

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE *CREAM CHEESE*  
SIMBIÓTICO: CARACTERIZAÇÃO E PERFIL  
LIPÍDICO COM ÊNFASE EM ÁCIDO LINOLÉICO  
CONJUGADO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Larissa de Lima Alves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**DESENVOLVIMENTO DE *CREAM CHEESE* SIMBIÓTICO:  
CARACTERIZAÇÃO E PERFIL LIPÍDICO COM ÊNFASE EM  
ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO**

**por**

**Larissa de Lima Alves**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neila S.P.S. Richards**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE *CREAM CHEESE* SIMBIÓTICO:  
CARACTERIZAÇÃO E PERFIL LIPÍDICO COM ÊNFASE EM ÁCIDO  
LINOLÉICO CONJUGADO**

elaborada por  
**Larissa de Lima Alves**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Neila S.P.S Richards, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Alexandre Cichoski, Dr (URI)**

---

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup> (UFSM )**

Santa Maria, 16 de Março de 2009.

Dedico este trabalho a meus pais,  
Neiva e Pedro Genaro,  
alicerce da minha vida e exemplo de amor incondicional.  
Se eu me tornar metade da mãe que você foi,  
já me sinto com a missão cumprida...  
Sem vocês o sonho da graduação não teria sido realizado,  
tampouco o de ter me tornado Mestre.  
E não acabou...  
Ainda falta a caminhada do Doutorado!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho desde sempre e para sempre, escrevendo meu destino “certo por linhas tortas” e por me fazer gostar tanto dos livros e da pesquisa desde criança.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade da graduação e pós-graduação... Considerarei-me eternamente parte desta universidade e destes prédios que me acolheram por mais de sete anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil) pela concessão da bolsa de mestrado no segundo ano, justo quando precisava de mais tempo para me dedicar ao trabalho.

Aos meus pais, Neiva e Pedro Genaro, por o serem em tempo integral. Agradeço pelo apoio quando decidi seguir estudando, mesmo quando o destino da maioria dos graduados é trabalhar.... Agradeço também pelo apoio financeiro no primeiro ano do mestrado.

Ao meu irmão, Pedro, por ter sido meu “primeiro aluno” quando brincávamos de “escolinha” na infância e eu dava aula para alguém que nem alfabetizado era. Obrigada por me tornar uma pessoa menos egoísta e dizer que é orgulhoso da irmã.

Ao afilhado mais lindo do mundo, Arthur Pires, por encantar meus dias e ser o primeiro a chamar a dinda de “cientista”, mesmo que a “cientista” aqui seja de alimentos.

À Neila Richards, por aceitar me orientar mesmo sem conhecer a fundo meu trabalho e por aguentar minhas inúmeras perguntas e idas à sua sala... Obrigada pela amizade e por me fazer apaixonar ainda mais pela área de laticínios.

À Leila Piccoli, que me orientou nos primeiros passos da pesquisa e é uma das principais responsáveis por meu entusiasmo com laboratório. Obrigada por me aceitar no NIDAL no 1º semestre da graduação, quando eu nem sequer conhecia o nome da vidraria; e obrigada por tudo que me ensinou. À Profª Tatiana Emanuelli, exemplo a ser seguido como pesquisadora (espero um dia chegar perto da sua capacidade).

A todos os professores e funcionários do Depto. de Tecnologia e Ciência de Alimentos da UFSM pela minha formação e auxílio prestados. Em especial, à Profª Luisa, à Liana Milani, à Ana Paula Rezer, e à Marialene Manfio, que contribuíram em muito para a concretização deste.

Ao Projeto Casadinhos, que me deu a oportunidade de fazer parte das análises em uma universidade tão bem conceituada como a UNICAMP. À Profª Neura Bragnolo, por ter me

acolhido em seu laboratório com tanto carinho. E às doutorandas Gislaine e Lílian, por valorosas contribuições para este trabalho.

