticas possuem enzimas proteolíticas que contribuem para produção dos peptídeos bioativos. Este mecanismo varia conforme o microrganismo, que hidrolisam as proteínas do leite em diferentes níveis (ELFAHRI *et al.*, 2016). As cepas de *L. helveticus* possuem uma alta atividade proteolítica e peptidolítica em comparação com outras bactérias ácido lácticas comerciais, sendo capazes de liberar peptídeos com diversas funções bioativas (ELFAHRI; DONKOR; VASILJEVIC, 2014).

Namdari, Nejati (2016) avaliaram a capacidade de cepas isoladas de *L. helveticus* de produzir leite fermentado enriquecido em peptídeos antioxidantes, demonstrando que todas as amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante consideravelmente forte. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Elfahri *et al.* (2016) relatando que as quatro cepas avaliadas apresentaram bom desenvolvimento no leite desnatado sob condições ácidas resultando na liberação de compostos antioxidantes.

3.5. HIBISCO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) é proveniente da família Malvaceae, cultivada em regiões tropicais e subtropicais. É caracterizado como um arbusto perene que atinge cerca de 2 a 3 metros de altura, sendo cultivado devido ao interesse em suas folhas, cálices, sementes e fibras (CARVALHO, 2018).

É uma importante planta medicinal fonte de cálcio, magnésio, ferro, vitaminas A, B1 e C, fitoquímicos, ácido tartárico, málico, cítrico e hibístico, fitosteróis como o

sitosterol, campesterol, ergosterol, estigmasterol, fibras alimentares, além das antocianinas, considerada como um dos principais constituintes biologicamente ativos (BARBOSA *et al.*, 2020; CARVALHO, 2018).

Devido aos seus principais componentes, o hibisco vem atraindo a atenção da indústria de alimentos pela possibilidade de aplicação desse vegetal como matéria-prima para elaboração de novos produtos, podendo ser utilizado como fibra dietética e corante (ALVES; DOMINGUES, 2017; MOURA, 2018). Além disso, apresenta-se como uma planta com boa perspectiva por ser rica em compostos fenólicos e com alta propriedade antioxidante (ABREU *et al.*, 2019).

No hibisco, conforme o estudo realizado por Tsai *et al.* (2002), a antocianina é o componente responsável por 51% da ação antioxidante do extrato das pétalas. Os antioxidantes presentes nos vegetais podem ser mais eficientes e menos custosos que suplementos sintéticos para proteger o corpo contra danos oxidativos decorrentes do acúmulo de radicais livres em nosso organismo (SILVA; WIEST; CARVALHO, 2016).

3.5.1. Antocianinas

Entre os pigmentos naturais encontram-se as antocianinas, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta ou laranja exibida por flores e frutos. São substâncias pertencente à classe dos flavonoides, constituídas por uma aglicona ou antocianidina; que em seu estado natural é glicosilada por um ou mais açúcares (MELO *et al.*, 2020; ZAPATA *et al.*, 2016).

Os pigmentos sintéticos são aditivos sem valor nutritivo, adicionados aos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor. Quando comparados aos naturais apresentam um menor custo de produção e maior estabilidade (PAIVA, 2018). No entanto, estudos científicos demonstram que a maioria deles desenvolvem efeitos colaterais evidentes, sinais de toxicidade a curto e longo prazo e possíveis efeitos cancerígenos, por isso os pigmentos naturais são uma alternativa para substituí-los, podendo oferecer maior segurança e proporcionar importantes propriedades como atividade antioxidante e conservantes (MARTINS *et al.*, 2016).

O aproveitamento das antocianinas como corantes naturais para uso na indústria de alimentos está sendo bastante explorado devido sua alta solubilidade em água, seus benefícios à saúde e sua coloração intensa, principalmente em tons

próximos ao vermelho. Suas propriedades agregam valor ao produto final, além de garantir sua qualidade; porém, sua aplicabilidade pode ser limitante devido à sua baixa estabilidade (ARAÚJO, 2019). Uma alternativa para melhorar sua estabilidade e biodisponibilidade é a utilização da técnica de encapsulação (BRAGA *et al.*, 2013).

3.6. ENCAPSULAÇÃO

A ingestão de compostos bioativos naturais, tais como as antocianinas, é de grande interesse quando se trata de alimentos que visam garantir benefícios à saúde. Contudo existem dificuldades associadas à instabilidade desses compostos frente a variações de temperatura, pH, luminosidade, etc., que podem ocorrer tanto no processamento de alimentos quanto em seu armazenamento. Além disso, muitos compostos apresentam baixa biodisponibilidade oral. Assim, as tecnologias de encapsulação representam um conceito promissor para contornar tais problemas (MOURA *et al.*, 2018).

A técnica de encapsulação tem a finalidade de empacotar compostos de interesse através de membranas, isolando o núcleo do meio externo com objetivo de reduzir sua volatilidade e reatividade, mascarar compostos de sabor indesejável, promover melhor solubilidade dos componentes, controlar sua liberação, retardar alterações de cor, perda do valor nutricional, funcionalidade, além de proporcionar o aumentando da sua estabilidade sob condições ambientais adversas (MACHADO, 2018).

Existem diversas técnicas para produção de sistemas encapsulantes. Para a escolha do método a ser utilizado, características particulares como tamanho da partícula requerida e propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, devem ser consideradas (CASSOL, 2018).

O extrato de hibisco já foi encapsulado por diferentes técnicas, como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 – Técnicas utilizadas para a encapsulação de extrato de hibisco.

TÉCNICA	ENCAPSULANTE	SURFACTANTE	REFERÊNCIA
Gelificação iônica de dupla emulsão	Pectina	Polirricinoleato de poliglicerol oleosa (fase)	Moura <i>et al.</i> (2018)
Lipossomas	Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico	-	Dias <i>et al.</i> (2020)
<i>Spray dryer</i>	Amido modificado (extrusado)	-	Gómez-Aldapa <i>et al.</i> (2019)
Biossorção passiva	Células de levedura	-	Nguyen <i>et al.</i> (2018)
Precipitação com Anti-solvente	Nanopartículas de Zeína	-	Calliari <i>et al.</i> (2020)
Secagem a vácuo	Goma arábica	-	Bandara; Mahendran (2020)
<i>Spray dryer</i>	Maltodextrina e Goma arábica	-	Navidad-Murrieta <i>et al.</i> (2020)
<i>Spray dryer</i>	Goma algaroba	-	Ochoa-Velasco <i>et al.</i> (2017)
<i>Spray dryer</i> e Liofilização	Polidextrose e a proteína isolada do soro de leite	-	Cassol; Noreña (2021)

Fonte: Autoria própria (2022).

Uma alternativa aos processos convencionais de encapsulação é a aplicação da técnica de nanodispersão, ou dispersão sólida, que pode proporcionar vantagens por tratar-se de um método viável e econômico. Neste método, o composto bioativo e o polímero encapsulante são adicionados em um solvente comum que é evaporado completamente ao final do processo. Desta forma, para encapsular compostos para indústria alimentícia é necessário escolher solventes de baixa toxicidade e que possam ser facilmente removidos (SANTOS, 2018; SILVA, 2017a).

O material a ser utilizado como encapsulante deve ser selecionado em função das propriedades físicas e químicas do composto bioativo a ser revestido, da aplicação pretendida e do método utilizado para formação das partículas. Alguns compostos comumente utilizados como encapsulantes são os carboidratos, celuloses, gomas, lipídeos e proteínas (CASSOL, 2018).

O PVP (polivinilpirrolidona) é um polímero sintético biodegradável, biocompatível e atóxico, amplamente utilizado na produção de micro e nanopartículas como encapsulante. Sua propriedade anfifílica permite ser compatível com uma ampla faixa de substâncias com caráter hidrofílico e hidrofóbico. Além disso, o PVP possui cadeias volumosas, que impedem o contato entre as partículas dispersas, mantendo a estabilidade da dispersão. Tais características demonstram que o PVP é um

composto promissor para uso na técnica de nanodispersão (MACHADO, 2018; SANTOS, 2018).

Apesar de diversos estudos realizarem o encapsulamento do extrato de hibisco, não foram encontrados trabalhos na literatura científica sobre a aplicação da nanodispersão com a utilização do PVP como encapsulante. A técnica permite realizar a extração e a encapsulação de forma concomitante, reduzindo tempo e recursos como demonstrado no trabalho de Santos (2018), que teve o objetivo de extrair e encapsular simultaneamente curcuminóides presentes na *Curcuma longa* L. e avaliar sua viabilidade.

3.7. PRODUTOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE EXTRATO DE HIBISCO

A aplicação do extrato de hibisco em produtos lácteos já vem sendo estudada por diversos pesquisadores, como mostra o Quadro 2.

Quadro 2 – Estudos relativos a adição de extrato de hibisco em produtos lácteos.

(continua)

PRODUTO	FORMA DE ADIÇÃO DO EXTRATO	PRINCIPAIS RESULTADOS	REFERÊNCIA
logurte	Extrato aquoso de hibisco (2%, 4% e 8% v/v)	Testes <i>in vivo</i> demonstraram atividade imunomoduladora	Mahfudh; Hadi; Solechan (2021)
logurte fermentado com <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	Extrato aquoso de hibisco roxo (0,5%, 1%, 1,5% v/v)	Análise sensorial demonstrou maior aceitação para concentração de 1,5%	Noviatri; Setianingrum; Haskito (2020)
Leite fermentado com <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>B. adolescentis</i>	Extrato de hibisco concentrado (0,1%, 0,2%, 0,3% v/v)	Teste <i>in vivo</i> demonstraram efeitos hipoglicêmicos e hipolipemiantes	Su <i>et al.</i> (2018)
Leite fermentado com <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>B. adolescentis</i>	Extrato de hibisco concentrado por evaporação a vácuo e liofilizado (0,1%, 0,2%, 0,3% v/v)	Análises revelaram que adição de 0,3% pode desempenhar melhores propriedades reológicas, texturais e antioxidantes	Su <i>et al.</i> (2019)
Leite fermentado com <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	Extrato aquoso de hibisco (20 mL/L)	Análise demonstraram influência sobre o tempo de coagulação, sinérese e atividade de galactosidase	Iwalokun; Shittu (2007)

(conclusão)

iogurte	Extrato livre de hibisco (1,5 g/100 g); extrato de hibisco encapsulado por gotejamento (20 g/100 g); e extrato de hibisco encapsulado por atomização (20g/100 g)	Micropartículas obtidas por dupla emulsão seguida de gelificação proporcionou coloração e funcionalidade ao iogurte	Moura <i>et al.</i> (2019)
Sorvete	Extrato de hibisco encapsulado por secagem a vácuo (0,10%, 0,15%, 0,20% e 0,25% p/v)	Análises revelaram que adição de 0,1% é a melhor para manter a qualidade físico-químicas e sensoriais	Bandara; Mahendran (2020)
iogurte de leite de cabra fermentado com <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	Extrato de hibisco liofilizado (1% p/v)	Testes <i>in vitro</i> demonstraram potência antidiabética	Wihansah; Arief; Batubara (2018)
iogurte	Extrato aquoso de hibisco (concentração conforme o tratamento)	Combinação de 12,26% de concentrado de morango e 2,38% de extrato de hibisco maximiza os atributos do iogurte	Araúz (2017)

Fonte: Autoria própria (2022).

Mahfudh; Hadi; Solechan (2021), desenvolveram iogurte com diferentes concentrações de extrato de hibisco. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade fagocítica dos macrófagos, proliferação de linfócitos e produção de citocinas. De acordo com os resultados, os iogurtes fortificados apresentaram valores satisfatórios como imunomoduladores.

Noviatri; Setianingrum; Haskito (2020), determinaram o potencial do extrato do hibisco roxo para agregar valor sensorial ao iogurte. Para isso, foi realizada avaliação de iogurtes adicionados de 0,5%, 1% e 1,5% v/v de extrato de hibisco, por meio do teste de escala hedônica, analisando parâmetros de cor, sabor, aroma, textura e valor geral, com 30 provadores. Os resultados demonstraram que a concentração de 1,5% teve maior aceitação por apresentar coloração mais escura em relação as demais formulações.

Su *et al.* (2018) identificaram a atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica contra STZ e diabetes tipo 2 dos leites fermentados com adição de extratos em diferentes níveis. Foi possível concluir que o extrato melhorou as características físicas, químicas e microbiológicas do leite, além de apresentar aceitação sensorial, indicando a viabilidade comercial.

Su *et al.* (2019), também desenvolveram leites fermentados com adição de extratos em diferentes níveis, com objetivo de avaliar o impacto na característica

reológica, de textura e atividade antioxidante. Os resultados demonstraram que a incorporação dos extratos modificou as propriedades de textura e reológica, bem como o sabor. Além disso, o leite com maiores concentrações de extrato exibiu maiores atividades antioxidantes. Concluindo que o extrato apresenta potencial promissor na indústria de alimentos.

No estudo de Iwalokun, Shittu (2007), foi avaliado o efeito dos extratos de hibisco incorporados antes e depois da fermentação de iogurtes de leite desnatados; e comparados com iogurtes tradicionais e iogurtes sabor morango. Os dados demonstraram que o extrato resultou em reduções significativas sobre o tempo de coagulação, sinérese e atividade de galactosidase. Entretanto, em relação a análise sensorial os resultados não foram muito satisfatórios, identificando que o iogurte sabor morango apresentou maior aceitabilidade quando comparado com o adicionado de hibisco.

Moura *et al.* (2019) analisaram aplicação de micropartículas de hibiscos em iogurte. O objetivo do estudo foi realizar encapsulamento utilizando dupla emulsão seguida de gelificação iônica e a técnica de atomização, determinar a composição centesimal do fermentado, e os compostos fenólicos, antocianinas totais, atividade antioxidante, coloração e morfologia, e teste de aceitabilidade de aparência sensorial. Com os resultados, foi possível concluir que a encapsulação pela técnica de atomização apresentou alta aceitabilidade e aparência, enquanto o encapsulamento utilizando dupla emulsão seguida da gelificação iônica apresentou viabilidade técnica, conferindo cor e funcionalidade ao produto

Bandara, Mahendran (2020) analisou a viabilidade dos extratos de hibiscos encapsulados como corante natural em substituição aos corantes sintéticos em sorvetes. O estudo avaliou a adição de 0,015% de corante sintético em comparação com concentrações de 0,10%, 0,15%, 0,20% e 0,25% de extrato de hibisco encapsulado. Os dados demonstraram que o sorvete formulado com 0,10% apresentou melhores resultados, mantendo a qualidade físico-química e sensorial.

