

Nathália Barreto Robbi

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA DE LEITE FERMENTADO ADICIONADO DE SUCO DE  
MORANGO CRIOCONCENTRADO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio

Coorientadores: Me. Giordana Demaman Arend e Me. Henrique Jaster

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
será realizada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

## RESUMO

O morango é consumido mundialmente devido ao seu valor nutricional, sabor e cor atrativos. Este é encontrado principalmente *in natura*, ou como aditivo em outros produtos. Devido a sua atividade biológica, relacionado ao teor de compostos fenólicos e à atividade antioxidante, o morango pode ser considerado um alimento interessante sob o ponto de vista nutricional. Nesse contexto, o processo de crioconcentração em blocos poderia ser uma alternativa para aumentar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante do suco de morango, através da obtenção de um concentrado. Desta forma, o concentrado obtido do terceiro estágio da crioconcentração foi utilizado para produzir dois leites fermentados com diferentes concentrações deste concentrado (15 % e 30 %). O suco de morango, o concentrado, os leites fermentados foram avaliados em relação ao teor de compostos fenólicos totais e quanto à atividade antioxidante. Os leites fermentados foram ainda avaliados em relação à contagem microbiológica, ao teor de sólidos totais, ao pH, à acidez e aos parâmetros de cor. A crioconcentração resultou num concentrado com maiores teores para os compostos fenólicos e maior atividade antioxidante, cujos teores foram maiores para o leite fermentado adicionado com 30 % do concentrado. A contagem dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* não foram afetadas pela adição do concentrado do suco de morango, sendo que todos os leites fermentados elaborados podem ser classificados como produtos probióticos. Quanto maior a adição do concentrado no leite fermentado, maiores foram os teores de sólidos totais e os valores de acidez. A maior incorporação de concentrado do suco de morango ao leite fermentado contribuiu para gerar um produto mais escuro, no entanto, com maior coloração vermelho-amarelada. O surgimento da tendência a cor amarelada pode ser creditada à redução do valor do pH. Os parâmetros de cor também indicaram que a diferença da cor dos leites fermentados pode ser visualizada pelos consumidores. Por fim, os resultados obtidos demonstraram existir uma relação positiva dos leites fermentados com a elaboração de produtos com propriedades funcionais.

**Palavras-chave:** Crioconcentração. Produto lácteo fermentado. Morango. Probiótico. Alimento funcional.

## ABSTRACT

Strawberry is a fruit consumed worldwide due to its nutritional value, taste and attractive color. This fruit is mostly found *in nature*, or as an additive in other products. Due to its biological activity, related to the content of phenolic compounds and the antioxidant activity, the strawberry can be considered an exciting food from a nutritional point of view. In this context, the process of cryoconcentration in blocks could be an alternative to increase the phenolic compounds and the antioxidant activity of strawberry juice by obtaining a concentrate. Therefore, the concentrate from the third stage of cryoconcentration process was used to produce two fermented kinds of milk with different concentrations of this concentrate (15% and 30%). Strawberry juice, concentrate, and fermented milks were evaluated about total phenolic compounds content and antioxidant activity. Fermented milks were also assessed about microbiological counts, total solids content, pH, acidity and color parameters. The cryoconcentration resulted in a concentrate with higher contents for the phenolic compounds and for the antioxidant activity, whose contents were higher for the fermented milk added with 30% of the concentrate. The count of the microorganisms *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12, and *Streptococcus thermophilus* were not affected by the addition of the strawberry juice concentrate, and all elaborated fermented milks can be classified as probiotic products. The higher concentration of the concentrate in the fermented milk results in the higher total solids content and the acidity values. The greater incorporation of concentrate of the strawberry juice to the fermented milk contributed to generating a darker product but with more significant yellow-red coloration. The tendency to yellowish color can be credited to the reduction of the pH value. The color parameters also indicated that the consumers could visualize the color difference of the fermented milks. Finally, the results obtained showed a positive relation of the fermented milks with the elaboration of products with functional properties.

**Keywords:** Cryoconcentration. Fermented milk product. Strawberry. Probiotic. Functional food.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descrição do procedimento de crioconcentração gravitacional realizado com o suco de morango .....	18
Figura 2 – Fluxograma de elaboração dos leites fermentados, 0%, 15% e 30 % do concentrado proveniente do terceiro estágio de crioconcentração (C3) do suco de morango .....	19

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplos de pesquisas realizadas com produtos alimentícios empregando o método gravitacional de crioconcentração .....	16
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação da composição química de morangos .....	14
Tabela 2 – Resultado para os teores de compostos fenólicos totais (CFT) e para a atividade antioxidante empregando os métodos ABTS e DPPH <sup>·</sup> , para o suco de morango, para o concentrado obtido do terceiro estágio da crioconcentração (C3), e para os leites fermentados controle (sem C3), leite fermentado 15 (com adição de 15% de C3) e leite fermentado 30 (com adição de 30% de C3) .....	24
Tabela 3 – Resultados da análise microbiológica (média ± desvio padrão) expressos como log de unidade formadora de colônia por grama de leite fermentado (log UFC g <sup>-1</sup> ) .....	25
Tabela 4 – Resultados (média ± desvio padrão) do teor de sólidos totais, pH e acidez titulável do leite fermentado sem adição de C3 (controle), do leite fermentado 15 (com adição de 15 % de C3) e do leite fermentado 30 (com 30 % de C3) .....	26
Tabela 5 – Resultados (média ± desvio padrão) dos parâmetros da cor (L*, a*, b*, ΔE*) do leite fermentado sem adição de C3 (controle), do leite fermentado 15 (com adição de 15 % de C3) e do leite fermentado 30 (com 30 % de C3) .....	27

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Leite fermentado .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>O morango (<i>Fragaria X ananassa</i> Duch.) .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>O processo de crioc Concentração .....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Preparo do suco de morango .....</b>	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Crioc Concentração do suco de morango .....</b>	<b>17</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparação dos leites fermentados .....</b>	<b>18</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise do teor de compostos fenólicos totais .....</b>	<b>20</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante .....</b>	<b>20</b>
4.6.1	ABTS [2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] .....	21
4.6.2	DPPH <sup>·</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) .....	21
<b>4.7</b>	<b>Análise microbiológica .....</b>	<b>21</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise físico-química .....</b>	<b>22</b>
4.8.1	Análise de cor .....	22
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse em alimentos que promovam à saúde dos consumidores tem crescido rapidamente nos últimos anos, devido suas contribuições potenciais na diminuição do risco de várias doenças. Neste contexto, a adição de frutas e ou extratos, que contenham compostos fenólicos, considerados benéficos à saúde quando consumidos regularmente, em produtos lácteos fermentados vêm se destacando.