Aos meus estagiários e colaboradores, Mônica Teixeira, Diego Andrade, Mateus Potrich e Gustavo Scipioni. E em especial à Paula Mattanna, que se dedicou integralmente comigo neste trabalho. Sem a colaboração de vocês esta dissertação não existiria. Espero ter despertado em vocês algum amor pela pesquisa.

Ao meu braço direito (e muitas vezes esquerdo), colega e amiga, Larissa Becker, pelo apoio, ajuda e amizade sincera.

Às colegas e “baita” amigas Milena Bagetti, Anne Y Castro e Tiffany Hautrive. Meninas, valeu pelas sugestões e principalmente pelas horas de lazer regadas a muita conversa e pizza. Aos meus colegas de mestrado pela companhia e amizade, especialmente Magda Monego e Fabrício Brum.

Aos meus amigos de infância, Lara Becker, Diogo Brum e Eduardo Vargas. Foi com vocês naquelas distantes Feiras de Ciências do ensino fundamental que engatinhei na pesquisa... E à Prof<sup>a</sup> Vânia Becker, pela orientação daquela época. Obrigada pela amizade e apoio desde aqueles tempos, meus “anjos da guarda” e amigos eternos.

E por último, mas com certeza não menos importante, agradeço ao “amor da minha vida, daqui até a eternidade”, Dreifus Medeiros Costa, por existir em minha vida e me fazer tão feliz. Obrigada por entender a distância, a falta de tempo e a dedicação que tive que dispensar para realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta dissertação, muitíssimo obrigada.

“Pode-se viver uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar; trabalhar pelo que se ama e amar aquilo que se trabalha.”

*(Liev Tolstói, escritor russo, 1828-1910)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### DESENVOLVIMENTO DE CREAM CHEESE SIMBIÓTICO: CARACTERIZAÇÃO E PERFIL LIPÍDICO COM ÊNFASE EM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO

AUTORA: LARISSA DE LIMA ALVES

ORIENTADOR(A): NEILA S.P.S. RICHARDS

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2009.

Derivados lácteos compõem a maior parte dos alimentos funcionais disponíveis no mercado. Queijos frescos são propícios à adição de probióticos por seu pH, acidez e umidade favoráveis. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do *cream cheese* em atuar como condutor de probióticos, as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais e o perfil lipídico do produto quando adicionado de prebiótico e probióticos. As formulações de *cream cheese* foram elaboradas com adição de diferentes concentrações de probiótico (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e de prebiótico (inulina), em quantidades adotadas de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional, totalizando 12 ensaios, sendo 4 fatoriais, 4 axiais, 3 repetições no ponto central e 1 tratamento-controle. As características foram avaliadas durante o armazenamento do produto por 45 dias a 8°C. Não foi observada mudança significativa nas características físico-químicas quanto a gordura, proteína e cinzas em comparação à formulação-controle, enquanto o teor de umidade foi alterado pela adição do prebiótico. A superfície de resposta foi elaborada para verificar a influência das diferentes concentrações de inulina e probióticos sobre o pH e acidez (expressa em ácido láctico) das formulações durante o armazenamento, tendo somente os termos linear e quadrático da concentração de probióticos apresentado significância ( $p < 0,05$ ). O pH e acidez titulável das formulações influenciaram a viabilidade das culturas, tendo a cultura *starter* (*S. termophilus*) alta viabilidade durante todo o armazenamento. *Bifidobacterium animalis* apresentou contagens acima de  $10^6$  UFC/g durante todo o período, garantindo a potencialidade probiótica de todas as formulações. As contagens de *Lactobacillus acidophilus* declinaram ao longo do armazenamento, provavelmente por competição com a cultura *starter*. A avaliação dos atributos sensoriais (aparência global, cor, aroma, textura, acidez e sabor) foi realizada através de teste com escala hedônica de 7 níveis e teste de ordenação. Não foi encontrada diferença estatística pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) na avaliação por escala hedônica, tampouco preferência significativa no teste de ordenação. Os termos linear, quadrático e de interação da regressão linear múltipla não foram significativos ( $p > 0,05$ ) para nenhum dos parâmetros sensoriais avaliados; somente o intercepto da equação de cada atributo apresentou significância estatística ( $p < 0,01$ ). O perfil lipídico das formulações não foi significativamente alterado pela adição de diferentes concentrações de probiótico, sendo as quantidades de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e trans semelhantes aos do leite usado como matéria-prima e à formulação-controle. As diferentes concentrações de probiótico igualmente não alteraram a concentração de ácido linoléico conjugado (CLA) em relação ao controle, provavelmente pela reduzida concentração de cultura usada, baixa viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante ao armazenamento e ao fato de *cream cheese* ter vida-de-prateleira breve, com curto espaço de tempo para formação do CLA. Conclui-se que o *cream cheese* adicionado das concentrações estudadas de pre- e probiótico apresenta potencial funcional; entretanto, a quantidade de probióticos não aumentou o teor de CLA em relação às quantidades do produto tradicional.