O estudo de Wihansah; Arief; Batubara (2018) teve como objetivo avaliar o potencial antidiabético e as características do iogurte probiótico de leite de cabra suplementado com extrato de hibiscos. O experimento comparou três formulações (iogurte, iogurte probiótico e iogurte probiótico com extrato de hibisco) durante o armazenamento refrigerado de 0, 5, 10 e 15 dias. Os resultados demonstram que o iogurte probiótico adicionado de extrato de hibisco teve maior potência antidiabética

em comparação com as outras formulações, resultando em 36,70% de inibição. Além disso, foi possível determinar que as características físicas, químicas e microbiológicas se mantiveram durante 15 dias de armazenamento.

Araúz (2017) realizou o preparo de 12 formulações de iogurte combinados de concentrado de morango e extrato de hibisco com o objetivo de avaliar o potencial do extrato para substituição de corantes sintéticos. Para isso, foi avaliado a coloração, estabilidade oxidativa, pH e sinérese das amostras. Os resultados demonstraram que a combinação de 12,28% e 2,38% de morango e extrato, respectivamente, otimiza a estabilidade oxidativa e os atributos tecnológicos do iogurte. É possível concluir também, que em relação a análise de cor, o aumento na concentração do extrato provoca mudanças significativas na coloração do iogurte, diferente do concentrado de morango, que não proporciona diferença.

Tendo em vista a revisão de literatura apresentada, nota-se que a produção do leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* combinado ou não com a bactéria ácido láctica *Streptococcus thermophilus* pode ser investigada em mais detalhes, ainda com a incorporação do extrato de hibisco encapsulado por dispersão sólida.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAL

Para o estudo foi utilizado leite em pó desnatado instantâneo (Molico, Nestlé), açúcar cristal (Usina Alto Alegre) constituído fundamentalmente por sacarose, cultura liofilizada de *Lactobacillus helveticus* Lyofast LH 091 (SACCO Brasil) e de *Streptococcus thermophilus* Granoferm M450 (Granolab do Brasil S/A), ambas adquiridas comercialmente pela Somarole comercial LTDA, e flor de hibisco desidratada, obtida no mercado municipal da cidade de Campo Mourão - PR. Polivinilpirrolidona (PVP, Mw = 40.000 g/mol, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) e o Tween 80 (P.A., Dinâmica, Indaiatuba, SP, BR) foram utilizados na encapsulação do extrato de hibisco. Os seguintes reagentes foram utilizados na avaliação da capacidade antioxidante dos leites fermentados: reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), álcool metílico (LabSynth, Diadema, BR), TPTZ (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), cloreto férrico (LabSynth, Diadema, BR) e acetato de sódio (Dinâmica, Indaiatuba, BR). Os meios de cultura M17 Agar Base

(HiMedia Laboratories LLC, Mumbai, Índia) e o Caldo MRS Lactobacillus (ION, Araucária, BR) foram utilizados na avaliação da viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento do leite fermentado.

4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE HIBISCO

O extrato de hibisco livre foi extraído a partir das flores de hibiscos desidratadas adicionadas em água destilada aquecida a 80 °C (2% p/v), sob homogeneização em Ultra-turrax (T25, IKA) por 15 min a 10.000 rpm com temperatura controlada, conforme a metodologia de Rasheed *et al.* (2018).

Para preparo do extrato encapsulado, foram aplicadas as metodologias descritas por Rasheed *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2017b) unindo as metodologias de extração e encapsulação. Assim, foram misturados à água, aquecida à 80 °C, as flores de hibiscos desidratados (2% p/v), o encapsulante PVP (0,5% p/v) e o surfactante Tween 80 (0,05% p/v). A mistura também permaneceu sob agitação em Ultra-turrax (T25, IKA) por 15 min a 10.000 rpm com temperatura controlada.

Após o processo, ambas misturas foram filtradas a vácuo e os extratos ou nanopartículas obtidas foram secos em estufa de circulação a 60°C. Finalmente, foram coletados, congelados e armazenados em freezer até o momento de aplicação.

4.2.1. Rendimento dos extratos

Para o cálculo do rendimento de extração e de extração/encapsulação, alíquotas de 5 mL de cada experimento, obtidas da solução após a filtração, foram colocadas em placas de Petri previamente pesadas em balança analítica. Após secagem em estufa de circulação a 60 °C até evaporação completa da água, as placas foram pesadas novamente para determinação do teor de sólidos secos (m_{ss} (g)). O cálculo do rendimento foi expresso em porcentagem e determinado através da Equação 1, onde V_{TS} (mL) refere-se ao volume total de solvente utilizado na extração, V_a (mL) é o volume da alíquota utilizada para o cálculo do rendimento, m_{si} (g) é a massa de sólidos inicial presente no processo (hibisco no caso da extração; hibisco, PVP e Tween 80 no caso da extração/encapsulação).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{ss} \times V_{TS}}{V_a \times m_{si}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.2. Análise termogravimétrica (TGA) e diferencial calorimetria de varredura (DSC)

As análises térmicas do extrato de hibisco livre e encapsulado, e mistura física de PVP e extrato de hibisco foram conduzidas utilizando um analisador térmico simultâneo (STA 6000, PerkinElmer). As amostras (~10 mg) foram acondicionadas em porta amostra de platina e submetidas ao aquecimento de 50 a 600 °C (10 °C.min⁻¹) sob atmosfera de nitrogênio (20 mL.min⁻¹).

4.3. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO LEITE FERMENTADO

Os leites fermentados foram elaborados conforme o fluxograma apresentado na Figura 1. Ambas as culturas, *Lactobacillus helveticus* (LH), e *Streptococcus thermophilus* (ST) foram diluídas em 1 litro de leite UHT, conforme a recomendação do fabricante.

A calda consistiu na reconstituição do leite em pó desnatado (14% (p/v) de sólidos totais) em água destilada, seguido de 7% (p/v) de sacarose, ambos foram homogeneizados até a completa diluição. A calda foi tratada termicamente a 90 °C por 5 minutos.

Figura 1 – Fluxograma de fabricação dos leites fermentados.



FONTE: Autoria própria (2022).

A base foi acondicionada em dois frascos com tampa, previamente esterilizados, e resfriadas até a temperatura de 42 °C. Cada uma recebeu diferentes fermentos lácticos (tratamentos): *Lactobacillus helveticus* (1% v/v) (LH), e a outra adicionada com *Streptococcus thermophilus* (1% v/v) e *Lactobacillus helveticus* (1% v/v) (LHST); as concentrações foram adicionadas conforme a recomendação do fabricante para volume da base processada. Os frascos foram colocados na estufa a 42 °C; e em intervalos de 1 hora foi realizado o acompanhamento da acidez titulável

de amostras em paralelo. O processo de fermentação foi interrompido quando o leite fermentado atingiu 0,6 gramas de ácido láctico por 100 gramas, limite mínimo exigido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007).

Após a fermentação, as caldas foram resfriadas até 4 ± 1 °C e mantidas por um período de 12 horas de armazenamento. Cada tratamento foi subdividido em: leite fermentado sem adição (LH ou LHST), leite fermentado adicionado da solução de extrato de hibisco livre (LHE_xL ou LHSTExL) e o terceiro adicionado da solução de extrato de hibisco encapsulado (LHE_xL ou LHSTExE). Para a adição dos extratos de hibiscos em leites fermentados, estes foram previamente diluídos em água destilada 0,2 g/mL (encapsulado) e 0,14 g/mL (livre). Estas proporções visaram adicionar o mesmo teor de extrato para os dois tratamentos. A concentração de extrato de hibisco diluída a ser adicionada ao leite fermentado foi de 0,09% (v/v).

A concentração de extrato de hibisco foi previamente calculada visando obter leites fermentados com 45 mg/100g. Conforme o Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada para proteínas, vitaminas e minerais (BRASIL, 2005). Como não há recomendação diária para hibisco como fonte de antioxidante, por isso, a quantidade adicionada foi conforme o valor recomendado de ingestão de vitamina C para adultos.

Os tratamentos foram acondicionados em frascos de 50 mL e armazenados a 4 ± 1 °C por um período de 30 dias.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO LEITE FERMENTADO

4.4.1. Análise da composição proximal e das propriedades físico químicas

Os leites fermentados (LH e LHST) recém elaborados foram caracterizados quanto à composição proximal. Foram realizadas análise de extrato seco total, cinzas, proteínas e lipídeos segundo os procedimentos descritos por AOAC (2003). Para determinação do extrato seco total foi utilizado o método de secagem em estufa a 105 °C; o resíduo mineral fixo (cinzas) por incineração em forno mufla a 550 °C; as proteínas pelo método de micro-Kjeldahl; o teor de lipídeos pelo método butirométrico de Gerber; e os carboidratos pela diferença entre os demais constituintes do fermentado.

A caracterização físico-química consistiu no monitoramento da evolução do pH e da acidez titulável de todos os tratamentos (LH, LHST, LHEx, LHSTEx, LHExE e LHSTExE) nos tempos de 1, 15 e 30 dias de estocagem a $(4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$. Estas análises foram realizadas segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2004). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.2. Contagem das Bactérias ácido lácticas

A contagem das BALs foi realizada segundo os procedimentos metodológicos descritos por Freixo (2011) com algumas modificações. Para determinação das bactérias viáveis dos leites fermentados foram utilizados meios seletivos para cada microrganismo adicionado. Na contagem do *L. helveticus* foi utilizado o meio MRS e para o *S. thermophilus*, o meio M17. Todo o material utilizado para a análise foi previamente esterilizado em autoclave, e as análises realizadas em câmara de fluxo laminar.

Para o preparo das amostras, foram diluídos 25 mL do leite fermentado em 225 mL de solução salina a 0,85%. Diluições seriadas foram realizadas e uma alíquota de 1 mL de cada diluição selecionada foi inoculada em profundidade no meio adequado. As placas foram incubadas em jarras contendo gerador de anaerobiose (PROBAC – Anaerobac) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. A análise foi realizada no 1º e 30º dia de armazenamento a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.3. Análise de cor

A análise de cor (L^* , a^* e b^*) foi realizada nos tempos 1, 15 e 30 dias de estocagem sob refrigeração utilizando o colorímetro portátil (Delta Color, Modelo Delta Vista, 450G). A diferença de cor (ΔE^*) de cada amostras durante o tempo de armazenamento com a cor determinada no dia inicial e o ΔE^* dos leites fermentados adicionados de extrato de hibisco ou extrato encapsulado ao longo do armazenamento com relação ao leite fermentado controle foram calculados conforme a Equação 2 (LEIMANN *et al.*, 2018).

$$\Delta E^* = \sqrt{[(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2]} \quad (2)$$

Onde: L_t^* , a_t^* e b_t^* são os parâmetros de cor para a amostra no tempo “t” (15 ou 30 dias de armazenamento) e L_0^* , a_0^* e b_0^* são os parâmetros de cor para a mesma amostra logo após o preparo (dia 0).

4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. Determinação de atividade antioxidante por DPPH

No período de 1, 15 e 30 dias de estocagem a 4 ± 1 °C foi avaliada a capacidade antioxidantes dos leites fermentados utilizando o método de captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) conforme o procedimento de Pires *et al.* (2017) com algumas modificações. As amostras foram preparadas em duplicatas, sendo realizada soluções com uma alíquota de 20 μ L do leite fermentado diluído em 280 μ L de solução de DPPH (32 μ g/mL), incubadas por 20 minutos na ausência de luz e centrifugadas por 10 minutos. Para a determinação, foram colocados os 300 μ L do sobrenadante em microplaca e realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda 517 nm no leitor automático de microplacas (Thermo Plate, modelo TP-reader). A capacidade sequestro de radicais livres (%) foi calculada pela Equação 3.

$$\%AAO = \frac{(Abs\ Controle\ DPPH - Abs\ Amostra) \times 100}{Abs\ Controle\ DPPH} \quad (1)$$

4.5.2. Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

No período de 1, 15 e 30 dias de estocagem a 4 ± 1 °C foi realizada a análise identificação dos compostos redutores de íons de ferro conforme descrito por Urrea-Victoria *et al.* (2016) com algumas modificações. As amostras foram preparadas em triplicata, sendo inicialmente preparado a solução do complexo férrico pela adição de 5 mL da solução TPTZ 10 Mm, 5 mL da solução de cloreto férrico 20 mM e 50 mL de tampão de acetato de sódio 0,3 M. O preparo do meio reacional foi realizado pela adição de 3000 μ L, 370 μ L de água destilada e 100 μ L de amostra. O branco foi preparado com a adição de 3000 μ L e 470 μ L de água destilada. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Por fim, foi realizado a leitura da absorbância em 595 nm no espectrofotômetro (Ocean Optics, Modelo USB-

650-UV-VIS). O potencial antioxidante de FRAP foram expressos como mmol equivalente de trolox por litro ($y = 0,0012.x + 0,0008$; $R^2 = 0,997$).

4.6. TEXTURA

A avaliação da textura de todos os tratamentos foi realizada nos tempos 1, 15 e 30 dias de estocagem a 4 ± 1 °C com o auxílio do TA.XT Texturômetro Express Stable Micro Systems com uma célula de carga de 10 kg. Para a análise, foram utilizadas células de retroextrusão com sonda de compressão de 35 mm de diâmetro. As amostras foram submetidas a compressão de 50% em profundidade com velocidade de 1 mm.s^{-1} em recipientes cilíndricos com 50 mm de diâmetro e 75 mm de altura, conforme a metodologia adaptada de Rojas *et al.* (2019). O parâmetro de firmeza foi obtido pela força máxima, o parâmetro de consistência foi calculado pela área sob a curva até a força máxima, o parâmetro de coesão foi obtido pela força máxima negativa e o parâmetro adesão foi obtido pela área sob a curva até a força máxima negativa (LIU; XU; GUO, 2007).

4.7. ANÁLISE DE PERFIL PROTÉICO POR ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método de Schägger e Von Jagow (1987) utilizando um gel de empilhamento a 6% (p/v) e um gel separador a 14% (p/v).