Nos últimos anos, o interesse em estudar compostos fenólicos aumentou devido às suas propriedades antioxidantes e seu papel provável na prevenção de várias doenças. A capacidade dos antioxidantes em proteger as células dos danos causados pelos radicais livres e prevenir doenças, incluindo doenças cardiovasculares, neoplasias e neurodegenerativas, tem sido associada às suas atividades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e antibacterianas. Por estas propriedades, já amplamente estudadas e conhecidas, novos produtos estão sendo desenvolvidos. Muitos produtos alimentícios, além de conterem estes compostos também apresentam a incorporação de outros componentes e/ou microrganismos que aumentam ainda mais as suas propriedades nutritivas, como por exemplo, os microrganismos probióticos. Estes microrganismos, amplamente adicionados em produtos lácteos, também quando consumidos regularmente apresentam à capacidade de melhorar o estado de saúde dos consumidores.

Associado ao desenvolvimento de alimentos com propriedades benéficas aos consumidores tem-se utilizado também processos de concentração com o intuito de aumentar ainda mais estas propriedades. Dentre estas tecnologias, destaca-se a crioconcentração, que segundo Belén et al. (2012), por empregar baixas temperaturas, consegue preservar ao máximo as características de alimentos líquidos, como os sucos que contêm alto teor de água. Conforme estes autores, as reações químicas e bioquímicas no alimento que são responsáveis pela sua deterioração, são mais demoradas à baixa temperatura. Assim, a remoção de água de sucos, empregando temperaturas mais baixas, seria uma forma de manter a sua propriedade nutritiva, aumentando a sua preservação.

Uma destas frutas que é transformada em suco é o morango. O morango é amplamente consumido devido o seu grande teor em micronutrientes e compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. No entanto, os morangos são muito problemáticos para o processamento industrial, já que são sazonais e têm um alto teor

de água, o que os torna muito perecíveis. Assim, em decorrência da sua importância econômica, pesquisas têm sido realizadas para avaliar o efeito de diferentes processos sobre características nutricionais deste fruto e seu suco (QIU; WANG; GAO, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização das propriedades físico-químicas e microbiológicas de leite fermentado adicionado de morango concentrado pelo processo de crioconcentração em blocos.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- (a) concentrar o suco de morango pelo processo de crioconcentração em blocos;
- (b) caracterizar físico-quimicamente o concentrado do terceiro estágio de crioconcentração (C3);
- (c) determinar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do C3;
- (d) produzir leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> e *Streptococcus thermophilus*;
- (e) adicionar o concentrado (C3) no leite fermentado, resultando em dois leites fermentados, um contendo 15 % e outro 30 % de C3;
- (f) determinar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos dois leites fermentados;
- (g) realizar a análise microbiológica dos leites fermentados; e
- (h) determinar os teores de sólidos totais, o pH, a acidez titulável e os parâmetros dos leites fermentados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Leite fermentado

De acordo com a Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2007) que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Leite fermentado é definido também pela *International Dairy Federation* como um derivado lácteo preparado a partir do leite desnatado ou integral com culturas específicas (AKIN; OZCAB, 2017).

Os produtos lácteos fermentados incluem uma variedade de produtos lácteos, como iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, kefir, kumis, coalhada, leitelho e leite acidophilus doce obtido pela fermentação do leite por microrganismos específicos (OLIVEIRA, 2014). Entretanto, o tipo de cultura láctea adicionada em leites fermentados varia com cada região produtora. Geralmente o leite fermentado contém predominantemente bactérias ácidas lácticas como lactobacilos, mas podem conter também outras bactérias, como as probióticas, consideradas benéficas à saúde humana (YAMAMOTO, 2016). Abdollahzadeh et al. (2018) afirmam que probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem benefício ao consumidor quando administrados em quantidades adequadas. Assim, os leites fermentados probióticos são consumidos em todo o mundo por ter benefícios relacionados com a melhoria das condições intestinais, incluindo a melhoria da doença inflamatória intestinal e prevenção de patógenos infecciosos (CHA et al., 2018). Desta forma, produtos lácteos probióticos constituem uma importante classe de alimentos funcionais (BATISTA et al., 2017). Akin e Ozcab (2017) definem como alimentos funcionais os integrais, fortificados, enriquecidos ou melhorados que proporcionam benefícios à saúde além dos nutrientes essenciais (por exemplo, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, vitaminas e minerais). Estes autores também citam que alimentos funcionais também são associados à saúde porque contêm peptídeos bioativos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos, cálcio

altamente absorvível, ácido linoleico conjugado e outros componentes biologicamente ativos, por exemplo, alimentos enriquecidos com probióticos, prebióticos, carotenóides, ácido linoléico conjugado e compostos fenólicos com atividades antioxidantes. Akin e Ozcab (2017) também ressaltaram que os produtos lácteos fermentados têm componentes biologicamente ativos que há muito tempo são uma parte importante de uma dieta nutricional. Estes autores indicaram a incorporação de proteínas vegetais no leite fermentado como um bom método alternativo para maior enriquecimento de produtos lácteos, naturalmente ricos em proteínas.

Casarotti et al. (2018) relataram que frutas são incorporadas com sucesso em uma variedade de produtos alimentícios, entre eles, destacam-se o leite fermentado, muitas vezes produzidos usando microrganismos probióticos, tornando-os uma das categorias mais importantes e lucrativas de alimentos funcionais.

### **3.2 O morango (*Fragaria X ananassa* Duch.)**

O morango é uma das frutas mais populares, usada em sucos devido ao seu sabor, e seus nutrientes essenciais, como por exemplo, compostos bioativos, visando à promoção da saúde (QUINATO; DEGÁSPARI; VILELA, 2007; WANG et al., 2019). Estes efeitos na saúde do consumidor devem-se à combinação única de nutrientes, fitoquímicos e fibras do morango, que desempenham um papel sinérgico na caracterização dos morangos como alimento funcional (RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ et al., 2018). Os compostos fenólicos do morango são principalmente as antocianinas, as quais são responsáveis pela cor atrativa desta fruta (ARIZA et al., 2018).