**Palavras-chave:** *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, inulina, ácido linoléico conjugado.



## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Graduate Program on Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC CREAM CHEESE: CHARACTERIZATION AND LIPID PROFILE WITH EMPHASIS ON CONJUGATED LINOLEIC ACID

AUTHOR: LARISSA DE LIMA ALVES

ADVISER: NEILA S.P.S. RICHARDS

Date and Place of Defense: Santa Maria, March, 16<sup>th</sup>, 2009

Dairy products form the major part of functional foods available on market place. Fresh cheeses are propitious to addition of probiotics due to their suitable pH, acidity and moisture. The objective of this study was evaluate the potential of cream cheese as a vehicle of probiotics, the physical-chemical, microbiological and sensory characteristics and the lipid profile of this product when additioned of prebiotic and probiotics. Treatments of cream cheeses were produced with addition of different levels of probiotics (*Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus*) and prebiotic (inulin) in amounts according to Central Composite Design, totalizing 12 treatments, with 4 factorial, 4 axial, 3 repetitions on central point and 1 control. The characteristics were evaluated in all treatments during storage for 45 days at 8°C. No significant changes were observed on physical-chemical characteristics of fat, protein and ash in comparison with control, while moisture was altered by prebiotic addition. The surface response was done to verify the influence of different levels of inulin and probiotic on pH and tritable acidity during storage; only linear and quadratic terms of probiotic level were significant ( $p < 0,05$ ). The pH and tritable acidity affect the viability of cultures; starter culture (*S. termophilus*) exhibited high viability during storage. *Bifidobacterium animalis* showed counts above  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  during all period, assuring the probiotic potential in all treatments. The counts of *Lactobacillus acidophilus* reduced along storage, probably by competition with starter culture. Assessment of sensory attributes (global appearance, color, aroma, texture, acidity and taste) was evaluated using test with hedonic scale of 7 levels and ordering test. No significant difference was found by Tukey's test ( $p > 0,05$ ) on assessment using hedonic scale, neither on the ordering test. The linear, quadratic and interaction terms of multiple linear regression were not significant ( $p > 0,05$ ) for any sensory attribute; only the intercept of each equation was significant ( $p < 0,01$ ). Lipid profile was not significantly changed by the different levels of probiotic, with amounts of saturated fatty acids, monounsaturated, polyunsaturated and trans fatty acids similar to that of the milk used on cheese manufacture and control. The different levels of probiotic no altered the concentration of conjugated linoleic acid (CLA) in comparison with control, probably due to the low addition of probiotic, the reduced viability of *Lactobacillus acidophilus* during storage and the short shelf-life of cream cheese, with small time to produce CLA. In conclusion, cream cheese with addition of prebiotic and probiotic on levels of this study showed functional potential; nevertheless, the amount of probiotic used does not increase the concentration of CLA compared to the traditional product.