As amostras foram descongeladas em banho maria a 37°C, por 10 minutos. Foi feita a diluição de 20 µL da amostra (cada tratamento) em 20 µL de água destilada. O microtubo foi homogeneizado em aparelho Vortex e uma alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada em microtubo juntamente com 30 µL de Tampão de amostra (tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 0,0025 % (p/v) de azul de bromofenol) na proporção de 1:1 (v/v). O microtubo foi aquecido por 10 minutos a 100°C.

Após a solidificação do gel e retirada do pente foi feita a montagem da cuba de eletroforese de proteínas (Bio-Rad), acrescentando o tampão de corrida até o volume indicado na cuba. O pH do tampão de corrida foi corrigido para 8,3 ($\pm 0,2$). Volumes de 10 µL de amostras a 2 mg/mL de proteínas foram carregados no gel. A espessura do gel foi de 1 mm.

A separação de proteínas foi realizada a 80 V por 30 min seguido de 110 V por 90 min.

Após a corrida realizou-se a desmontagem do equipamento e retirada do gel com auxílio de uma espátula de plástico, o gel foi fixado com 12% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) por 20 min, corado com 0,1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 solubilizado em uma mistura de 50% (v/v) etanol e 2% (v/v) TCA por 1 h e descoradas por várias lavagens em água/metanol/ácido acético (7/2/1,v/v/v).

A conservação dos géis foi feita pela secagem dos mesmos entre duas folhas de papel celofane. A estimativa da massa molecular das proteínas foi feita usando marcador de massa molecular de proteína (6,5 a 200 kDa, Bio-Rad).

4.8. POTENCIAL CORANTE DOS EXTRATOS

Para determinação do potencial corante dos extratos, foram produzidas amostras do leite fermentado com a adição da solução de extrato de hibisco livre (0,14 g/mL) e a solução do extrato de hibisco encapsulado (0,2 g/mL). As soluções foram adicionadas em concentrações de 1,0%, 2,0%, -2,5% e 3,0% dos extratos e comparadas com a formulação controle sem adição do extrato de hibisco solubilizado. A análise de cor foi realizada utilizando o colorímetro portátil (Delta Color, Modelo Delta Vista, 450G). E a diferença de cor foi calculada com relação ao controle (sem adição de corante natural) com a Equação 2 no item 4.4.3. Os parâmetros de cor para cada amostra foram submetidos à conversão para o sistema RGB com auxílio de um conversor livre (NIX COLOR SENSOR, 2021) as células da Tabela de resultados foram pintadas com a coloração de cada leite fermentado.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

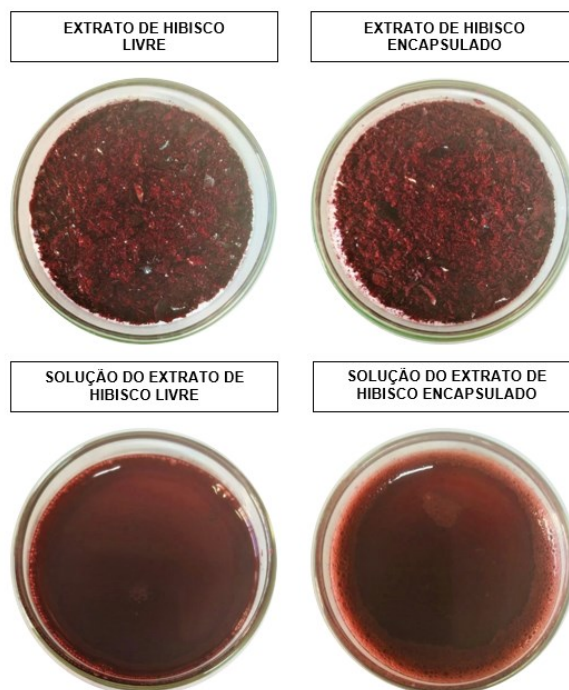
Os resultados de composição proximal , contagem das bactérias lácticas foram submetidos ao teste t-Student ($p < 0,05$). Os resultados de acidez titulável, pH, atividades antioxidantes, textura e da análise de cor foram submetidos à ANOVA com um nível de significância de 5% e, ao teste de Tukey utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS

Ao solubilizar em água, o extrato encapsulado apresentou menor intensidade na cor vermelha e mais translúcido comparado ao extrato livre (Figura 2). Após o processo de secagem foi possível determinar os rendimentos dos extratos. O rendimento médio do extrato de hibisco livre foi de $60,95\% \pm 3,75$ e do extrato de hibisco encapsulado foi de $67,15\% \pm 3,87$, rendimentos satisfatórios. Estatisticamente, os rendimentos apresentaram diferença significativa, que pode ser justificada pela adição do PVP e do TWEEN 80 para obtenção do extrato de hibisco encapsulado.

Figura 2 – Aparência dos extratos livre e encapsulado e suas soluções.



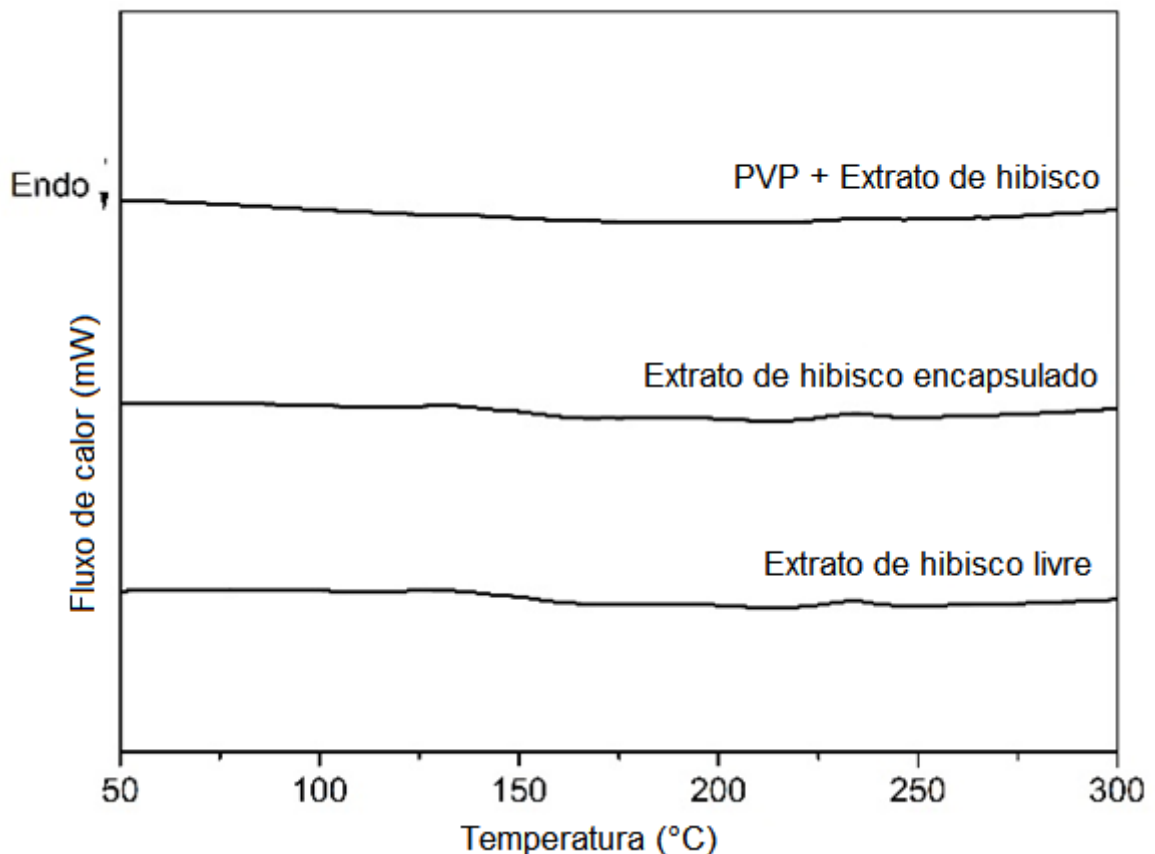
Fonte: Autoria própria (2022).

Jung, Joo (2013) em seu estudo sobre os efeitos do hibisco e do óleo de soja nas características de qualidade de hambúrguer de porco, determinou um rendimento de 38% para extratos aquosos de cálices de hibisco. É possível que o valor de rendimento determinado pelo autor tenha sido menor do que o do presente trabalho em função da não aplicação da agitação e da diferente temperatura utilizada no método de extração.

5.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E DIFERENCIAL CALORIMETRIA DE VARREDURA (DSC) DAS MICROCÁPSULAS

As curvas da análise térmica diferencial (DTA) das amostras de extrato de hibisco puro, extrato de hibisco encapsulado em PVP e a mistura física de PVP e extrato de hibisco livre são apresentadas na Figura 3. Não foram observados eventos térmicos entre 50 e 300 °C, sugerindo baixa cristalinidade dos materiais analisados.

Figura 3 – Análise térmica diferencial (DTA) do extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.

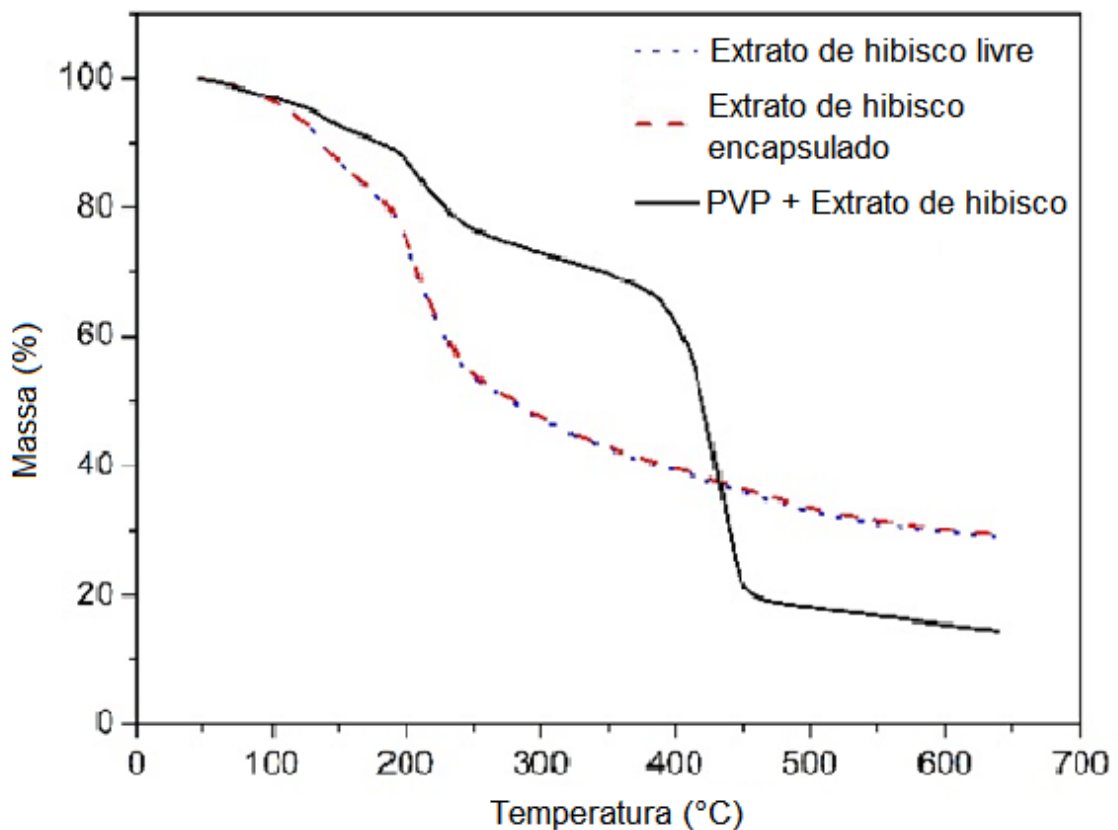


Fonte: Autoria própria (2022).

Os termogramas (TGA) das amostras de extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e a mistura física de PVP e extrato de hibisco são apresentados na Figura 4. Observa-se similaridade entre o comportamento térmico das amostras de extrato de hibisco puro e extrato de hibisco encapsulado. Ambas as amostras exibiram perda de massa de 5% a 115 °C, que poderia estar relacionada a perda de água e de compostos voláteis da amostra. A degradação dos compostos

fenólicos do extrato de hibisco, presente nas amostras de extrato puro e encapsulado, foi observada a 175 °C e a 250 °C, valores de acordo com o reportado na literatura (ABDELHAMEED; ROCHA; SILVA, 2021; CASSOL; NOREÑA, 2021; MOURTZINOS *et al.*, 2008), representando respectivas perdas de massa de 18% e 48%.

Figura 4 – Curvas termogravimétricas (TG) do extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.



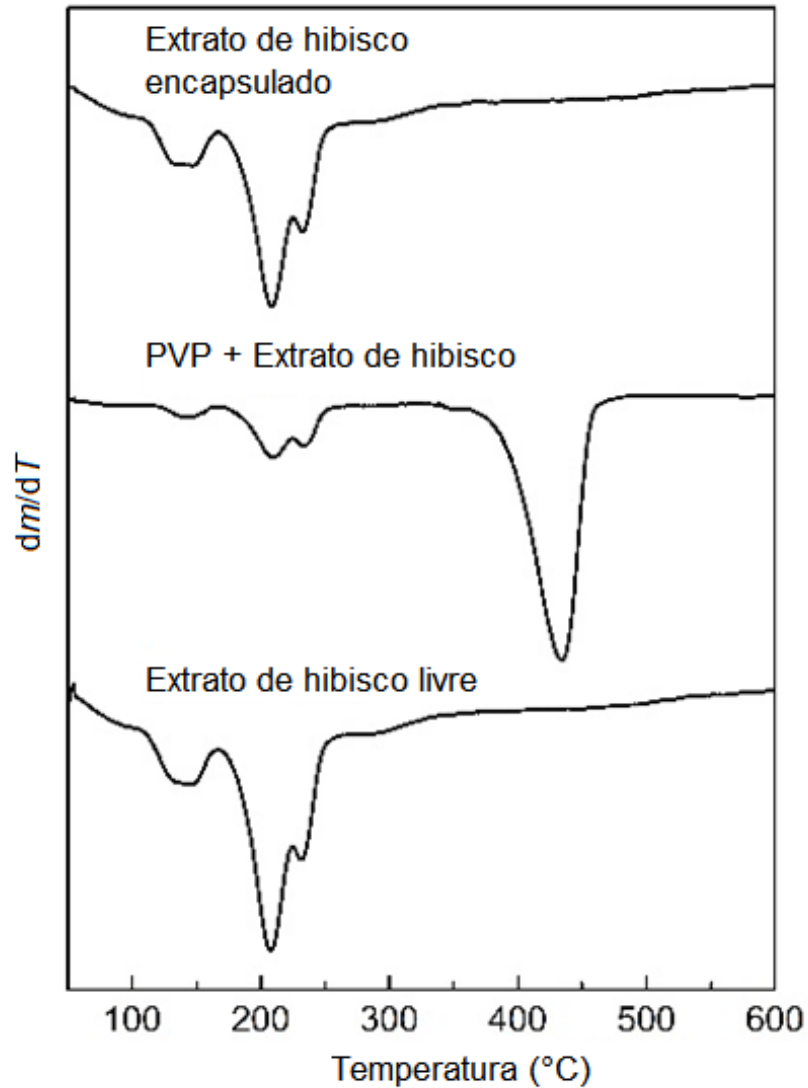
Fonte: Autoria própria (2022).