Rico em vitamina C, o morango também contém relevante teor de minerais, como por exemplo, cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobre (ROCHA et al., 2008). Rahman et al. (2013) afirmaram que a composição nutritiva do morango difere com o tipo de cultivar e variedade, com a técnica e a área de cultivo, com o clima, bem como o tempo de colheita e o estágio de maturação. Na Tabela 1, encontra-se a variação média na composição química de morangos. Entretanto, conforme relatado por Arend et al. (2017) os processos térmicos utilizados frequentemente na indústria de alimentos, a fim de garantir a segurança alimentar, podem reduzir o teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante, a cor, e o seu valor nutritivo dos morangos.

Tabela 1 – Variação da composição química de morangos.

<b>Composição</b>	<b>Variação (g 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Umidade	90,58 – 92,19
Proteínas	0,53 – 1,17
Lipídios	0,33 – 0,48
Cinzas	0,56 – 0,81
Fibras dietéticas	2,24 – 2,42
Açúcares totais	3,77 – 6,96

Fonte: Hossain et al. (2016).

Visando facilitar a preservação de nutrientes considerados instáveis, muitos processos utilizados pela indústria de alimentos foram estudados e comparados (QIU; WANG; GAO, 2015). Já, Arend et al. (2017) empregou a nanofiltração, um processo não térmico, com o objetivo de concentrar compostos fenólicos do suco de morango. Estes autores concluíram que a utilização de processos não térmicos para concentrar o suco de morango, é capaz de manter o seu frescor original, além de melhorar os seus atributos funcionais.

### 3.3 O processo de crioconcentração

O processo de concentração de soluções líquidas, obtidos por congelamento seguido da separação de uma parte da água congelada é conhecido como crioconcentração (BELÉN et al., 2012). Este processo é baseado na separação de fases sólido-líquido, utilizando baixas temperaturas, de maneira que sejam preservados os compostos termicamente sensíveis do alimento (HERNÁNDEZ et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2011). Nesse processo, há a cristalização parcial da água em solução aquosa e em seguida a separação dos cristais do concentrado. Com esse procedimento, surgem algumas vantagens, como a baixa deterioração química e nenhuma perda de componentes voláteis (CHANG; HARTEL, 1997; YEE et al., 2003). O objetivo da crioconcentração é que a fase de gelo formada seja a mais pura possível, ou seja, isenta de sólidos, e que contenha apenas água (SÁNCHEZ et al., 2010).

Dentre os processos de crioconcentração encontram-se a cristalização em suspensão, a crioconcentração em camada e a crioconcentração em blocos. A cristalização em suspensão é iniciada com a nucleação do gelo, seguida pelo crescimento dos cristais de gelo na solução. Já na concentração em camadas, ocorre a cristalização da água presente na solução sob uma superfície fria, obtendo-se uma camada de gelo (AIDER; HALLEUX, 2008; AIDER; HALLEUX, 2009).

A crioconcentração em blocos, também chamada de gravitacional, é eficaz na obtenção de produtos alimentícios com alto valor nutricional e preservação das propriedades sensoriais (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; HALLEUX, 2008; MORENO et al., 2014). Neste tipo de crioconcentração, são obtidas duas frações, a fração de concentrado e a fração de gelo, esta última devendo conter um mínimo de matéria seca. A eficiência desse processo é dependente da taxa de impurezas no gelo (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; BELÉN et al., 2012).

Aider e Halleux (2009) afirmam que o bloco de gelo funciona como uma carcaça sólida que é o caminho em que a fração do fluido rico em sólidos passa. Para que eficiência do processo seja elevada (maior do que 90%), é fundamental que seja controlada a temperatura de descongelamento, resultando na redução da quantidade de sólidos retidos no gelo (AIDER; HALLEUX, 2009). Alguns autores empregaram o uso da crioconcentração em blocos para concentrar compostos, a fim de obter novos produtos (Quadro 1).

O trabalho realizado por Wiecheteck et al. (2004) objetivou elevar o teor de compostos fenólicos no mosto de maçã e analisar sua evolução durante o processamento da sidra. O trabalho realizado por Boaventura et al. (2013) contribuiu para o aumento de compostos bioativos em extrato de erva-mate. Já o estudo realizado por Piccoli (2015) objetivou estudar a influência da crioconcentração em sucos de uvas integrais. Por fim, o trabalho realizado por Canella et al. (2018) estudou a crioconcentração de soro de leite para sua utilização como um produto lácteo funcional e com isso, os resultados obtidos mostraram que o uso do soro crioconcentrado, do prebiótico inulina e das culturas probióticas na elaboração de um produto lácteo fermentado, como a bebida láctea fermentada, foi recomendado.

Quadro 1 – Exemplos de pesquisas realizadas com produtos alimentícios empregando o método gravitacional de crioconcentração.

<b>Pesquisa</b>	<b>Tipo de produto</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçã	Sidra	Concentrado com o dobro de compostos fenólicos	Wiecheteck et al. (2004)
Avaliou a influência do teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato de erva-mate	Extrato de erva-mate	O teor de sólidos totais aumentou 8 vezes	Boaventura et al. (2013)
Influência da crioconcentração nas propriedades reológicas de sucos de uva	Suco de uva	Concentrado com aumento de sólidos totais entre 2,43 e 2,70 vezes	Piccoli (2015)
Potencial da crioconcentração do soro de leite e seu emprego na elaboração de uma bebida láctea fermentada simbiótica	Bebida láctea fermentada simbiótica	Concentrado do soro de leite com o dobro de sólidos totais	Canella et al. (2018)

Fonte: O autor.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Foram utilizados morangos *in natura* na elaboração do suco. Os ingredientes comerciais (a partir do rótulo) utilizados na fabricação dos leites fermentados foram leite pasteurizado integral (3 g 100 g<sup>-1</sup> de lipídios, 3,5 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas e 5 g 100 g<sup>-1</sup> de carboidratos totais), e cultura composta por *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> e *Streptococcus thermophilus* (BioRich<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil). Ágar MRS (Difco, Sparks, EUA), ágar M17 (Difco, Sparks, EUA), cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), propionato de sódio (Fluka, Neu-Ulm, Alemanha), bile (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e AnaeroGen<sup>®</sup> (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) foram utilizados nas análises microbiológicas. Nas determinações dos compostos fenólicos e nas atividades antioxidantes foram empregados os reagentes de Folin-Ciocalteu da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