**Keywords:** *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, inulin, conjugated linoleic acid.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1 Cream cheese</b> .....	12
<b>2.2 Probióticos</b> .....	13
2.2.1 Conceitos e propriedades fisiológicas.....	13
2.2.2 Bactérias probióticas em lácteos funcionais.....	15
<b>2.3 Prebióticos</b> .....	16
<b>2.4 Ácido linoléico conjugado (CLA)</b> .....	18
2.4.1 Histórico do CLA.....	18
2.4.2 Estrutura química e propriedades fisiológicas.....	18
2.4.3 Fatores que influenciam os teores de CLA.....	20
2.4.3.1 Influência da composição química e do processamento no teor de CLA.....	23
<b>3 MANUSCRITOS E ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	24
<b>3.1 Manuscrito 1</b> .....	25
<b>3.2 Artigo 1</b> .....	49
<b>3.3 Manuscrito 2</b> .....	72
<b>4 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	94
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	96
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	97
<b>ANEXOS</b> .....	109

# 1 INTRODUÇÃO

A estreita relação entre o consumo de alimentos funcionais e a manutenção da boa saúde tem estimulado o desenvolvimento de novos produtos dotados de propriedades terapêuticas. Os derivados do leite compõem a maior gama de produtos funcionais industrializados atualmente disponíveis no mercado, com alegações funcionais principalmente pela adição de bactérias probióticas (MATILLA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

Ao mesmo tempo, o leite e seus derivados são uma reconhecida fonte de gorduras na dieta humana. Contudo, nas últimas décadas a gordura dos alimentos tem sido associada ao aumento da incidência de doenças cardíacas, sendo recomendada a diminuição do consumo de produtos gordurosos e conseqüentemente os que têm o leite como base. Este efeito negativo está relacionado ao alto conteúdo de gorduras saturadas de leite e derivados; no entanto, as gorduras oriundas de laticínios também são importantes fontes de compostos com efeitos benéficos à saúde, como butirato, esfingolipídeos, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e o recentemente descoberto ácido linoléico conjugado (CLA) (SHORTT & O'BRIEN, 2004). Diversos estudos comprovaram a potente atividade anticarcinogênica deste ácido graxo, além de atuar como antioxidante, redutor do peso corporal e como agente anti-aterosclerose, entre outras propriedades fisiológicas (SIEBER et al., 2004; LUNA et al., 2007).

A formação do CLA ocorre principalmente no estômago de ruminantes por ação da bactéria anaeróbica *Butyrivibrio fibrisolvens*, de onde passa para a carne e o leite do animal (BAUMAN et al., 2003). Todavia, é sabido que outras colônias de bactérias possuem capacidade de formar o CLA quando adicionadas a laticínios em condições adequadas (AKALIN et al., 2004). Pesquisas que visam estudar novas colônias formadoras de ácido linoléico conjugado, bem como formular hipóteses para os mecanismos que levam à formação do CLA por estes micro-organismos vêm sendo constantemente realizadas na última década.

Sabe-se que as bactérias bífidas (*Bifidobacterium ssp.*) e o gênero *Lactobacillus* são aptos a converter o ácido linoléico em ácido linoléico conjugado, tanto isoladamente quanto associados a outros micro-organismos (AKALIN et al., 2004; COAKLEY et al., 2003). Aliado a isso, possuem comprovada atividade probiótica, ou seja, produzem benefícios ao hospedeiro, agregando valor nutricional ao produto em que são adicionadas.

Da mesma forma, substâncias prebióticas afetam benéficamente o organismo pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de apenas um ou mesmo de um número limitado de bactérias (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Dentre os prebióticos mais conhecidos e estudados até o momento encontra-se a inulina, um frutoligossacarídeo que produz significativo incremento na viabilidade de probióticos, especialmente sobre *Bifidobacterium* (ÖZER; AKIN & ÖZER, 2005). Sendo assim, espera-se que a adição de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* conjuntamente com a adição de inulina em *cream cheeses* aumente o teor de CLA em relação aos teores atualmente encontrados para este produto.