Já para a mistura física de extrato de hibisco e PVP, no termograma também foi observada uma perda de massa inicial de 5% a 115 °C, contudo, em seguida são observadas perdas de 10% a 175 °C e 24% a 250 °C, podendo estar relacionadas a degradação dos compostos fenólicos, conforme reportado anteriormente, além das perdas de 32% a 375 °C e de 82% a 465 °C, estas últimas relacionadas a degradação térmica do PVP (OCHAL *et al.*, 2010).

As curvas derivadas correspondentes (DTG) foram geradas e apresentadas na Figura 5. Assim, é possível evidenciar os eventos térmicos em dois picos principais para as amostras de extrato de hibisco puro e encapsulado: o primeiro entre 112 e 165 °C, correspondente aos eventos de evaporação de água e perda de compostos

voláteis e, o segundo, entre 175 e 250 °C, relacionado a degradação térmica dos compostos bioativos oriundos do extrato de hibisco, conforme discutido acima. Na amostra da mistura física dos materiais, além dos dois picos supracitados, observa-se um terceiro entre 375 e 465 °C, correspondente a degradação térmica do PVP.

Figura 5 – Curvas derivadas (DTG) para o extrato de hibisco livre, extrato de hibisco encapsulado em PVP e da mistura física de PVP e extrato de hibisco.



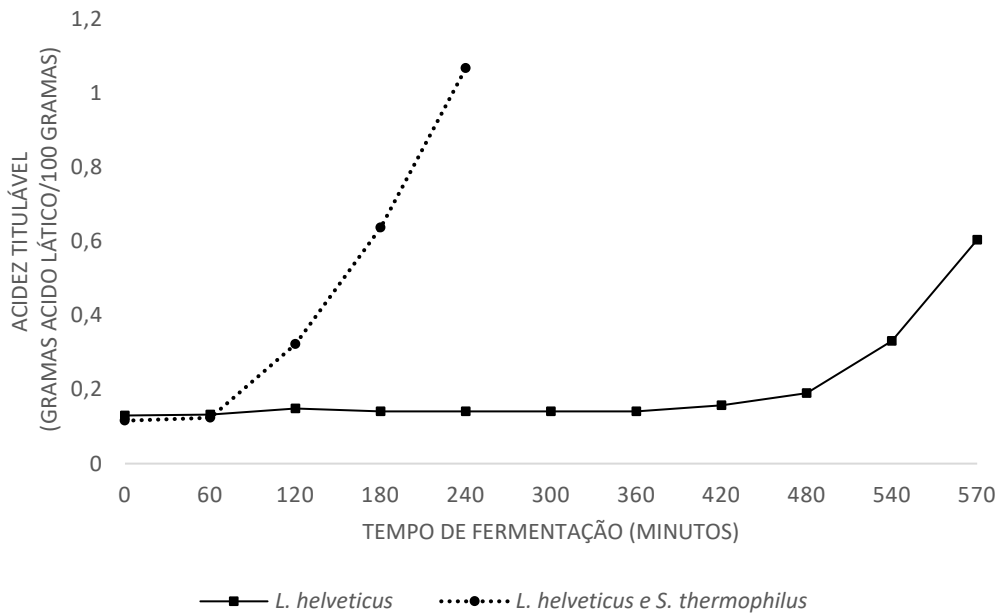
Fonte: Autoria própria (2022).

5.3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Durante o processo de fermentação foi possível observar diferença no perfil de acidificação entre as amostras do leite fermentado com *L. helveticus* adicionados ou não de *S. thermophilus*. Pode-se afirmar com os resultados obtidos e apresentados

na Figura 6 que o leite fermentado em co-cultura com *S. thermophilus* desenvolveu mais rapidamente a acidez no meio, atingindo o valor de 0,64 g de ácido lático/100 g de produto, durante a fermentação a 42 °C por 3 horas. No mesmo tempo, o leite fermentado com a cultura isolada de *L. helveticus* apresentou acidez de 0,14 g de ácido lático/100 g de produto.

Figura 6 – Acidez titulável durante o processo de fermentação



Fonte: Autoria própria (2022).

A fermentação do leite adicionado apenas com *L. helveticus* foi considerada lenta, com tempo de aproximadamente 9 horas e meia. Resultado semelhante foi observado no estudo de Champagne *et al.* (2009) quando comparou a acidificação com culturas puras e mistas de *S. thermophilus* ST5, *L. helveticus* R0052 e *B. longum* R0175 em leite e em bebida de soja. Os dados dos ensaios mostraram que culturas mistas resultaram em taxas de acidificação mais rápidas, em comparação aos mesmos microrganismos cultivados na forma de cultura pura. Evidenciando que a combinação adequada de culturas pode melhorar o desempenho tecnológico, resultando na aceleração do processo fermentativo.

5.4. A COMPOSIÇÃO PROXIMAL E MICROBIOLÓGICAS DOS LEITES FERMENTADOS

Os resultados da análise de composição proximal, bem como a contagem de microrganismos são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição proximal dos leites fermentados com *L. helveticus* adicionados ou não de *S. thermophilus* e contagem total de bactérias ácidos lácticas.

+	Leites fermentados	
	<i>S. thermophilus</i> e <i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>
Análises Físico-químicas		
Umidade (%)	80,33 ^a ± 1,22	79,94 ^a ± 0,57
Cinzas (%)	1,18 ^a ± 0,05	1,03 ^a ± 0,24
Proteína (%)	1,89 ^b ± 0,03	3,51 ^a ± 0,06
Lipídeos (%)	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
Carboidratos (%)	16,60 ^a ± 1,23	15,52 ^a ± 0,55
Análises Microbiológicas		
Contagem total bactérias ácido-lácticas (UFC/g)		
Dia 1	9,77 x 10 ⁹ Aa	1,65 x 10 ⁸ Ab
Dia 30	5,53 x 10 ⁹ Ba	1,50 x 10 ⁸ Ab

Fonte: Autoria própria (2021). ^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t -Student (p <0,05).

^{A,B}Médias na mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste t -Student (p <0,05), ao longo do tempo de armazenamento.

Com a realização das análises microbiológicas, é possível verificar que a amostra adicionada da co-cultura teve uma redução significativa na contagem de bactérias lácticas totais do dia 01 ao 30. Entretanto, durante o armazenamento refrigerado, ambas amostras do leite fermentado apresentaram contagem superiores a 10⁷ UFC/g, contagem mínima estabelecida pela legislação (BRASIL, 2007).

Para ambas as formulações a base inicial foi a mesma, porém o teor de proteína apresentou diferença significativa entre as amostras, que pode ser justificada pela viabilidade das bactérias durante o processo fermentativo; essas precisam de compostos orgânicos de nitrogênio para desenvolvimento, obtendo através da proteólise das caseínas do leite pela ação de enzimas proteolíticas (GÖSTA BYLUND, 2015).

O regulamento técnico do MAPA estabelece que os leites fermentados devem apresentar teor proteico de no mínimo 2,9%, com exceção de leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados. Neste estudo, somente o leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. helveticus* apresentou teor proteico inferior ao requerido pela legislação vigente, isto pode ser resultado da aparente fragilidade do gel e consequente heterogeneidade na aparência do produto.

Em relação à composição de lipídeos, os dois tratamentos não apresentaram teores detectáveis ao limite mínimo do método, permitindo classificá-los como leite fermentado desnatado. O seu baixo teor deve-se à utilização de apenas leite em pó desnatado para preparação dos fermentados.

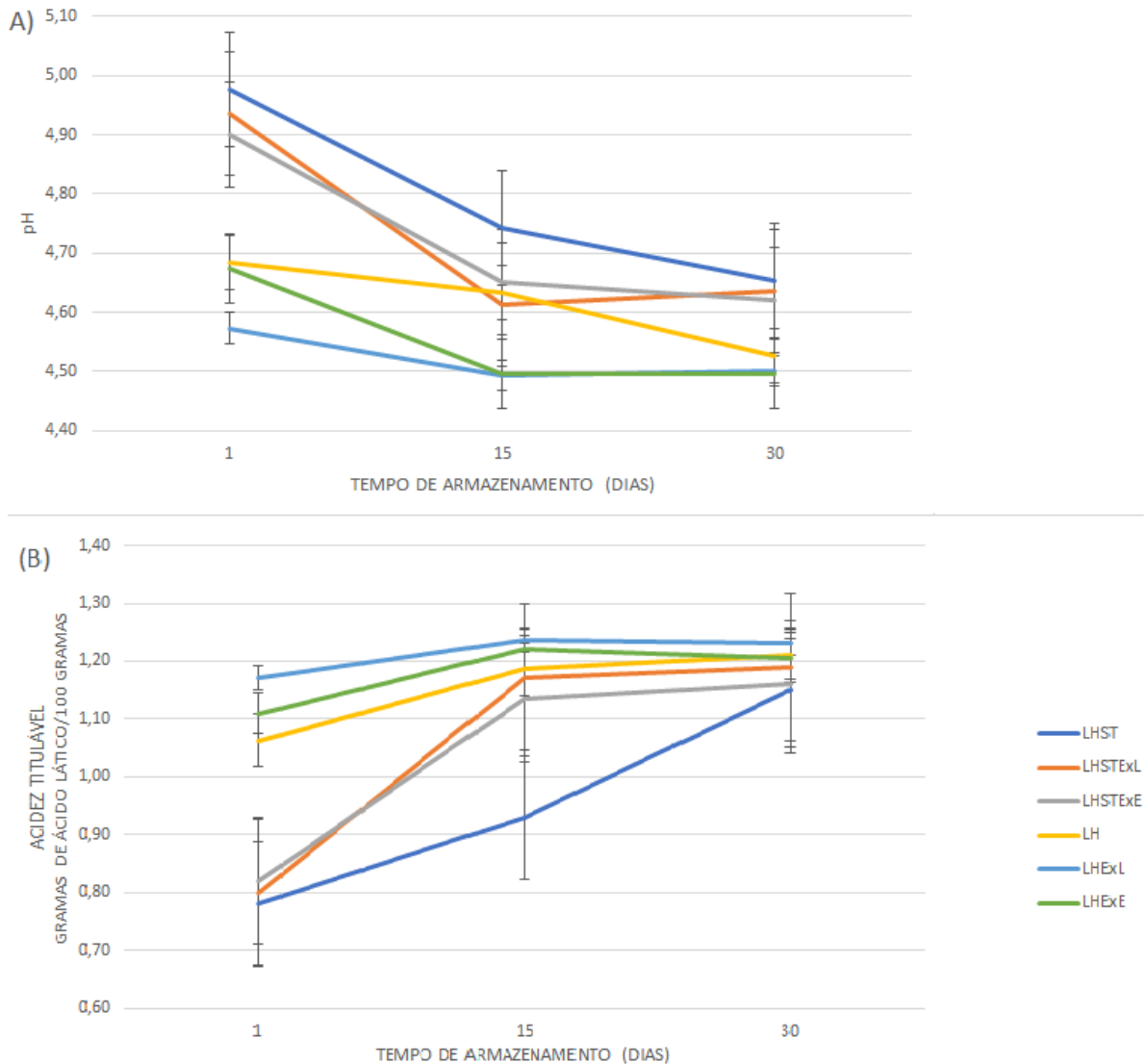
Para os parâmetros de umidade e cinzas não são estabelecidas recomendações mínimas, entretanto, é possível observar que os teores determinados para ambas as formulações foram estatisticamente iguais. Os valores foram próximos ao encontrado por Vanegas-Azuero, Gutiérrez (2018) na formulação do iogurte controle preparado com leite em pó desnatado reconstituído a 13% (p/p) em água destilada.

A amostra de leite fermentado com a cultura isolada de *L. helveticus* apresentou teor de carboidratos de $15,52 \pm 0,55$ e a amostra adicionada da co-cultura *S. thermophilus*, teor de $16,60 \pm 1,23$; valores elevados eram esperados e justificados pela adição de sacarose na formulação. Nascimento (2017) desenvolveu e analisou a composição proximal dos leites fermentados com *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, determinando um teor de carboidratos de 5,73 e 5,37%, respectivamente, valor inferior ao obtido no presente estudo, considerando que o autor avaliou em seu trabalho um leite fermentado sem adição do açúcar, sendo o carboidrato do leite a sua única fonte.

5.5. ESTABILIDADE FERMENTATIVA AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO

Foi avaliado o valor de acidez e pH dos leites fermentados durante o tempo de armazenamento refrigerado. Assim, conforme a Figura 7, é possível observar que os valores médios do pH e da acidez dos leites fermentados controle e dos leites adicionados de extrato de hibisco livre e encapsulado foram estatisticamente semelhantes. Entretanto, houve diferença entre os leites fermentados com a cultura isolada de *L. helveticus* e os leites fermentados com a co-cultura de *S. thermophilus*.

Figura 7 – Evolução do pH (A) e acidez titulável (B) do leite fermentado por *L. helveticus* (LH) e *L. helveticus* e *S. thermophilus* (LHST) adicionado de extrato de hibisco (LHExL ou LHSTExL) ou extrato encapsulado (LHExE ou LHSTExE) ao longo dos 30 dias de estocagem a 4 °C.