### 4.2 Preparo do suco de morango

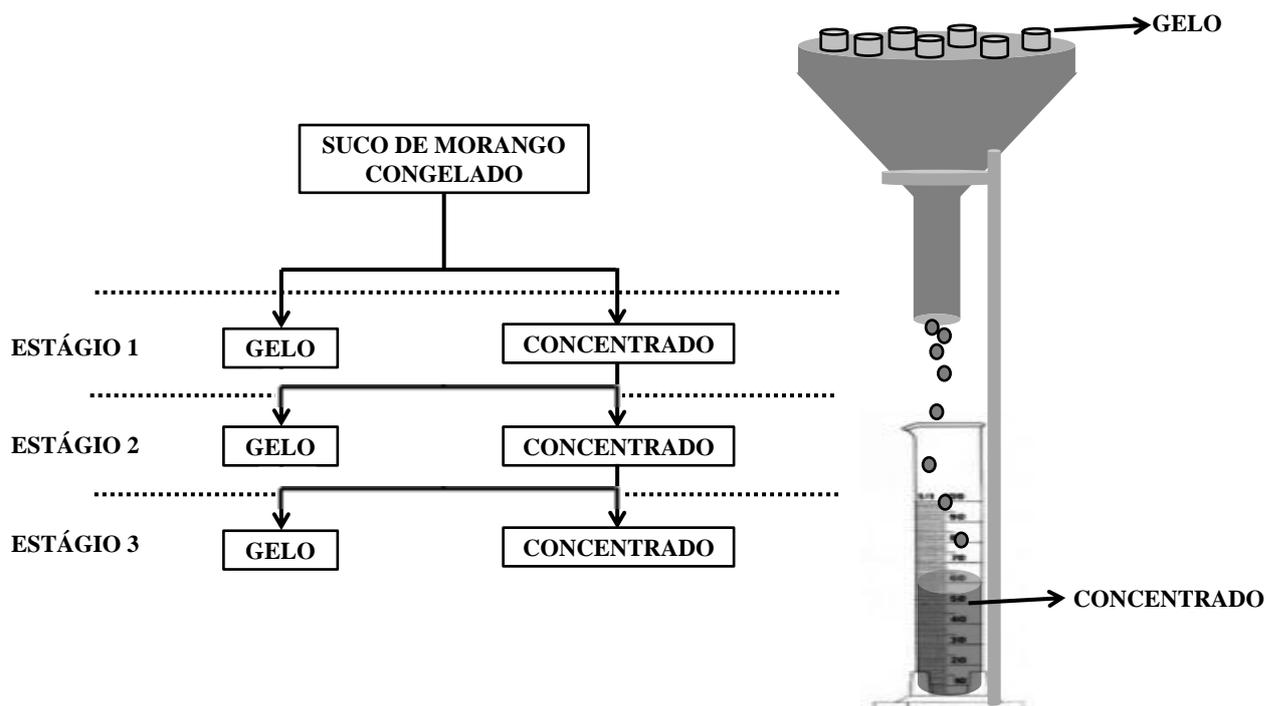
As amostras de morango previamente lavadas foram trituradas e filtradas empregando filtro de náilon. Na sequência, o suco foi colocado em recipientes plásticos de 100 mL, e congelado à  $-16 \pm 2$  °C por 24 horas.

### 4.3 Crioconcentração do suco de morango

O suco de morango congelado foi submetido à crioconcentração gravitacional, seguindo a metodologia descrita por Jaster et al. (2018), representada na Figura 1. Em cada estágio do processo de crioconcentração, duas frações foram obtidas e denominadas de concentrado e gelo. Do suco de morango congelado, 50% do volume inicial foram descongelados a temperatura ambiente ( $17 \pm 2$  °C). O líquido descongelado constituiu o concentrado do primeiro estágio de crioconcentração (C1), o qual foi

congelado novamente e utilizado como solução de alimentação no segundo estágio. Baseado nos resultados obtidos por Jaster et al. (2018) este procedimento foi repetido até o terceiro estágio de crioconcentração, onde foi obtido o concentrado (C3) que foi adicionado ao leite fermentado.

Figura 1 – Descrição do procedimento de crioconcentração gravitacional realizado com o suco de morango.



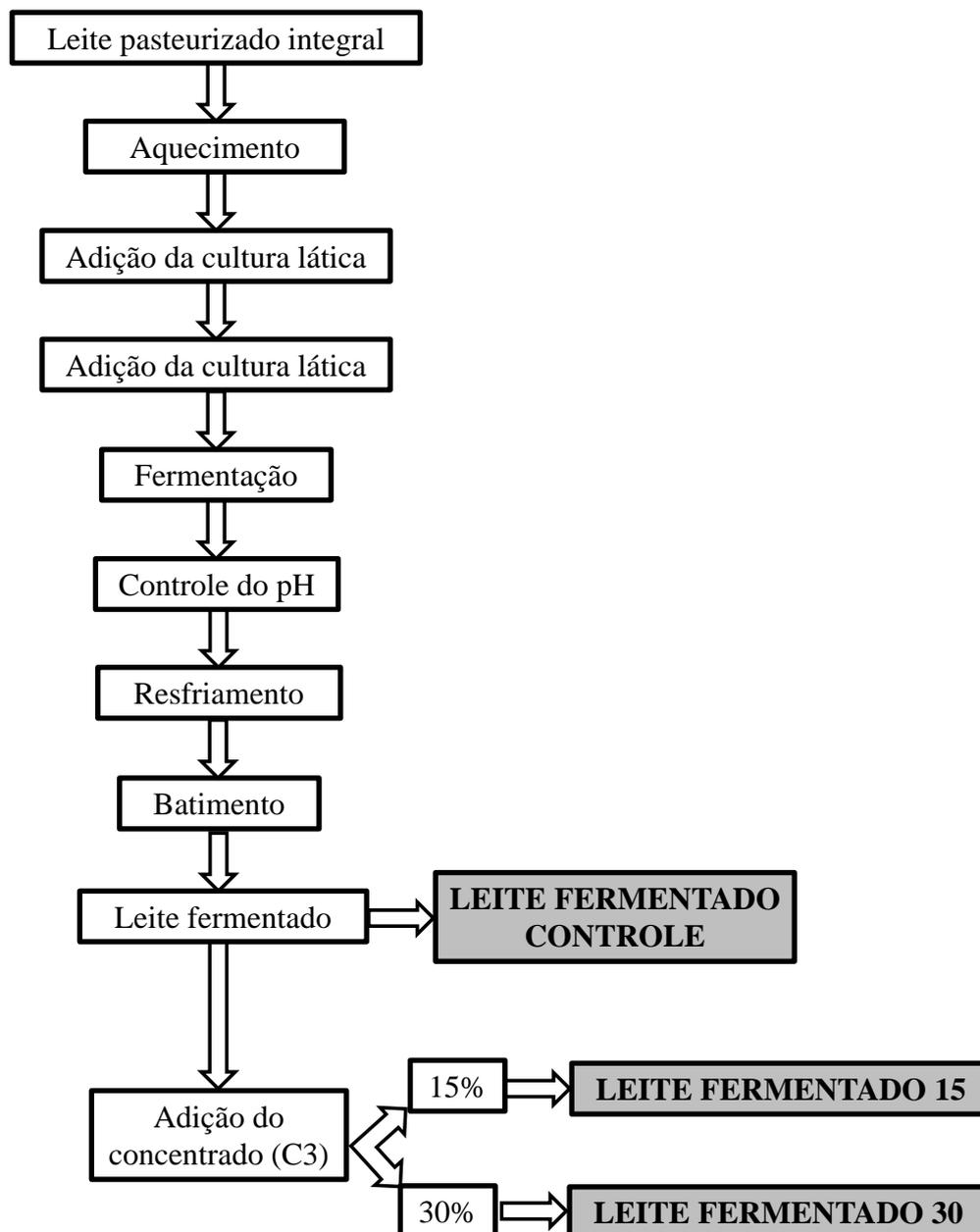
Fonte: O autor.