Neste âmbito, o presente estudo foi realizado, tendo como objetivos:

- Desenvolver uma formulação de *cream cheese* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e prebiótico (inulina) em baixas concentrações, mas sem perder a potencialidade funcional;
- Analisar as características físico-químicas e microbiológicas das formulações;
- Avaliar a aceitação sensorial das formulações;
- Estudar o efeito da adição de diferentes concentrações das culturas probióticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* sobre o perfil lipídico de *cream cheese*, enfocando especialmente no teor de ácido linoléico conjugado (CLA).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Cream cheese*

O surgimento do *cream cheese* data de 1927, quando o pesquisador norte-americano Arthur C. Dahlberg publicou um trabalho histórico em que descrevia a fabricação de um queijo tipo creme que viria a agradar grandemente os apreciadores de queijos de sabor mais leve nos Estados Unidos (ALBUQUERQUE, 2002). Segundo outra versão, há indícios de que o *cream cheese* já teria sido fabricado pela primeira vez no século anterior, em 1872, quando um leiteiro da cidade de Chester, em Nova York, EUA, teria desenvolvido um queijo feito a partir de creme e leite integral. De acordo com esta versão, este queijo chegou ao comércio em 1880, pelas mãos de A. L. Reynolds, distribuidor da área queijeira de Nova York com o nome comercial de *Philadelphia Brand* (PHILADELPHIA, 2009).

Na época, os produtos originados ou associados a esta cidade remetiam a uma qualidade superior no que dizia respeito à indústria alimentícia, referindo-se a tais produtos como com “qualidade Philadelphia”. Esta denominação se tornou praticamente um sinônimo do *cream cheese* em todo o mundo, quando o conglomerado *Kraft Foods* passou a deter a marca “*Philadelphia Cream Cheese*” para sua linha de *cream cheeses*, atendendo hoje a mais de 50 países que apreciam o produto sob o apelo comercial de ser “o pedaço mais leve do paraíso” (KRAFT FOODS, 2007).

O *cream cheese* caracteriza-se por ter uma consistência finíssima, untuosa, macia e um flavor levemente ácido (ALBUQUERQUE, 2002; SAINANI, VYAS & TONG, 2004). Atualmente é fabricado através de processos avançados, inclusive ultrafiltração, mas a versão tradicional de fabricação preconiza que primeiramente seu teor de gordura seja padronizado com creme para 12%, passando-se a seguir para as fases de pasteurização, homogeneização, inoculação e fermentação. Após obter-se a coalhada, esta é dessorada por cerca de 18 horas e acrescida de sal e estabilizadores para ser bem homogeneizada e finalmente embalada (FURTADO & NETO, 1994).

Há uma grande variedade de *cream cheeses*, com diferentes teores de matéria-seca e gordura. Pela legislação americana, deve conter no mínimo 33% de gordura e no máximo 55% de umidade (FURTADO & NETO, 1994). Os padrões canadenses exigem quase os

mesmos valores, porém um mínimo de 30% de gordura. Na França, é comum o consumo do *cream cheese* “triplé crème”, cujo mínimo de gordura é de 75% na matéria seca (SANCHEZ et al., 1996). A legislação brasileira carece até o momento de padrões de identidade e qualidade específicos para *cream cheese*, facultando referências de fabricação para a indústria queijeira e impossibilitando comparações entre diferentes marcas comerciais que tenham como base a legislação.

Por ser rico em creme, o *cream cheese* permite adaptar-se a um grande número de combinações e ocasiões conforme a consistência e os hábitos culinários de cada país. Nos EUA é consumido mais mole, próprio para espalhar em pães e sanduíches e compor molhos de saladas (SANCHEZ et al., 1996). Já em muitos países da Europa é mais apreciado na forma de queijo, com textura mais firme para ser servida em fatias; na Itália, é comum ser cortado em grandes pedaços para incrementar saladas. No Japão, é apreciado como um patê para passar na casca do pão. Também é muito comum seu uso como ingrediente básico para o bolo de queijo (*cheese cake*) nos EUA (KRAFT FOODS, 2007). No Brasil, apesar do consumo ainda ser baixo quando comparado a outros países, o *cream cheese* vem tendo penetração crescente no mercado queijeiro; somente entre os anos 2000 e 2004 houve um incremento de mais de 28% na sua produção nacional (BRASIL, 2004).