Fonte: Autoria própria (2022).

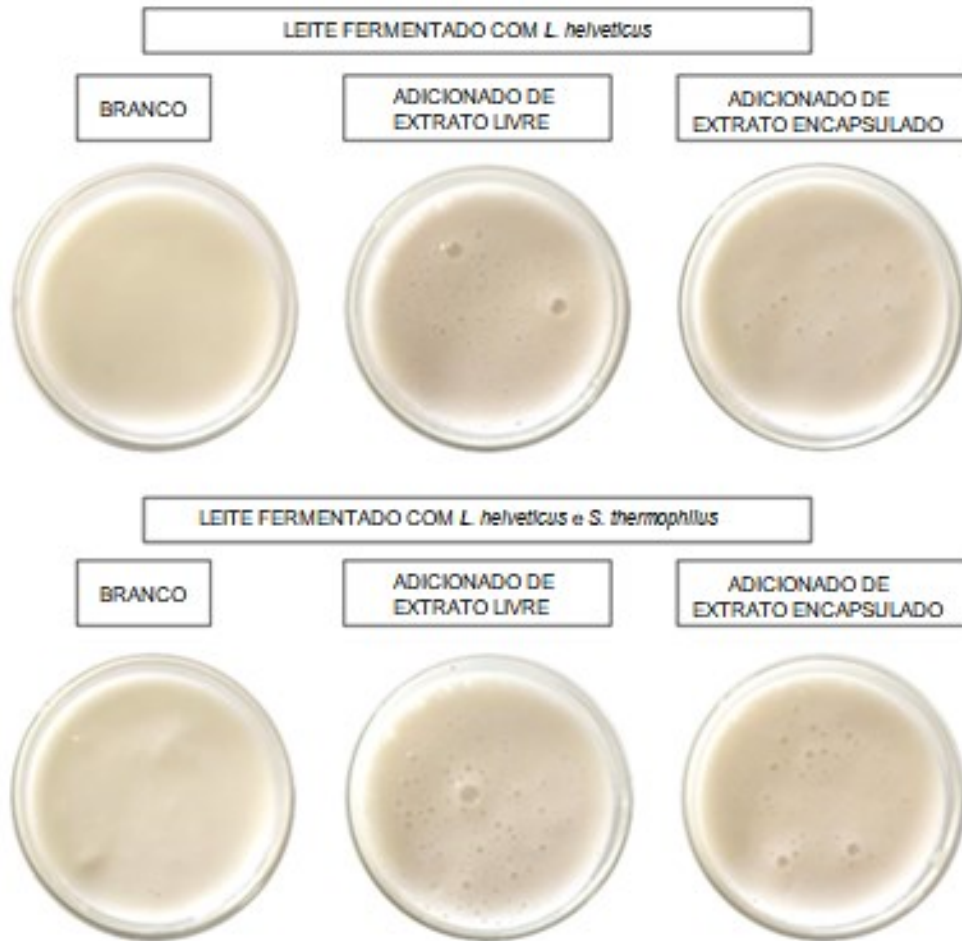
Com os dados é possível observar também que houve um decréscimo no pH e um aumento na acidez em todos os leites fermentados durante o período de armazenamento. Esse resultado era esperado devido a ação acidificante do *L. helveticus*. E apesar das cepas apresentarem diferentes capacidades de acidificação, resultados similares foram encontrados no estudo de Cavalheiro (2018) durante o período de estocagem de iogurtes fermentados com cultura láctica tradicional e o *L. helveticus*.

Comparando os dois tratamentos foi possível concluir que o leite fermentado com a associação do *S. thermophilus* resultou em maior pós-acidificação. A queda foi de 0,16 unidades de pH para o leite fermentado com *L. helveticus* e 0,32 unidades de pH para o tratamento associado ao *S. thermophilus*. A pós acidificação dos fermentados é resultado da atividade metabólica dos organismos iniciadores durante o período de armazenamento refrigerado, e a maior pós-acidificação do leite fermentado com a co-cultura pode ser resultado do crescimento associativo entre o *L. helveticus* e *S. thermophilus*.

5.6. ESTUDO DA ESTABILIDADE DA COR

Para determinação da cor dos leites fermentados foram avaliados os valores do parâmetro de luminosidade (L^*) e as coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*). O parâmetro L^* expressa valores entre zero (0) e cem (100), sendo assim quanto mais próximo de 100, mais clara é a amostra e quanto mais distante, mais escura. Valores de a^* positivos indicam tendência à coloração vermelha e negativos, coloração verde. Valores de b^* positivos expressam maior intensidade de amarelo enquanto os negativos apresenta maior intensidade de azul (HUNTER ASSOCIATES LABORATORY, 1996). A Figura 8 ilustra a aparência dos dois leites fermentados adicionados de extrato de hibisco livre e encapsulado aos 30 dias de armazenamento.

Figura 8 – Leites fermentados com *L. helveticus* adicionado ou não de *S. thermophilus* aos 30 dias de estocagem a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.



Fonte: Autoria própria (2022).

A Tabela 2 apresenta os valores médios de L^* de todos os leites fermentados analisados durante o tempo de estocagem. Os resultados mostram que as amostras tiveram tendência a coloração branca, indicado pelos valores elevados de L^* .

Tabela 2 – Resultados médios do parâmetro L^* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

LEITES FERMENTADOS	L^*		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LH	86,88 ^{Cb} \pm 0,37	86,18 ^{Bd} \pm 0,01	85,70 ^{Aa} \pm 0,12
LHExL	85,70 ^{Cac} \pm 0,02	83,35 ^{Ac} \pm 0,00	84,79 ^{Be} \pm 0,02
LHExE	84,82 ^{Cc} \pm 0,02	84,51 ^{Bb} \pm 0,03	83,18 ^{Ac} \pm 0,12
LHST	86,49 ^{Ba} \pm 1,56	84,43 ^{Ab} \pm 0,39	85,47 ^{Aa} \pm 0,03
LHSTExL	85,83 ^{Ba} \pm 0,02	83,84 ^{Aa} \pm 0,20	83,75 ^{Ad} \pm 0,03
LHSTExE	86,30 ^{Cab} \pm 0,26	83,98 ^{Ba} \pm 0,00	82,07 ^{Ab} \pm 0,42

Fonte: Autoria própria (2022). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

É possível observar também, que todos os leites fermentados apresentaram comportamento semelhante durante o tempo de armazenamento, sendo possível verificar ligeira redução nos valores de L^* , demonstrando que o tempo influenciou esse parâmetro. Freitas (2017) encontrou resultados similares nas formulações que receberam de 0 a 5% de subprodutos desidratados de acerola como fonte de compostos fenólicos em leites fermentados probióticos.

A Tabela 3 representa os valores médios do parâmetro a^* . A análise dos resultados mostrou que poucas amostras apresentaram semelhança. Sendo assim, os leites fermentados diferenciam significativamente em relação a esse parâmetro, quando comparados entre si e durante a vida de prateleira.

Tabela 3 – Resultados médios do parâmetro a^* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

LEITES FERMENTADOS	a^*		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LH	-2,23 ^{Ab} ± 0,12	-1,17 ^{Ba} ± 0,02	-1,40 ^{Cd} ± 0,09
LHExL	-0,33 ^{Aa} ± 0,04	0,01 ^{Be} ± 0,02	-0,35 ^{Ab} ± 0,03
LHExE	-0,34 ^{Ba} ± 0,06	-0,13 ^{Cd} ± 0,01	-0,47 ^{Ab} ± 0,17
LHST	-1,43 ^{Ac} ± 0,09	-2,07 ^{Ab} ± 0,05	-2,46 ^{Ac} ± 0,04
LHSTExL	-0,97 ^{Cd} ± 0,02	-0,43 ^{Bc} ± 0,22	-0,80 ^{Aa} ± 0,10
LHSTExE	-0,08 ^{Be} ± 0,22	-1,13 ^{Aa} ± 0,02	-0,95 ^{Aa} ± 0,16

Fonte: Autoria própria (2022). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p>0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p>0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

Os dados mostram também, que apesar da adição dos extratos de hibisco, todos os leites fermentados apresentaram tendência à coloração verde. Conforme Canella *et al.* (2018), a cor esverdeada no leite pode ser atribuída à presença natural da vitamina hidrossolúvel riboflavina. Assim, para aplicação do extrato de hibisco como corante, é necessário aumentar a concentração a ser adicionada no leite fermentado.

Referente ao parâmetro b^* é possível verificar através das médias, presente na Tabela 4, que houve uma tendência a coloração amarela. Referente ao parâmetro b^* é possível verificar através das médias, presente na Tabela 4, que houve uma tendência a coloração amarela, característica de produtos lácteos. Esse resultado deve-se aos pigmentos lipossolúveis, especialmente carotenoides (FOX *et al.*, 2015).

Tabela 4 – Resultados médios do parâmetro b^* dos leites fermentados em função do tempo de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

LEITES FERMENTADOS	b^*		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LH	7,94 ^{Bc} ± 0,07	7,68 ^{Ae} ± 0,06	8,20 ^{Cd} ± 0,10
LHExL	6,93 ^{Bb} ± 0,05	6,33 ^{Ab} ± 0,04	7,29 ^{Cb} ± 0,05
LHExE	6,74 ^{Aa} ± 0,03	6,65 ^{Ac} ± 0,03	7,59 ^{Ba} ± 0,15
LHST	6,72 ^{Aa} ± 0,03	6,99 ^{Aa} ± 0,07	7,44 ^{Bab} ± 0,04
LHSTExL	6,86 ^{Aab} ± 0,03	7,00 ^{Ba} ± 0,06	7,74 ^{Cc} ± 0,05
LHSTExE	6,83 ^{Aab} ± 0,23	7,20 ^{Bd} ± 0,05	7,52 ^{Ca} ± 0,18

Fonte: Autoria própria (2021). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

A diferença de cor dos leites fermentados entre as amostras logo após o preparo e durante o período de prateleira foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 5. O parâmetro ΔE^* indica a percepção dos parâmetros de cor de um produto pelo olho humano. Sabe-se que para haver diferenciação visual da coloração entre amostras, é necessário que o ΔE^* seja de no mínimo 2 (MESNIER *et al.*, 2014), tal valor é usado como um valor limite para indicar que a tonalidade começou a mudar. Uma diferença inferior a este valor limite é considerada imperceptível a olho nu. Sendo assim, os valores demonstram que os leites fermentados com apenas *L. helveticus* não apresentaram diferença na tonalidade da cor durante os 30 dias em relação ao dia inicial de armazenamento. O leite fermentado com a co-cultura apresentou diferença aos 15 dias em relação ao primeiro dia, mas essa diferença não se manteve aos 30 dias de estocagem.

Tabela 5 – Diferença de cor (ΔE^*) dos leites fermentados ao longo do armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) com relação ao dia inicial de preparo.

LEITES FERMENTADOS	ΔE^*	
	DIA 15	DIA 30
LH	1,30	0,74
LHExL	0,95	1,87
LHExE	0,39	1,66
LHST	2,17	1,20
LHSTExL	2,07	0,83
LHSTExE	2,57	1,94

Fonte: Autoria própria (2022).

As antocianinas são altamente suscetíveis a diversos fatores pela sua estrutura quimicamente instável. Vankar; Shukla (2011) destaca em seu estudo que o teor de

antocianinas é estável pH baixo, menores que 3,0; mas a intensidade da cor dos extratos pode diminuir em valores de pH mais altos, maiores que 4,5. Sendo assim, é possível que o leite fermentado com a co-cultura possa ter sofrido alterações na cor durante o armazenamento devido à instabilidade das antocianinas, apresentando diferença visível entre os dias 1 e 15. Embora neste período em estudo tenha ocorrido alteração de cor no leite fermentado pelas culturas adjuntas sem adição do extrato, o que pode ter colaborado com as demais amostras.

Com os dados da Tabela 6, é possível verificar a diferença de cor (ΔE^*) dos leites fermentados com extrato de hibisco livre ou encapsulado em relação ao leite fermentado controle, durante o armazenamento.

Tabela 6 – Diferença de cor (ΔE^*) dos leites fermentados adicionados de extrato de hibisco ou extrato encapsulado ao longo do armazenamento com relação ao leite fermentado controle.

LEITES FERMENTADOS	ΔE^*		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LHEXL	2,45	1,80	1,66
LHEXE	3,04	2,22	2,75
LHSTExL	0,82	1,74	2,41
LHSTExE	1,37	1,06	3,72

Fonte: Autoria própria (2022).

Os leites fermentados com apenas o *L. helveticus* demonstraram diferença visualmente perceptível em relação à amostra controle devido a diferença de cor ΔE^* ter valor superior a 2,0 no primeiro dia de armazenamento. O diferencial de cor pode ser consequente da elevada acidez que o leite fermentado por *L. helveticus* tenha apresentado comparado ao tratamento fermentado com a cultura adjunta no início da estocagem. A diferença de cor só foi observada em leites fermentados com a co-cultura 30 dias de estocagem quando a acidez apresentou similar ao fermentado somente com *L. helveticus*. Esta alteração de cor pode ser consequente ao observado por Vankar; Shukla (2011), onde o pigmento apresenta estável em alimentos ácidos.

Os resultados da diferença de cor do leite fermentado com apenas o *L. helveticus* adicionado de extrato de hibisco livre apresentou uma perda na coloração, tornando-se visivelmente similar ao controle a partir do dia 15. Por outro lado, o leite fermentado por o *L. helveticus* adicionado de extrato de hibisco encapsulado (LHEXE) manteve a coloração estável e visivelmente diferente em relação ao controle ao longo do tempo de estocagem.

5.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.7.1. Atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

No ensaio DPPH, a substância com potencial antioxidante é capaz de doar um átomo de hidrogênio para reduzir o radical DPPH a DPPH-H, produzindo um decréscimo da absorvância a 515/517nm (PIRES *et al.*, 2017). O potencial pode ser expresso em porcentagem de atividade antioxidante. Desta forma, de acordo com os valores apresentados na Tabela 7, as porcentagens da atividade de eliminação dos radicais DPPH dos leites fermentados foram maiores que 70,91%.