#### 4.4 Preparação dos leites fermentados

Foram preparadas três formulações de leites fermentados, seguindo a metodologia empregada por Jaster et al. (2018), com modificações, contendo 0%, 15% e 30 % do concentrado proveniente do terceiro estágio de crioconcentração (C3) do suco de morango, e denominados de controle, leite fermentado 15 e leite fermentado 30, respectivamente (Figura 2). Na preparação dos leites fermentados, o leite pasteurizado foi previamente aquecido a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ , e a cultura láctea foi adicionada conforme indicações do fabricante. Na sequência, foi realizada a fermentação a  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ , até pH

em torno de 4,8, resfriamento a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , batimento, adição ou não de C3. Todas as amostras de leites fermentados foram mantidas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , até a realização das análises.

Figura 2 – Fluxograma de elaboração dos leites fermentados, 0%, 15% e 30 % do concentrado proveniente do terceiro estágio de crioconcentração (C3) do suco de morango.



Fonte: O autor.

#### 4.5 Análise do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos nas amostras de suco de morango, do concentrado (C3) e nos leites fermentados denominados controle (sem C3), leite fermentado 15 (com adição de 15% de C3) e leite fermentado 30 (com adição de 30% de C3) foi determinado conforme descrito por Karaaslan et al. (2011), com modificações. Para o processo de extração, foi utilizado 20 g de leite fermentado misturado a 30 mL de acetona acidificada a 80% (0,01% de HCl). Em seguida, manteve-se a mistura em banho-maria (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brasil) a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  com agitação (180 rpm), durante 60 minutos. As amostras foram então centrifugadas (Hermle Z200A, Alemanha) a 3.823g durante 8 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para a quantificação do teor de fenólicos totais nas amostras de leites fermentados.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo metodologia descrita por Singleton, Joseph e Rossi (1965). Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram adicionadas a 4,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. A mistura foi homogeneizada em Vortex (VTX-F Biomi xer, São Paulo, Brasil) durante 1 minuto e em seguida foi adicionado 4 mL da solução de carbonato de sódio e mantida em repouso durante 1 hora. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 765 nm medida em espectrofotômetro (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). A curva de calibração foi construída utilizando o ácido gálico e o teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra ( $\text{mg GAE mL}^{-1}$ ).

#### 4.6 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do suco de morango, do C3 e dos leites fermentados (controle, 15 e 30) foi determinada por dois diferentes métodos, pelo ABTS, que mede a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), e pelo DPPH $\cdot$  que se baseia na medição da capacidade de eliminação dos antioxidantes em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

#### 4.6.1 ABTS [2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]

O método ABTS foi realizado conforme a metodologia proposta por Re et al. (1999). A formação do radical ABTS ocorreu pela reação da solução do ABTS<sup>•+</sup> com a solução de persulfato de potássio, incubados a 25°C no escuro durante 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até alcançar a absorvância desejada. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (UVmini-1241, Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 734 nm após 6 minutos da adição da amostra. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao ácido gálico (GAE) por mililitros de amostra (mg GAE mL<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.6.2 DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante pelo método DPPH<sup>•</sup> foi determinada de acordo com Rufino et al. (2007). As amostras misturadas e mantidas por 30 minutos com a solução DPPH foram medidas a 515 nm em espectrofotômetro (UVMINI-1241, Shimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao ácido gálico (GAE) por mililitros de amostra (mg GAE mL<sup>-1</sup>). Estas análises foram determinadas em triplicata.

### 4.7 Análise microbiológica

Nos leites fermentados (controle, 15 e 30) foram determinadas as contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus thermophilus*. De acordo com Vinderola e Reinheimer (2000), para as contagens de *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 (culturas probióticas) foram utilizados ágar MRS modificado com a adição de 0,15 g 100 mL<sup>-1</sup> de bile (MRS-bile) e MRS ágar modificado com adição de 0,20 g 100 mL<sup>-1</sup> de cloreto de lítio e 0,30 g 100 mL<sup>-1</sup> de propionato de sódio (MRS- LP), respectivamente. Foram utilizados 25 g de cada formulação de leite fermentado, coletadas assepticamente e misturadas com 225 mL de água peptonada (0,1 g 100 g<sup>-1</sup>) em Bag Mixer 400 (Interscience, França). Na

sequência foram realizadas diluições seriadas, que foram finalmente plaqueadas utilizando alíquotas de 0,1 mL. Para a contagem de *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  ° C por 72 h. Para a contagem de bifidobactérias, estas placas foram colocadas em jarras de anaerobiose contendo AnaeroGen<sup>®</sup>. A contagem de *S. thermophilus* foi realizada em placa contendo ágar M17 adicionado de lactose ( $10 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), que foi incubada a  $37 \pm 1$  ° C por 48 h, conforme metodologia descrita pela *International Dairy Federation* (IDF, 1997). Após os períodos de incubação, todas as contagens de células viáveis foram realizadas e expressas como log de unidade formadora de colônia por grama de leite fermentado ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ). Estas análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.8 Análise físico-química