## 2.2 Probióticos

### 2.2.1 Conceitos e propriedades fisiológicas

O trato gastrointestinal de um ser humano adulto é colonizado por aproximadamente  $10^{14}$  células microbianas por grama (LUCKEY & FLOCH, 1972), cerca de dez vezes mais que todos os tecidos do corpo humano juntos. Este imenso número sugere fortes efeitos regulatórios nas funções corporais, especialmente no cólon onde se encontra a maior concentração de micro-organismos, em torno de  $5 \times 10^{11}$  células bacterianas por grama de tecido. Com uma representação de mais de 400 espécies, estes micro-organismos nativos incluem diversos gêneros de bactérias, especialmente os gram-positivos anaeróbicos *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Bifidobacterium*. Outros grupos minoritários como *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* também se fazem presentes,

desempenhando funções importantes na manutenção da flora intestinal (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002).

De fato, as pesquisas realizadas nas últimas décadas confirmam a importância da população microbiana do trato gastrointestinal nas funções do organismo. Segundo Holzapfel & Schillinger (2002), a associação benéfica de micro-organismos com o hospedeiro humano foi sugerida há mais de 100 anos por Döderlein (1892) para bactérias vaginais; e mais adiante para bactérias ácido-lácticas do intestino em estudos conduzidos por Moro (1900), Beijerinck (1901) e Cahan (1901). Posteriormente, Vergio (1954) introduziu o termo “probiótico”, ao comparar em seu manuscrito “Anti – und Probiotika” os efeitos deletérios dos antibióticos e os benéficos produzidos por substâncias favoráveis à microflora intestinal, que denominou “Probiotika”. Lilly e Stillwell (1965) elaboraram o primeiro conceito de probióticos, se referindo como “micro-organismos que promovem o crescimento de outros”. Atualmente, existem diversas definições para o termo probiótico, mas de modo geral há um consenso de que são “micro-organismos viáveis que promovem ou favorecem o balanço benéfico da população nativa do trato gastrointestinal” (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). Tais micro-organismos não necessitam ser habitantes constantes do intestino, mas devem proporcionar efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FULLER, 1989). Diversas benesses estão associadas aos probióticos, dentre as mais importantes estão as compiladas por Holzapfel & Schillinger (1998) e Matilla-Sandholm & Saarela (2003):

- Produção de vitaminas e disponibilização de minerais e elementos-traço;
- Produção de enzimas digestivas como a  $\beta$ -galactosidase;
- Auxílio na restauração da flora intestinal após diarreias infecciosas;
- Redução do colesterol LDL;
- Estimulação do sistema imune;
- Aumento da motilidade do intestino, com conseqüente redução da constipação;
- Aumento da resistência à colonização de patógenos no intestino;
- Manutenção da integridade da mucosa;
- Proteção contra alguns tumores cancerígenos;
- Proteção adicional contra doenças coronárias.

### 2.2.2 Bactérias probióticas em lácteos funcionais

A maioria das bactérias com propriedades probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, membros comuns mas não dominantes da nossa flora gastrointestinal (MATILLA-SANDHOLM & SAARELA, 2003). O potencial probiótico de tais bactérias vem sendo discutido em inúmeras revisões, citando as propriedades adicionais de redução da intolerância à lactose e a gastroenterites infantis, além dos efeitos supracitados (SHORTT & O'BRIEN, 2004). Por sua comprovada atividade biológica, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são também os mais comumente adicionados em lácteos com alegações funcionais (SHAH, 2000).