Tabela 7 – Capacidade de inibição do radical DPPH pelos leites fermentados produzidos, ao longo do tempo de armazenamento (expresso em % de inibição) a 4 ± 1 °C.

LEITES FERMENTADOS	% de inibição do radical DPPH		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LH	97,37 ^{Aa} ± 1,97	90,30 ^{Aa} ± 2,96	70,91 ^{Ba} ± 0,48
LHExL	81,27 ^{ABa} ± 0,66	82,62 ^{Aa} ± 0,70	79,05 ^{Aa} ± 0,59
LHExE	93,65 ^{Aa} ± 1,09	97,19 ^{Aa} ± 0,11	86,50 ^{Aa} ± 12,21
LHST	81,73 ^{Aa} ± 22,99	92,70 ^{Aa} ± 8,93	83,95 ^{Aa} ± 19,36
LHSTExL	92,88 ^{Aa} ± 1,31	91,14 ^{Aa} ± 7,69	81,06 ^{Aa} ± 8,07
LHSTExE	84,44 ^{Aa} ± 12,81	84,41 ^{Aa} ± 15,06	74,75 ^{Aa} ± 7,74

Fonte: Autoria própria (2021). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados demonstraram que não houve efeito do aumento da atividade de inibição do radical ao associar extrato de hibisco no tempo inicial de estocagem. Valores próximos foram encontrados no estudo de Namdari, Nejati (2016) que avaliou a capacidade de inibição ao radical DPPH de leite fermentado por isolados de *L. helveticus* durante a fermentação e o armazenamento sob refrigeração.

Por outro lado, não houve redução da atividade antioxidante ao longo do tempo de armazenamento para todos os tratamentos e aos 30 dias todos os tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais neste parâmetro estudado ($p > 0,05$).

A atividade antioxidante dos leites fermentados exibiu valores expressivos, entretanto, a adição dos extratos de hibisco não proporcionou aumento da atividade antioxidante, de forma que as amostras resultaram em valores estatisticamente iguais. Esses resultados indicam que a capacidade antioxidante dos extratos de hibisco pode

ter sofrido efeito das interações entre as proteínas do leite e os polifenóis. Xiao *et al.* (2011) observou em seu estudo que a interação das proteínas do leite enfraqueceu significativamente o potencial sequestrante do radical livres DPPH dos polifenóis.

Pode-se concluir que a atividade antioxidante dos leites fermentados apresentou maior importância neste parâmetro tecnológico não sendo possível observar efeito significativo com a adição do extrato de hibisco na forma livre ou encapsulado. Aos 30 dias de estocagem, não percebeu o efeito da associação das culturas lácticas no potencial antioxidante do leite fermentado. Como ambos os tratamentos receberam o *L. helveticus*, esta cultura láctica parece ter um papel importante no desenvolvimento de sua capacidade antioxidante. No trabalho sobre o potencial de cepas de *Lactobacillus* para controle da oxidação de lipídeos e proteínas em iogurtes foi observado que entre as cepas estudadas o *L. helveticus* apresentou a maior atividade sequestrante de radicais e maior estabilidade oxidativa durante o armazenamento refrigerado. Sugerindo que ocorre o aumento da atividade antioxidante conforme a viabilidade das cepas e do processo fermentativo, podendo ser resultado da lise celular, peptídeos proteicos e metabólitos extracelulares (HASHEMI; GHOLAMHOSSEINPOUR; ABEDI, 2021).

5.7.2. Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), é baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6 tripiridil-s-triazina (TPTZ) (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016). Assim, conforme se observa com os dados da Tabela 8, a fermentação com *L. helveticus* apresentou efeito positivo na capacidade antioxidante de todos os leites fermentados.

Tabela 8 – Resultados da análise de atividade antioxidante pelo método FRAP para os leites fermentados ao longo do tempo de armazenamento.

LEITES FERMENTADOS	FRAP (mmol Trolox/L)		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
LH	0,85 ^{Ab} ± 0,00	0,82 ^{ABa} ± 0,01	0,80 ^{Bab} ± 0,02
LHExL	0,79 ^{Bb} ± 0,05	0,85 ^{ABa} ± 0,04	0,94 ^{Aab} ± 0,06
LHExE	1,04 ^{Aa} ± 0,05	0,88 ^{Ba} ± 0,03	0,98 ^{ABa} ± 0,06
LHST	0,67 ^{Ac} ± 0,01	0,76 ^{Aa} ± 0,08	0,77 ^{Ab} ± 0,13
LHSTExL	0,79 ^{Ab} ± 0,02	0,79 ^{Aa} ± 0,06	0,83 ^{Aab} ± 0,04
LHSTExE	0,77 ^{Ab} ± 0,01	0,78 ^{Aa} ± 0,06	0,97 ^{Ba} ± 0,08

Fonte: Autoria própria (2022). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

Os dados também demonstram que a amostra LHExE, no tempo inicial de estocagem apresentou maior poder redutor, com valor médio de $1,04 \pm 0,05$ mmol Trolox/L, enquanto a amostra LHST apresentou menor atividade ($p < 0,05$), com valor médio de $0,67 \pm 0,01$ mmol Trolox/L. Os resultados neste estudo permitiram observar que, o LH associado ao extrato de hibisco encapsulado (LHExE) parece ter contribuído com maior atividade antioxidante. Enquanto o leite fermentado LHST, embora tenha apresentado menor atividade, a associação com o extrato de hibisco parece incrementar sua capacidade antioxidante.

Houve efeito da estocagem sobre a atividade antioxidante do leite fermentado LH e LHSTExE, onde o LH reduziu significativamente a capacidade antioxidante, enquanto o segundo houve aumento. A aplicação de extrato de hibisco contribuiu com a estabilidade da atividade antioxidante comparado ao leite fermentado sem sua adição.

O estudo El-Sayed et al. (2021) demonstrou resultado semelhante, sendo o leite fermentado por *L. helveticus* apresentou maior grau de proteólise e maiores valores de FRAP quando comparado com cultura comercial e com cepas únicas de *Lactobacillus*. O autor concluiu uma possível correlação direta da atividade proteolítica com a capacidade antioxidante, devido a produção de peptídeos bioativos.

5.8. TEXTURA

A característica de texturas do leite fermentado é um critério importante para avaliação da sua qualidade. Fatores como composição, processo de fabricação e

cultura starter utilizada em sua produção podem influenciar no arranjo do gel da coalhada afetando tais características (VANEGAS-AZUERO; GUTIÉRREZ, 2018).

Os resultados de firmeza, consistência, coesão e índice de viscosidade estão descritos na Tabela 9. A firmeza é definida como a resistência moderada do produto a deformação, ou seja, é o parâmetro que determina a força que precisa ser aplicada para garantir a deformação do leite fermentado. A coesão representa a integridade estrutural do produto, descrevendo sua tendência a ser coeso ou “grudado”. A consistência e o índice de viscosidade são parâmetros relacionados, alta consistência se refere a um produto viscoso com alta densidade (HOVJECKI *et al.*, 2020; YILDIZ; OZCAN, 2018).

Tabela 9 – Parâmetros de textura instrumental (firmeza, coesividade, viscosidade e consistência) dos leites fermentados ao longo do tempo de armazenamento.

LEITES FERMENTADOS	PARÂMETROS TEXTURAIS		
	DIA 1	DIA 15	DIA 30
Firmeza (N)			
LH	0,14 ^{Aa} ± 0,01	0,14 ^{Ac} ± 0,01	0,10 ^{Ba} ± 0,00
LHE _x L	0,15 ^{Ba} ± 0,23	1,77 ^{Bb} ± 0,05	7,11 ^{Aa} ± 1,19
LHE _x E	0,37 ^{Ba} ± 0,02	2,37 ^{Aa} ± 0,29	0,11 ^{Ba} ± 0,00
LHST	0,11 ^{Aa} ± 0,00	0,15 ^{Ac} ± 0,09	0,11 ^{Aa} ± 0,01
LHSTExL	0,11 ^{Aa} ± 0,00	0,11 ^{Ac} ± 0,00	25,22 ^{Aa} ± 27,59
LHSTExE	0,11 ^{Aa} ± 0,0	0,11 ^{Ac} ± 0,00	0,10 ^{Aa} ± 0,00
Coesividade (N)			
LH	-0,07 ^{ABa} ± 0,01	-0,09 ^{Ab} ± 0,01	-0,06 ^{Ba} ± 0,00
LHE _x L	-0,07 ^{Aab} ± 0,00	-0,27 ^{Aa} ± 0,07	-1,00 ^{Aa} ± 0,98
LHE _x E	-0,06 ^{Bb} ± 0,00	-0,27 ^{Aa} ± 0,06	-0,06 ^{Ba} ± 0,00
LHST	-0,05 ^{Ab} ± 0,01	-0,05 ^{Ab} ± 0,00	-0,06 ^{Aa} ± 0,00
LHSTExL	-0,06 ^{Ab} ± 0,00	-0,06 ^{Bb} ± 0,00	-0,06 ^{Ba} ± 0,00
LHSTExE	-0,05 ^{Bb} ± 0,00	-0,06 ^{Ab} ± 0,00	-0,05 ^{Ba} ± 0,00
Viscosidade (N.s)			
LH	-0,77 ^{Ba} ± 0,13	-1,33 ^{Ab} ± 0,28	-0,25 ^{Cb} ± 0,02
LHE _x L	-0,47 ^{Ba} ± 0,44	-1,02 ^{Bb} ± 0,10	-3,14 ^{Aa} ± 0,20
LHE _x E	-0,45 ^{Ba} ± 0,15	-1,97 ^{Aa} ± 0,18	-0,52 ^{Bc} ± 0,00
LHST	-0,50 ^{Aa} ± 0,07	-0,30 ^{Bc} ± 0,02	-0,35 ^{Bbc} ± 0,04
LHSTExL	-0,45 ^{Aa} ± 0,03	-0,36 ^{Bc} ± 0,01	-0,39 ^{ABbc} ± 0,03
LHSTExE	-0,44 ^{Aa} ± 0,06	-0,43 ^{Ac} ± 0,03	-0,36 ^{Abc} ± 0,01
Consistência (N.s)			
LH	2,42 ^{Ab} ± 0,10	1,16 ^{Aa} ± 0,96	1,60 ^{Ab} ± 0,01
LHE _x L	2,90 ^{Ca} ± 0,28	9,02 ^{Bb} ± 0,60	22,54 ^{Aa} ± 1,62
LHE _x E	2,01 ^{Bab} ± 0,06	12,34 ^{Ac} ± 1,73	0,39 ^{Bb} ± 0,45
LHST	1,90 ^{Ac} ± 0,06	1,52 ^{Ac} ± 0,28	1,77 ^{Ab} ± 0,09
LHSTExL	1,91 ^{Ac} ± 0,13	1,82 ^{Ac} ± 0,00	11,52 ^{Aab} ± 13,12
LHSTExE	1,95 ^{Ac} ± 0,17	1,86 ^{Ac} ± 0,02	1,74 ^{Ab} ± 0,01

Fonte: Autoria própria (2022). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), para o mesmo período de armazenamento. ^{A,B}Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), ao longo do tempo de armazenamento.

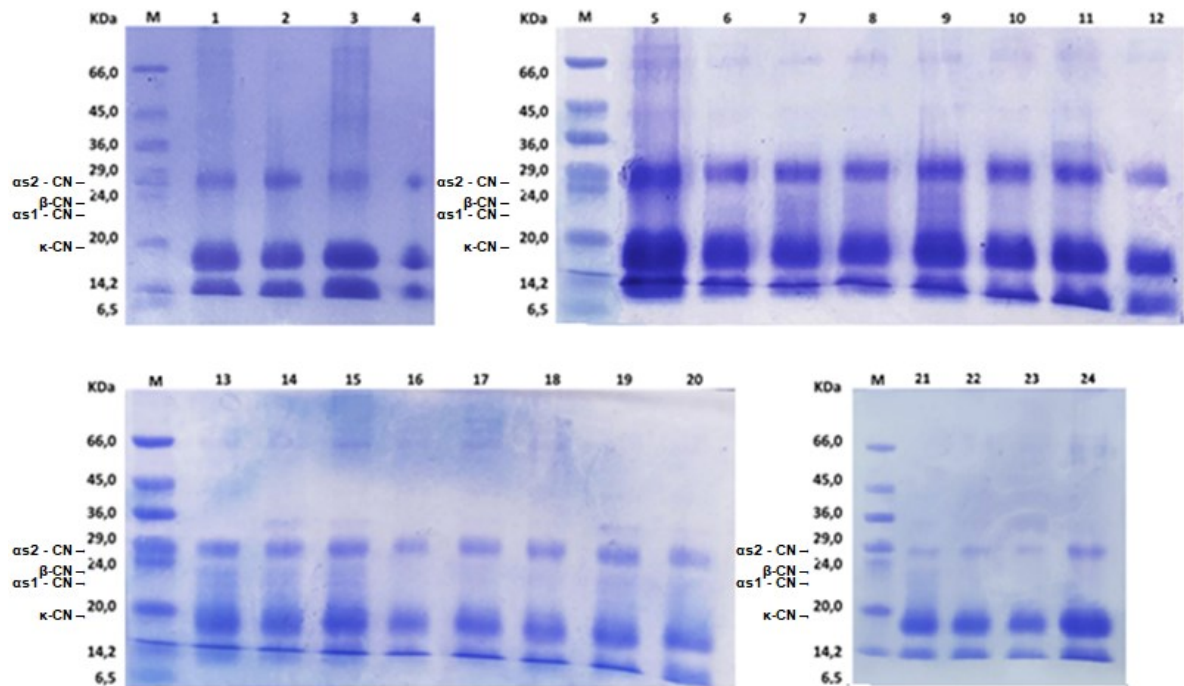
A firmeza de todos os tratamentos no tempo inicial da estocagem variou entre 0,11 e 0,37 N, considerando que a textura foi resultante de uma coalhada quebrada. O leite fermentado adicionado de extrato de hibisco encapsulado apresentou próximo quando comparado com o iogurte firme elaborado a partir de leite UHT (FREIRE *et al.*, 2020). Por outro lado, a coesividade de todas as formulações do leite fermentado elaborado neste estudo apresentou muito frágeis comparado às amostras de iogurtes industriais avaliados por Kose; Altun; Kose (2018).