Foram determinados os teores de sólidos totais ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), o pH e a acidez titulável ( $\text{g de ácido láctico } 100 \text{ g}^{-1}$ ) denominados controle (sem C3), leite fermentado 15 (com adição de 15% de C3) e leite fermentado 30 (com adição de 30% de C3). O teor de sólidos totais foi obtido por secagem a  $105$  °C, o pH foi determinado em pH metro (Q400AS, Quimis, Brasil), e a acidez titulável, conforme metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

##### 4.8.1 Análise de cor

A cor das amostras de leite fermentado (controle, 15 e 30) foi determinada utilizando colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japão), ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de  $10^\circ$ , previamente calibrado. A escala CIELab foi empregada para medir os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde o parâmetro  $L^*$  representa a luminosidade, variando do preto (0) ao branco (100),  $a^*$  representa a variação da coloração da amostra de verde (-) para vermelho (+) e  $b^*$  representa a variação da coloração de azul (-) para amarelo (+). A diferença total da cor ( $\Delta E^*$ ) entre as amostras adicionadas de C3 em relação a controle foi calculada conforme proposto por Capellas et al. (2001), com modificações (Equação 1):

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

onde  $\Delta L^*$  é a diferença de luminosidade entre a amostra adicionada de C3 em relação ao controle;  $\Delta a^*$  é a diferença entre a intensidade da cor vermelha ou verde e  $\Delta b^*$  é a diferença de intensidade da cor amarela ou azul.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A significância das diferenças entre as médias das amostras foi determinada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando STATISTICA versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para os teores de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante, obtida pelos métodos de ABTS e DPPH<sup>·</sup>, para o suco de morango; para o concentrado C3; e para o leite fermentado denominado controle (sem C3), leite fermentado 15 (com adição de 15% de C3) e leite fermentado 30 (com adição de 30% de C3).

Tabela 2 – Resultado para os teores de compostos fenólicos totais (CFT) e para a atividade antioxidante empregando os métodos ABTS e DPPH<sup>·</sup>, para o suco de morango, para o concentrado obtido do terceiro estágio da crioconcentração (C3), e para os leites fermentados controle (sem C3), leite fermentado 15 (com adição de 15% de C3) e leite fermentado 30 (com adição de 30% de C3).

Amostra	CFT (mg GAE.mL <sup>-1</sup> )	Atividade antioxidante	
		ABTS (mg GAE.mL <sup>-1</sup> )	DPPH (mg GAE.mL <sup>-1</sup> )
Suco de morango	3,42 <sup>b</sup> ± 0,09	0,74 <sup>b</sup> ± 0,04	1,63 <sup>b</sup> ± 0,05
C3	5,07 <sup>a</sup> ± 0,17	1,04 <sup>a</sup> ± 0,06	2,19 <sup>a</sup> ± 0,01
Leite fermentado controle	0,11 <sup>C</sup> ± 0,00	0,08 <sup>C</sup> ± 0,03	0,03 <sup>C</sup> ± 0,00
Leite fermentado 15	0,39 <sup>B</sup> ± 0,03	0,34 <sup>B</sup> ± 0,00	0,12 <sup>B</sup> ± 0,00
Leite fermentado 30	0,90 <sup>A</sup> ± 0,10	0,56 <sup>A</sup> ± 0,01	0,34 <sup>A</sup> ± 0,01

Resultados foram expressos como média ± desvio padrão. mg GAE.mL<sup>-1</sup> = mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra. <sup>a,b</sup> Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras (P < 0,05). <sup>A,C</sup> Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras (P < 0,05). O experimento e as análises foram realizados em triplicata.

Fonte: O autor.

Como esperado, foi observado um aumento no teor de compostos fenólicos totais (P < 0,05) na atividade antioxidante (P < 0,05) do concentrado do estágio 3 (C3), quando comparado ao suco de morango. Esse mesmo comportamento foi relatado por Boaventura et al. (2013) e Nunes et al. (2015), na crioconcentração do extrato aquoso de erva-mate, e por Arend et al. (2017), para suco de morango concentrado por nanofiltração. O mesmo comportamento foi verificado para o leite fermentado com

maior teor de C3 adicionado, ou seja, maiores valores para os compostos fenólicos totais e para a atividade antioxidante foram encontrados no leite fermentado 30, seguido pelo leite fermentado 15, quando comparados com o controle. Aaby et al. (2012) afirmam que leites fermentados enriquecidos com polpa de frutas naturais ricas em compostos fenólicos totais e, portanto, com atividade antioxidante, são capazes de gerar benefícios a saúde de consumidores regulares deste tipo de produto. Como recomendado por Karaçelik et al. (2015) foram realizados duas análises para determinação da atividade antioxidante, porque conforme estes autores um único teste não é capaz de caracterizar o real poder antioxidante de uma amostra, pois os métodos diferem nas estratégias de reação e suas sensibilidades. Assim, podem-se explicar as diferenças de valores observados entre as duas metodologias empregadas na determinação da atividade antioxidante.

Para os três tipos de leites fermentados elaborados são demonstrados na Tabela 3 os resultados para as contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus thermophilus*. A partir destes resultados pode-se verificar que entre as amostras de leites fermentados (controle, 15 e 30) não foram verificadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre as contagens de um respectivo tipo de microrganismo (*L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 ou *S.thermophilus*).

Tabela 3 – Resultados da análise microbiológica (média  $\pm$  desvio padrão) expressos como log de unidade formadora de colônia por grama de leite fermentado (log UFC g<sup>-1</sup>).

<b>Amostra</b>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>acidophilus</i> LA-5	BB-12	<i>thermophilus</i>
Controle	8,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	8,20 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	9,21 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11
Leite fermentado 15	8,66 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	8,07 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	9,15 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02
Leite fermentado 30	8,76 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	8,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	9,13 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02

Leites fermentados controle = sem adição do concentrado proveniente do estágio 3 (C3). Leite fermentado 15 = com adição de 15 % de C3). Leite fermentado 30 = com adição de 30% de C3. <sup>a</sup>Na mesma coluna, letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ( $P > 0,05$ ). O experimento e as análises foram realizados em triplicata.

Fonte: O autor.

*Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 são considerados microrganismos probióticos, no entanto, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2006) para que os mesmos possam desempenhar efeito no organismo, a ingestão diária mínima recomendada deve estar entre 8 e 9 log de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por 100 g de produto. Assim, pode-se observar que a adição do concentrado do suco de morango não afetou a contagem dos microrganismos probióticos. Ranadheera, Baines e Adams (2010) relataram que adições de ingredientes em produtos lácteos podem afetar a sobrevivência de probióticos nos alimentos. Em relação à contagem de *S. thermophilus* foi possível observar que os valores obtidos foram maiores do que 7 log UFC g<sup>-1</sup> do produto. Desta forma, este resultado está de acordo com o *Codex Alimentarius Commission* (2011), que estabelece para a contagem de bactérias lácticas valores maiores do que 7 log de UFC g<sup>-1</sup> do produto. Com estes resultados pode-se afirmar que a adição do C3 não influenciou na contagem dos três microrganismos utilizados.

Os resultados para sólidos totais, pH e acidez titulável dos leites fermentados elaborados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados (média ± desvio padrão) do teor de sólidos totais, pH e acidez titulável do leite fermentado sem adição de C3 (controle), do leite fermentado 15 (com adição de 15 % de C3) e do leite fermentado 30 (com 30 % de C3).

	Amostras		
	Controle	Leite fermentado 15	Leite fermentado 30
Sólidos totais (g 100 g <sup>-1</sup> )	11,25 <sup>c</sup> ± 0,17	12,21 <sup>b</sup> ± 0,05	13,45 <sup>a</sup> ± 0,10
pH	4,65 <sup>a</sup> ± 0,01	3,89 <sup>b</sup> ± 0,01	3,66 <sup>c</sup> ± 0,01
Acidez titulável (g ácido láctico 100 g <sup>-1</sup> )	0,90 <sup>c</sup> ± 0,01	1,29 <sup>b</sup> ± 0,01	1,81 <sup>a</sup> ± 0,01

C3 = é o concentrado do suco de morango proveniente do terceiro estágio da criocentralização. <sup>a,c</sup>Na mesma linha, letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras (P < 0,05). O experimento e as análises foram realizados em triplicata.

Fonte: O autor.

Como esperado, a maior adição de C3 nos leites fermentados contribuiu para o aumento (P < 0,05) do teor de sólidos totais. Assim, a maior quantidade de concentrado

do suco de morango adicionada ao leite fermentado também resultou na diminuição ( $P < 0,05$ ) dos valores de pH e, portanto, maiores ( $P < 0,05$ ) valores para a acidez. Estes resultados estão de acordo com França et al. (2008), que relataram que morangos são frutas cítricas que quando adicionadas em produtos alimentícios tendem a diminuir seu pH e sua acidez.

A Tabela 5 apresenta os resultados para os parâmetros da cor dos leites fermentados controle, 15 e 30. Os resultados demonstram que houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre as três amostras de leites fermentados em relação aos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Como esperado, a amostra sem adição do C3 foi a mais branca, seguida da amostra denominada leite fermentado 15 e, por fim, da amostra leite fermentado 30.

Tabela 5 – Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros da cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E^*$ ) do leite fermentado sem adição de C3 (controle), do leite fermentado 15 (com adição de 15 % de C3) e do leite fermentado 30 (com 30 % de C3).

	Amostras		
	Controle	Leite fermentado 15	Leite fermentado 30
$L^*$	82,56 <sup>a</sup> $\pm$ 2,01	71,71 <sup>b</sup> $\pm$ 1,11	63,24 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02
$a^*$	-2,10 <sup>c</sup> $\pm$ 0,13	10,34 <sup>b</sup> $\pm$ 0,13	18,91 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09
$b^*$	8,41 <sup>b</sup> $\pm$ 0,16	7,38 <sup>c</sup> $\pm$ 0,12	10,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
$\Delta E^*$	-	16,54	27,43

C3 = é o concentrado do suco de morango proveniente do terceiro estágio da crioconcentração. <sup>a,c</sup>Na mesma linha, letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ). O experimento e as análises foram realizados em triplicata.

Fonte: O autor.

Em relação ao parâmetro  $a^*$ , foi possível notar que a amostra controle apresentou uma tonalidade tendendo ao verde, enquanto as duas amostras acrescidas de C3 a uma coloração avermelhada, devido à cor natural deste concentrado. A cor esverdeada observada para leites fermentados, segundo Canella et al. (2018) é devido à presença natural da riboflavina, com coloração esverdeada, no leite. Entretanto, os valores positivos e diferentes ( $P < 0,05$ ) observados para o parâmetro  $b^*$  indicaram que a amostra leite fermentado 30 apresentou maior tonalidade amarelada, seguida da amostra leite fermentado 15 e controle, respectivamente. De acordo com Arend et al.

(2017) a cor atrativa do morango é devida à presença de antocianinas, que são pigmentos naturais. No entanto, a estrutura quimicamente instável da antocianina as torna altamente suscetíveis a vários fatores como, por exemplo, ao pH, aos processos térmicos, à presença de oxigênio, entre outros. Dentre estes fatores o pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (BORDIGNON JÚNIOR et al., 2009). Oliveira et al. (2015) afirmaram que modificações do pH podem influenciar nas reações químicas dos compostos fenólicos, enquanto Bordignon Júnior et al. (2009) relataram que as diferentes formas estruturais da antocianina, são responsáveis pelas pelo surgimento de diferentes colorações. Assim, Bordignon Júnior (2009) e Oliveira et al. (2015) ao avaliarem a influência do pH no teor de antocianinas de morangos, observaram que num pH entre 3 e 4,5, o extrato de morango apresenta uma tendência à coloração amarelada, sendo esta tendência maior num pH próximo de 3. Desta forma, como observado anteriormente, a maior adição do concentrado do suco de morango no leite fermentado contribuiu para uma redução ( $P < 0,05$ ) no valor de pH. Assim, a maior redução no valor do pH, verificado no leite fermentado 30, seguido do leite fermentado 15, poderia ser responsável pelo surgimento da tonalidade amarelada verificada através dos valores do parâmetro  $b^*$ . No entanto, o dobro da quantidade de concentrado do suco de morango adicionada ao leite fermentado 30 não foi capaz de afetar os valores do parâmetro  $a^*$ .

As mudanças nos valores para  $\Delta E^*$  dos leites fermentados foram dependentes da quantidade de C3 adicionado ao leite fermentado, ou seja, foi obtido maior valor para o leite fermentado 30, que apresentou a maior adição do suco concentrado de morango. Buvé et al. (2018) citaram que para produtos adicionados de suco de morango quando o valor de  $\Delta E^*$  é maior do que 3, as mudanças de cor no produto podem ser visíveis aos consumidores. Desta forma, os altos valores para este parâmetro que foi possível notar facilmente a diferença de cor entre as amostras de leites fermentados adicionadas de suco de morango concentrado.