Não foi observado aumento neste parâmetro para todos os tratamentos aos 30 dias de estocagem. Isto pode ser justificado por motivo da quebra do gel visando homogeneizar os extratos de hibiscos, contribuindo com o enfraquecimento do gel, além disso a calda foi elaborada a partir de leite em pó desnatado o que diminui um pouco a resistência do gel. De acordo com os resultados as propriedades de texturas das amostras foram significativamente mais baixas em comparação com dados da literatura para leites fermentados semelhantes, o que indica que as amostras apresentaram estrutura de gel mais fraca. Esse resultado também pode ter relação com o teor de proteína determinado no leite fermentado. Segundo Miocinovic *et al.* (2015), a qualidade textual de fermentados desnatados pode ser melhorada pela suplementação do leite desnatado com um alto teor de proteína do soro, proporcionando um corpo mais firme e uma menor separação de soro de leite, não necessitando da utilização de estabilizantes.

5.9. ANÁLISE DE PERFIL PROTÉICO

A variabilidade dos perfis detectados por meio da técnica de SDS-PAGE pode indicar diferenças na atividade proteolítica das amostras de leite fermentado durante o armazenamento. As análises de perfil eletroforético do leite fermentado estão apresentadas na Figura 9. A eletroforese das proteínas apresentou bandas que foram identificadas como: $\alpha 1$ – caseína ($\alpha 1$ - CN) (23,5 a 23,6 KDa), $\alpha 2$ – caseína ($\alpha 2$ - CN) (25,2 KDa), β – caseína (β -CN) (23,9 a 24,0 KDa) e κ – caseína (κ -CN) (19,0 KDa).

Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos tratamentos fermentados.



Fonte: Autoria própria (2022). M: Padrão de peso molecular (6,5 a 200 kDa, Bio-Rad). Canaletas apresentam os tratamentos: Dia 1 – 1: LH, 2: LHExL, 3: LHExE, 4: LHST, 5: LHSTExL, 6: LHSTExE; Dia 7 – 7: LH, 8: LHExL, 9: LHExE, 10: LHST, 11: LHSTExL, 12: LHSTExE; Dia 15 – 13: LH, 14: LHExL, 15: LHExE, 16: LHST, 17: LHSTExL, 18: LHSTExE; Dia 30 – 19: LH, 20: LHExL, 21: LHExE, 22: LHST, 23: LHSTExL, 24: LHSTExE.

As análises eletroforéticas mostraram uma redução na quantidade das proteínas α -caseína e β -caseína nas amostras de leite fermentado com ambas as culturas, após 15 dias de armazenamento. Esse resultado é identificado pela diminuição da intensidade das bandas dessas proteínas quando comparadas com a intensidade das amostras fermentadas apenas pelo *L. helveticus*. Provavelmente a ação sinérgica entre as cepas combinadas, resultou em um sistema proteolítico mais eficiente, degradando a caseína presentes no meio.

Estes dados corroboram com YAO *et al.* (2022) onde verificaram em seu estudo que os lactobacilos exibem atividade de protease que promovem o crescimento do *S. thermophilus*, e demonstraram que assim como o *Lactobacillus bulgaricus*, o *S. thermophilus* exibe relação simbiótica com *L. helveticus*.

Após 30 dias de armazenamento, as concentrações das caseínas não foram significativamente diferentes entre os leites fermentados com a cultura isolada e com a adição da co-cultura, demonstrando que em todas as amostras as caseínas foram

hidrolisadas, enquanto as frações de proteína do soro de leite estavam presentes durante todo o período de armazenamento refrigerado.

Um resultado semelhante foi encontrado no estudo TAHA *et al.* (2017), nas amostras de iogurte fermentado com *L. acidophilus* e *L. helveticus* as caseínas foram completamente hidrolisadas durante o armazenamento, enquanto as frações de proteína do soro ainda foram identificadas. Esses resultados podem ser explicados porque o sistema proteolítico das bactérias está relacionado com a utilização da caseína e fornecem aminoácidos essenciais as células durante o seu crescimento no leite. Além disso, a caseína é a principal fonte de nitrogênio das LAB no leite fermentado (KIELISZEK *et al.*, 2021).

5.10. POTENCIAL CORANTE DOS EXTRATOS DE HIBISCO

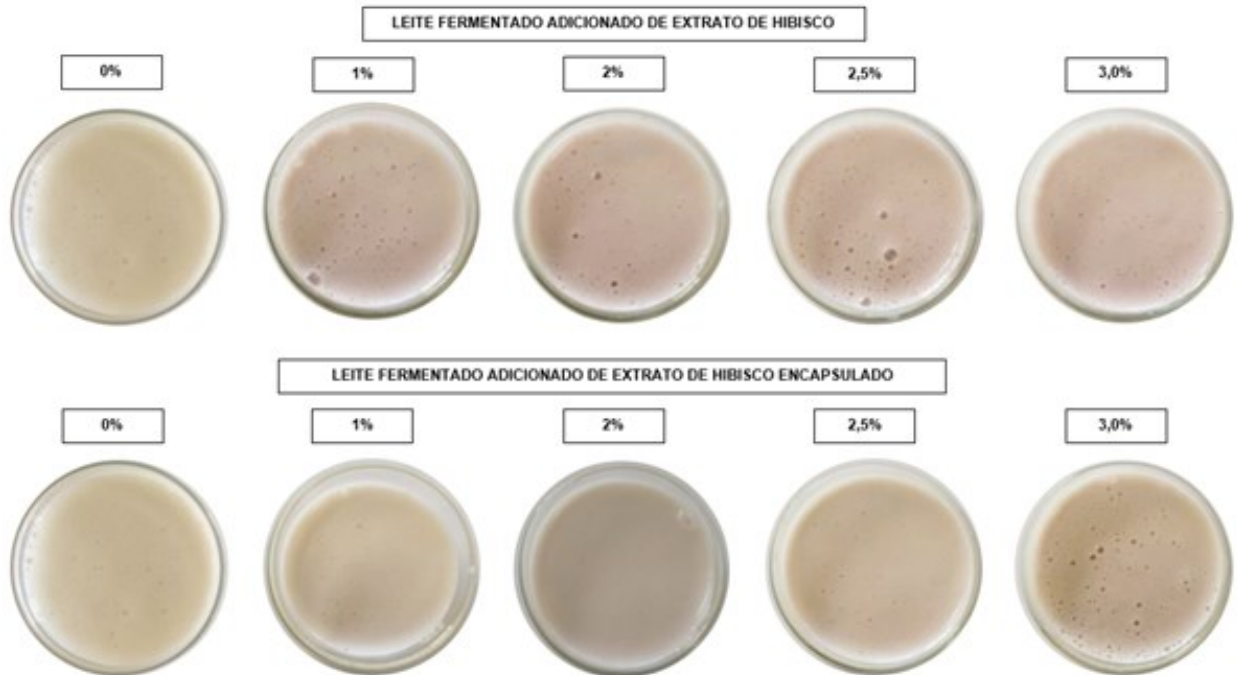
Ao observar a Tabela 10 é possível conferir a diferença da coloração significativa entre as amostras ilustrada na Figura 10. A adição dos extratos proporcionou uma variação na luminosidade dos leites fermentados, demonstrando que o aumento da concentração de ambos os extratos reduziu os valores do parâmetro L*, sendo assim a amostra controle apresentou maior valor médio, demonstrando maior luminosidade.

Tabela 10 – Parâmetros de cor (L*, a* e b*) dos leites fermentados com diferentes concentrações de extrato livre e encapsulado de hibisco, e diferença de cor (ΔE^*) dos com relação ao leite fermentado sem adição de corantes naturais.

	Concentração de extrato	L*	a*	b*	ΔE^*
Controle	0,0%	84,43 ^g ± 0,19	-2,34 ^c ± 0,23	7,01 ^b ± 0,02	-
Extrato livre	1,0%	80,23 ^f ± 0,03	0,96 ^a ± 0,03	6,28 ^f ± 0,03	5,39
	2,0%	73,96 ^a ± 0,14	5,41 ^g ± 0,02	4,47 ^e ± 0,07	13,27
	2,5%	73,83 ^a ± 0,03	4,52 ^b ± 0,06	4,27 ^d ± 0,06	12,92
	3,0%	72,59 ^c ± 0,03	4,40 ^b ± 0,03	5,05 ^a ± 0,02	13,76
Extrato encapsulado	1,0%	78,97 ^e ± 0,34	1,12 ^a ± 0,04	4,98 ^a ± 0,05	6,78
	2,0%	76,77 ^d ± 0,01	2,56 ^d ± 0,03	6,98 ^b ± 0,03	9,09
	2,5%	73,55 ^a ± 0,03	3,45 ^e ± 0,04	7,47 ^c ± 0,01	12,33
	3,0%	71,90 ^b ± 0,28	4,82 ^f ± 0,05	7,61 ^c ± 0,10	14,44

Fonte: Autoria própria (2022). ^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Figura 10 – Imagem dos leites fermentados adicionado de diferentes concentrações de extrato de hibisco (0 a 3,0%) na forma livre e encapsulado.



Fonte: Autoria própria (2022).

No que se refere ao parâmetro b^* , todas as amostras apresentaram dentro do espectro amarelo. Com relação aos valores do parâmetro a^* , observou-se que todas as amostras com adição dos extratos estavam dentro do espectro de coloração vermelha, onde os resultados variaram de 0,96 a 5,41, com aumento significativo desse parâmetro proporcional ao aumento da concentração dos extratos. O mesmo foi observado para a diferença de coloração (ΔE^*), em que todas as amostras com adição dos extratos apresentaram valores superior a 2,0, valor mínimo da diferença de cor perceptível a olho nu. Assim, para amostras com adição de 1% de extrato, o ΔE^* foi menor, e para amostras com adição de 3%, ΔE^* foi maior.

Por isso, a incorporação das antocianinas como corante naturais é uma alternativa promissora para produtos ácidos, como os leites fermentados, devido às suas características intrínsecas e a necessidade de armazenamento sob refrigeração (PASSOS *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÃO

O emprego da co-cultura de *S. thermophilus* associada ao *L. helveticus* promoveu a aceleração do processo fermentativo, mostrando melhor desempenho tecnológico. Ao avaliar a composição proximal, o leite fermentado por LHST apresentou teor de proteína significativamente inferior ao LH. A contagem do *S. thermophilus* foi superior ao *L. helveticus*, embora ambos atendam aos limites legais ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

A diferença de cor foi percebida ao adicionar extrato de hibisco no leite fermentado com as duas culturas lácticas (LHST) aos 15 dias de estocagem quando comparado com o tempo inicial. Não ocorrendo alteração de cor no final do tempo de estocagem.

Todas as amostras demonstraram valores semelhantes na análise de atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Os leites fermentados exibiram valores significativos, entretanto, pode-se afirmar que os resultados foram desenvolvidos exclusivamente pela alta atividade proteolítica *L. helveticus*, concluindo que a adição dos extratos não proporcionou melhores resultados quando aplicados em leites fermentados com tais culturas.

A associação dos extratos de hibisco livre e encapsulado contribuíram com a estabilidade da capacidade antioxidante determinada pela análise FRAP, ao longo do tempo de estocagem. Inicialmente o LH apresentou maior atividade quando associado ao extrato de hibisco encapsulado.

As análises eletroforéticas mostraram que o sistema proteolítico das bactérias resultou na hidrólise das caseínas em todas as amostras, enquanto as frações de proteína do soro de leite estavam presente durante todo o período de armazenamento refrigerado.

As propriedades de textura de todos os tratamentos apresentaram menos firmes e coesos, demonstrando que as amostras apresentaram estruturas do gel mais frágeis e mantiveram estáveis ao longo do tempo de estocagem. Referente ao potencial corante, os resultados evidenciam a possibilidade de utilizar os extratos de hibisco em substituição a corantes sintéticos em leite fermentados, principalmente, devido a sua estabilidade em produtos ácidos.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMEED, Reda M.; ROCHA, João; SILVA, Artur M.S. Selective separation of hibiscus acid from Roselle extracts by an amino-functionalized Metal Organic Framework. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1636, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461789>
- ABREU, Bruna Barbosa *et al.* Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante em cálice de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1, 2019.
- ALVES, Elisiane de Souza; DOMINGUES, Roberta Garcia. **Elaboração de hidrogel energético adicionado de extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*)**. 34 f. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Escola de química e alimentos, Rio Grande, 2017.
- ANTUNES, Andressa Regina. **Avaliação do potencial antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea preparadas com *Lactobacillus acidophilus*: Uma revisão sistemática**. 102 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel- PR, 2017.
- ARAÚJO, Auryclennedy Calou. **Obtenção e estabilidade de corante de antocianinas extraídas do repolho roxo (*Brassica oleracea*)**. 75 f. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Campina Grande - PB, 2019.
- ARAÚZ, Richard Luis Castillo. **Efecto de uso del extracto de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) como colorante natural y fuente de antioxidantes en las características fisicoquímicas de yogur sabor a fresa**. 33 f. 2017. Projeto Especial de Graduação - Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano - Honduras, 2017.
- BAGLIO, Ettore. Chemistry and Technology of Yoghurt Fermentation. **Springer**, Italy, p. 25–33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07377-4>
- BANDARA, K; MAHENDRAN, T. Extraction and Utilization of Red Colour from Roselle (*Hibiscus subdariffa* L) Calyces in Ice Cream. **Journal of Technology and Value Addition**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 97–109, 2020.
- BARBOSA, Denise Rocha Ramos *et al.* Quantificação de compostos fenólicos, poder antioxidante e teor de açúcares em infusão e extrato solúvel de *Hibiscus sabdariffa* L. **Revista desafios**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 108–123, 2020. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20873/uftv7-7770>
- BEZERRA, Aline Sobreira *et al.* Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias não convencionais da região sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 182–188, 2017.

BORGONOV, Tais Fernanda. **Biocompostos das polpas de maracujá e de buriti: caracterização e aplicação em leite**. 90 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto - SP, 2018.

BRAGA, A. L. *et al.* **Food-grade blue encapsulate and process for production thereof**. WO 2013010967 A1. Concessão: 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa N° 46, de 23 de outubro de 2007**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília: Diário Oficial da União, 2007.