Enfim, os resultados obtidos até o momento, nos incentivam a indicar a utilização do concentrado do suco de morango, proveniente do terceiro estágio da crioconcentração, na elaboração de leites fermentados pela indústria láctea, pois segundo Karaçelik et al. (2015) a importância dos compostos fenólicos e suas atividades

antioxidantes nas frutas, vêm atraindo um interesse crescente entre cientistas, fabricantes de alimentos e bebidas, consumidores e especialistas em saúde.

## 6 CONCLUSÃO

A crioconcentração em blocos foi empregada com sucesso para aumentar os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do suco de morango concentrado obtido do terceiro estágio do processo de crioconcentração em blocos. Depois da adição deste concentrado no leite fermentado, na quantidade de 15 e 30 %, respectivamente, verificou-se que os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante do leite fermentado com 30 % do concentrado foram maiores do que para o leite fermentado com 15 % de concentrado. A contagem dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* não foram afetadas pela adição do concentrado do suco de morango, sendo que todos os leites fermentados elaborados podem ser classificados como produtos probióticos. Quanto maior a adição do concentrado no leite fermentado, maiores foram os teores de sólidos totais e os valores de acidez. A maior incorporação de concentrado do suco de morango ao leite fermentado contribuiu para gerar um produto mais escuro. A intensidade da cor vermelha foi maior quanto maior a adição deste concentrado, no entanto, o leite fermentado com 30 % do concentrado apresentou maior tendência a cor amarelada. Esta cor amarelada pode ser creditada a maior redução no valor do pH verificado no leite fermentado com maior teor de concentrado. Através dos parâmetros da cor dos leites fermentados verificou-se que as diferenças de cor entre os leites fermentados podem ser verificadas facilmente pelos consumidores, sendo este um fator possivelmente determinante na escolha do produto.

## REFERÊNCIAS

- AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ABDOLLAHZADEH, S. M. et al. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 577-582, 2018.
- AIDER, M.; HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maplesap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 65-72, 2008.
- AIDER, M.; HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.
- AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v.82, p.92-102, 2007.
- AKIN, Z.; OZCAN, T. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. **LWT- Food Science and Technology**, v. 86, p.25-30, 2017.
- AREND, G. D. et al. Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 36-41, 2017.
- ARIZA, M. T. et al., Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. **Food Chemistry**, v. 248, p. 155-165, 2018.
- BATISTA, A. L. D. et al. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 242-250, 2017.
- BELÉN, F. et al. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 364-373, 2012.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686-692, 2013.
- BORDIGNON JÚNIOR et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183-188, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de

Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 outubro 2007, sec. 1, p. 4. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Acesso em: 01 de outubro de 2018.

BUVÉ, C. et al. Combining untargeted, targeted and sensory data to investigate the impact of storage on food volatiles: a case study on strawberry juice. **Food Research International**, v. 113, p. 382-391, 2018.

CANELLA, M. H. M. et al. Use of concentrated whey by freeze concentration process to obtain a symbiotic fermented lactic beverage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 56-68, 2018.

CAPELLAS, M. et al. Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats' milk cheese (Mató). **International Dairy Journal**, v. 11, n. 3, p. 165-173, 2001.

CASAROTTI, S. N. et al. Guava, orange and passion fruit by-products: characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 69-76, 2018.

CHA, K. H. et al. Effects of fermented milk treatment on microbial population and metabolomic outcomes in a three-stage semi-continuous culture system. **Food Chemistry**, v. 263, p. 216-224, 2018.

CHANG, Y.H.; HARTEL, R.W. Flow properties of freeze-concentrated skim milk. **Journal of Food Engineering**, v.31, p.371-386, 1997.

FAO. **Probiotics in Food Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. Report of a Joint FAO/WHO, Rome, Italy, 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em: 25 de setembro de 2018.

FRANÇOSO, I. L. T. et al. Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria anassa* Duch.) irradiados e armazenados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 614-619, 2008.

HERNÁNDEZ, E. et al. Concentration of apple and pear juices in a multi-plate freeze concentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 348-355, 2009.

HOSSAIN, A. et al. Nutrient composition of strawberry genotypes cultivated in a horticulture farm. **Food Chemistry**, v. 199, p. 648-652, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Yogurt**: enumeration of characteristic microorganisms. v. 117B. Bruxelas, 1997.

JASTER, H. et al. Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. **Food Research International**, v. 104, p.119-125, 2018

KARAASLAN, M. et al. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1065-1077, 2011.

KARAÇELİK, A. A. et al. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. **Food Chemistry**, v. 175, p. 106-114, 2011.

MORENO, F. L. et al. Block freeze-concentration of coffee extract: effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 158-166, 2014.

NUNES, G. L. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.

OLIVEIRA, M. N. **Fermented milks**: fermented milks and yogurt, v. 1, São Paulo: Elsevier, 2014.

OLIVEIRA, A. et al. Phytochemicals preservation in strawberry as affected by pH modulation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 74-83, 2015.

PICCOLI, K. R. **Influência da crioconcentração nas propriedades reológicas de sucos de uva**. 2015. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Técnica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

QIU, S.; WANG, J.; GAO, L. Qualification and quantisation of processed strawberry juice based on electronic nose and tongue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 115-123, 2015.

QUINATO, E. E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. Aspectos nutricionais e funcionais do morango. **Visão Acadêmica**, v. 8, n. 1, p. 11-17, 2007.

RAHMAN. M. M. et al. Characterization and field performance of 15 strawberry germplasm under Bangladesh conditions. **SAARC Journal of Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 81-94, 2013.

RANADHEERA, R. D. C. S; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA, D. A. et al. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1124-1128, 2008.

RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G. et al. Thermally-treated strawberry extrudate: a rich source of antioxidant phenols and sugars. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.017>.

RUFINO, M. S. M. et al. **Comunicado técnico, metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007. 4 p.

SÁNCHEZ, J. et al. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 644-651, 2010.

SÁNCHEZ, J. et al. Review: freeze concentration technology applied to dairy products. **Food Science and Technology International**, v. 17, p. 5-13, 2011.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

WANG, J. et al. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. **Food control**, v. 96, p. 128-136, 2019.

WIECHETECK, F. V. B. Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçãs. **Publicação da UEPG em Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, v. 11, n. 1, p. 27-34, 2005.

YAMAMOTO, N. **Fermented milks**: health effects of fermented milks, Japão: Elsevier, p. 1-7, 2016.

YEE, P. L. et al. Effects of single food components on freeze concentration by freezing and thawing technique. **Japan Journal of Food Engineering**, v. 4, p. 77-83, 2003.