BRASIL. **Resolução - RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

CALLIARI, Caroline Maria *et al.* Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* Extract into Zein Nanoparticles. **Chemical Engineering and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 2062–2072, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ceat.202000194>

CANELLA, Maria Helena Machado *et al.* Use of Concentrated Whey by Freeze Concentration Process to Obtain a Symbiotic Fermented Lactic Beverage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 56–68, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.19026/ajfst.14.5832>

CAO, Feiwei *et al.* Characterization of an exopolysaccharide (EPS-3A) produced by *Streptococcus thermophilus* ZJUIDS-2-01 isolated from traditional yak yogurt. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 192, p. 1331–1343, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.10.055>

CAPITANI, Claudia *et al.* Caracterização de iogurtes elaborados com probióticos e fibra solúvel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s. l.], v. 08, n. 02, p. 1285–1300, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3895/S1981-36862014000200001>

CARVALHO, Giovana SABRINY. **Propriedades funcionais *Hibiscus sabdariffa*, aplicações clínicas e contraindicações**. 21 f. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição) - UniCesumar – Centro Universitário de Maringá, Centro de Ciências biológicas e da saúde, Maringá - PR, 2018.

CASSOL, Liliana. **Extração de compostos bioativos do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) por micro-ondas e seu encapsulamento por atomização e liofilização**. 122 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2018.

CASSOL, Liliana; NOREÑA, Caciano Pelayo Zapata. Microencapsulation and accelerated stability testing of bioactive compounds of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 1599–1610, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00757-x>

CAVALHEIRO, Flávia Giacometti. **Iogurte de alto teor proteico adicionado de *Lactobacillus helveticus*: fabricação, perfil de peptídeos e aspectos sensoriais.** 101 f. 2018. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas - SP, 2018.

CHAMPAGNE, C. P. *et al.* Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**, [s. l.], v. 42, p. 612–621, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.018>

DAMASCENO, Carolina S. B. *et al.* Peptídeos Bioativos de Soja Glycine Max (L.) Merrill: uma Breve Revisão. **Revista Processos Químicos**, [s. l.], v. 10, n. 19, p. 89–98, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/rpq.v10i19.350>

DIAS, Sandra *et al.* Coloring Soy-Based Yogurt Alternative. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 771, p. 1–13, 2020.

EL-SAYED, Mahmoud Ibrahim; AWAD, Sameh; ABOU-SOLIMAN, Nagwa Hussein Ismail. Improving the Antioxidant Properties of Fermented Camel Milk Using Some Strains of *Lactobacillus*. **Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 12, p. 352–371, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/fns.2021.124028>

ELFAHRI, K R *et al.* Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 31–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10160>

ELFAHRI, K. R.; DONKOR, O. N.; VASILJEVIC, T. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 38, p. 37–46, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.010>

EMBRAPA GADO DE LEITE. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Anuário do Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite**, São Paulo, n. 35 art, p. 104, 2019.

FARIAS, Paula Karoline Soares *et al.* Contagem de bactérias lácticas em iogurtes comerciais. **Caderno de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 38–44, 2016.

FARNWORTH, Edward R. **Handbook of fermented functional food**. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2003.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOX, P F *et al.* **Dairy Chemistry And Biochemistry**. 2. ed. [S. l.]: Springer International Publishing, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781420046359-p1>

FREIRE, Gabriel Alexandre Sena *et al.* Teor de antocianinas, cor, textura, características físico-químicas e microbiológicas de leite fermentado adicionado de extrato rico em antocianinas obtido. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 56155–56163, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-142>

FREITAS, Tatyane Lopes de. **Subprodutos de acerola como fontes de compostos fenólicos em leites fermentados probióticos**. 77 f. 2017. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FREIXO, Juliana Moraes. **Caracterização física e química do leite em pó e sua aplicação em uma bebida fermentada**. 119 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, Londrina - PR, 2011.

GÓMEZ-ALDAPA, Carlos Alberto *et al.* A modified Achira (*Canna indica* L.) starch as a wall material for the encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* extract using spray drying. **Food Research International**, [s. l.], v. 119, p. 547–553, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.031>

GÖSTA BYLUND, M.Sc. **Dairy processing handbook**. 3. ed. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 2015.

GRIFFITHS, Keith *et al.* Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. **Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 28, p. 15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diseases4030028>

GRIFFITHS, M. W.; TELLEZ, A. M. *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 30, p. 1–9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00030>

HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher; GHOLAMHOSSEINPOUR, Aliakbar; ABEDI, Elahe. Biopreservative potential of *Lactobacillus* strains in yoghurt dessert. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 15, p. 1634–1643, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00755-z>

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B; AMIGO, L. La leche como fuente de antioxidantes naturales B. **ALIMENTACION, NUTRICION Y SALUD**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 61–65, 2004.

HOVJECKI, Marina *et al.* Influence of heat treatment of goat milk on casein micelle size, rheological and textural properties of acid gels and set type yoghurts. **Journal of Texture Studies**, [s. l.], p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jtxs.12524>

HUNTER ASSOCIATES LABORATORY, Inc. Colour Hunter CIE L* a* b* Color Scale. **Volumen 8**, Reston, Virginia, v. 8, n. 7, p. 1–4, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: [s. n.], 2004.

IWALOKUN, B. A.; SHITTU, M. O. Effect of *Hibiscus sabdariffa* (calyce) extract on biochemical and organoleptic properties of yogurt. **Pakistan Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 172–182, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/pjn.2007.172.182>

JUNG, Eunkyung; JOO, Nami. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology. **Meat Science**, [s. l.], v. 94, p. 391–401, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.02.008>

KIELISZEK, Marek *et al.* Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **1858**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1858, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26071858>

KOSE, Yagmur Erim; ALTUN, Ibrahim; KOSE, Senol. Determination of Texture Profile Analysis of Yogurt Produced By Industrial and Traditional Method. **International Journal of Scientific and Technological Research**, [s. l.], v. 4, n. 8, 2018.

LAW, B. A. (org.). **Microbiology and buichemistry of cheese and fermented milk**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1121-8>

LEIMANN, Fernanda Vitória *et al.* Avaliação da estabilidade da cor de curcumina encapsulada por análise de componentes principais. **VI Simpósio De Engenharia E Ciência De Alimentos**, [s. l.], v. 1, p. 7, 2018.

LIU, H.; XU, X. M.; GUO, Sh D. Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 40, p. 946–954, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.007>

MACHADO, Ana Paula da Fonseca. **Extração e encapsulação de antocianinas de subprodutos industriais de frutas utilizando fluidos pressurizados**. 217 f. 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas - SP, 2018.

MAHFUDH, N.; HADI, A.; SOLECHAN, R. A. Z. Immunomodulatory activity of yogurt fortified with roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 255–261, 2021.

MARTINS, Natália *et al.* Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, p. 1–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>

MELO, Filipe de Oliveira *et al.* Desenvolvimento de balas de gelatina de morango enriquecida com extrato de hibisco (*Hibiscus Sabdarifa* L.). **Brazilian Journal of**

Development, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 47561–47571, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-407>

MESNIER, Xavier *et al.* Heat and light colour stability of beverages coloured with a natural carotene emulsion: Effect of synthetic versus natural water soluble antioxidants. **Food Research International**, [s. l.], v. 65, p. 149–155, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.025>

MIOCINOVIC, J. *et al.* Rheological and textural properties of goat and cow milk set type yoghurts. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 58, p. 1–3, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.006>

MOURA, S. C. S. R. **Caracterização, perfil de liberação (in vitro) e aplicação de micropartículas contendo antocianinas do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), obtidas por gelificação iônica**. 220 f. 2018. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas - SP, 2018.

MOURA, Sílvia C.S.R. de *et al.* Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 241, p. 317–327, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.095>

MOURA, Sílvia C S R de *et al.* Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 12, p. 1500–1515, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02308-9>

MOURTZINOS, Ioannis *et al.* Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of β -cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 21, p. 10303–10310, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf801389j>

NAMDARI, Aazam; NEJATI, Fatemeh. Development of antioxidant activity during milk fermentation by wild isolates of *Lactobacillus helveticus*. **Applied Food Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 178–186, 2016.

NASCIMENTO, Liane Caroline Souza. **Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite**. 131 f. 2017. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto - SP, 2017.

NAVIDAD-MURRIETA, Migdalia Sarahy *et al.* Use of a Taguchi Design in *Hibiscus sabdariffa* Extracts Encapsulated by Spray-Drying. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 128, p. 1–13, 2020.

NGUYEN, T. Thu *et al.* Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast. **Food Research International**, [s. l.], v. 107, p. 275–280, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.044>

NIMSE, Satish Balasaheb; PAL, Dilipkumar. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, p. 27986–28006, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>

NIX COLOR SENSOR. **Need a quick and free color converter?**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>. Acesso em: 30 maio 2021.

NOVAES, G M *et al.* Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 535–539, 2014.

NOVIATRI, A.; SETIANINGRUM, A.; HASKITO, A. E. P. Organoleptic properties evaluation of purple *Hibiscus sabdariffa* L (Roselle) calyx extract-fortified yogurt. **Journal of Physics: Conference Series**, [s. l.], v. 1430, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1430/1/012012>

OCHAL, Piotr *et al.* CO-Stripping at Ru Nanoparticles. **ECS Transactions**, [s. l.], v. 28, n. 21, p. 9–17, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1149/1.3496015>

OCHOA-VELASCO, C. E. *et al.* Antioxidant characteristics of extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces encapsulated with mesquite gum. **Journal of Food Sci and Technol**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1747–1756, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2564-1>

PAIVA, Yaroslávia Ferreira. **Pimentões (*Capsicum annum*) como aditivo alimentar**. 71 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Pombal - Paraíba, 2018.

PASSOS, Ana Paula da Silva dos *et al.* The use of thermal analysis and photoacoustic spectroscopy in the evaluation of maltodextrin microencapsulation of anthocyanins from juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Mart.) and their application in food. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 385–396, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.17113/ftb.53.04.15.3726>

PIRES, Janaína *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, [s. l.], p. 6, 2017.

RASHEED, Dalia M. *et al.* Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -glucosidase inhibition. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 250, p. 236–244, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.020>

RENTERO, Nelson (org.). **Anuário Leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. São Paulo: Embrapa Gado de Leite, 2018.

ROJAS, Valquíria Maeda *et al.* Formulation of mayonnaises containing PUFAs by the addition of microencapsulated chia seeds, pumpkin seeds and baru oils. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 274, p. 220–227, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.015>

SAH, B N P *et al.* Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 726–740, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1217825>

SAH, B. N. P. *et al.* Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 156, p. 264–270, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>

SANTOS, Priscila Dayane de Freitas. **Extração de curcuminóides e obtenção de in situ de nanopartículas**. 85 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos., Campo Mourão - PR, 2018.

SAVIJOKI, Kirsi; INGMER, Hanne; VARMANEN, Pekka. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 71, p. 394–406, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>

SCHÄGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

SILVA, Analú Barbosa da; WIEST, José Maria; CARVALHO, Heloisa Helena Chaves. Compostos químicos e atividade antioxidante analisados em *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 19, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7415>

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Bucher, 2017.

SILVA, Cássia Adria Medeiros Da; DIAS, Valéria Coutinho. **Probióticos e prebióticos: Avaliação do efeito da suplementação com frutooligossacarídeos (FOS) sobre a cinética de fermentação de leite de búfala**. 48 f. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá – IFAP, Macapá - AP, 2021.

SILVA, Jéssica Thaís do Prado. **Nanoencapsulação de luteína e avaliação in vivo da sua influência sobre a memória**. 61 f. 2017. Dissertação (Mestrado) – - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos., Campo Mourão - PR, 2017.

SILVA, Jéssica Thaís do Prado *et al.* Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 76, p. 1005–1011, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.212>

STAFF, M C. Cultured milk and fresh cheeses. *In*: THE TECHNOLOGY OF DAIRY PRODUCTS. 2. ed. London: Blackie Academic, 1998. p. 123–157.

SU, Nana *et al.* Effect of the addition of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts on the rheological, textural, and antioxidant activity of fermented milks. **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 00, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.3526>

SU, Nana *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fermented milks with added roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 43, p. 234–241, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.017>

TAHA, Soad *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1325–1332, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0160-9>

TAMIME, Adnan. **Fermented Milk**. 1. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2006.

TAMIME, Adnan. **Probiotic dairy products**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005.

TETRA PAK. **logurte clean label: o que você precisa saber**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.tetrapak.com/pt-br/insights/cases-articles/clean-label-yoghurt-what-you-need-to-know>. Acesso em: 26 abr. 2021.

TSAI, Pi Jen *et al.* Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, [s. l.], v. 35, p. 351–356, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00129-6)

URIOT, Ophélie *et al.* Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 37, p. 74–89, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.038>

URREA-VICTORIA, Vanessa *et al.* Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 1–6, 2016.

VANEGAS-AZUERO, Ana Milena; GUTIÉRREZ, Luis Felipe. Physicochemical and sensory properties of yogurts containing sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and β -glucans from Ganoderma lucidum. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 101, p. 1020–1033, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13235>

VANKAR, Padma S.; SHUKLA, Dhara. Natural Dyeing with Anthocyanins from Hibiscus rosa sinensis Flowers. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 122, p. 3361–3368, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.34415>

WIHANSAH, R. R.S.; ARIEF, I. I.; BATUBARA, I. Anti-diabetic potency and characteristics of probiotic goat-milk yogurt supplemented with roselle extract during cold storage. **Tropical Animal Science Journal**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 191–199, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.3.191>

XIAO, Jianbo *et al.* Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 55, p. 1637–1645, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100280>

YAO, Caiqing *et al.* The symbiosis among, and the storage stabilities of, starter lactic acid bacterial strains in biofilms. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 155, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112896>

YILDIZ, Eda; OZCAN, Tulay. Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 70, p. 199–207, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12566>

ZACARCHENCO, Patrícia Blumer; VAN DENDER, Ariene Gimenes Fernandes;

REGO, Raul Amaral (org.). **Brasil dairy trends 2020: Tendências do mercado de produtos lácteos**. 1. ed. Campinas - SP: ITAL, 2017.

ZAPATA, Luz Marina *et al.* Estabilidad De Antocianinas Durante El Almacenamiento De Jugos De Arándanos. **Revista Vitae**, Colombia, v. 23, n. 3, p. 173–183, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n3a03>

ZHANG, Hui *et al.* Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.017>