A maior gama dos produtos contendo probióticos é composta por leites fermentados como o iogurte, concentrando-se no estudo da viabilidade das culturas microbianas durante o armazenamento, nas propriedades físico-químicas e organolépticas de tais produtos e nos possíveis mecanismos dos efeitos probióticos (YILMAZTEKIN, BARBAROS & ATASOY, 2004). No entanto, outros derivados lácteos enriquecidos com probióticos vêm sendo desenvolvidos, visando oferecer ao consumidor maior variedade de produtos funcionais. Hekmat & McMahon (1992), Davidson et al. (2000) e Alamprese et al. (2002) testaram culturas probióticas em sorvetes e *frozen-yogurts*, observando que apesar da estocagem à baixas temperaturas afetar a viabilidade das culturas, a elaboração de produtos atrativos pelo sabor refrescante pode ser uma boa opção de fornecer probióticos à dieta. Leite em pó contendo probióticos também constitui uma alternativa interessante, embora avaliado em menor proporção. Estudos demonstram que a maioria das bactérias pode ser liofilizada com  $10^{12}$  UFC/g e posteriormente incorporadas ao leite em pó ou similares (SAXELIN et al., 1999).

Contudo, dados da literatura indicam que os queijos são os lácteos ideais para a condução de probióticos no trato gastrointestinal, por seu pH elevado em relação aos leites fermentados e alto teor de umidade e gordura (VINDEROLA et al., 2000; YILMAZTEKIN, BARBAROS & ATASOY, 2004). Neste contexto, os queijos frescos se destacam com diversos estudos sobre a viabilidade das culturas e as mudanças nas características físico-químicas e sensoriais ocorridas pela adição de probióticos. Buriti et al. (2007) testaram *Lactobacillus paracasei* em *cream cheese* fresco, garantindo alta viabilidade do microorganismo por 21 dias de armazenamento a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ . Em outro trabalho, Buriti et al. (2005) adicionaram 1% de *Lactobacillus acidophilus* em queijo Minas frescal, avaliando as implicações da adição do probiótico sobre as características texturais e sensoriais do produto;



os autores observaram maior firmeza no queijo contendo probiótico em relação ao controle, mas o painel sensorial indicou que esta adição melhorou os atributos sensoriais do queijo. Outra cepa de *Lactobacillus acidophilus* foi usada no estudo de Kasimoglu, Göncüoglu & Akgün (2004) em queijo branco fresco, onde os autores relatam alta viabilidade do probiótico durante armazenamento e melhoria da aceitabilidade sensorial quando o queijo foi acrescido do micro-organismo. Sendo assim, o *cream cheese* parece ser uma alternativa interessante como alimento condutor de probióticos.

Contudo, a viabilidade das culturas probióticas pode ser afetada por fatores presentes nos queijos ao longo do armazenamento, como o baixo pH e a presença de oxigênio e acidez (LANKAPUTHRA et al., 1996). Alguns autores consideram arriscada a adição de bactérias bífidas como probióticas, uma vez que são difíceis de serem isoladas e manipuladas por serem anaeróbicas. Quando isoladas, não toleram bem ambiente ácido, sendo, portanto, difíceis de serem carregadas em alguns lácteos. Uma alternativa para o aumento de bactérias bífidas no trato gastrointestinal é o emprego de substâncias conhecidas como prebióticos (FERREIRA & TESHIMA, 2000). A interação entre o probiótico e prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico através do consumo de prebiótico. Isto deve resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico se este for consumido juntamente com o prebiótico (PUUPONEN-PIMIÄ et al., 2002), proposta esta sugerida no presente trabalho.

### **2.3 Prebióticos**

O termo prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não digerível pela maioria dos micro-organismos do intestino e que afeta beneficemente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de apenas um ou de um número limitado de bactérias no cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Como exemplo de substâncias prebióticas pode-se citar alguns oligossacarídeos como a lactulose, lactitol, lactosacarose, rafinose, fruto-oligossacarídeos (FOS), e polissacarídeos como a inulina e o amido resistente (CONWAY, 2001). Entre os oligossacarídeos de ocorrência natural, os fruto-oligossacarídeos (FOS) são os principais compostos reconhecidos e utilizados em alimentos aos quais se atribuem propriedades prebióticas (NITSCHKE, 2002). Dependendo do comprimento da cadeia, definida pelo número de unidades de monossacarídeos, e também chamada grau de

polimerização (DP), os FOS podem ser chamados de oligofrutoses (DP < 10, DP média = 4,8) ou inulina (DP 2 - 60, média = 12) (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

A inulina é um dos materiais de reserva de várias plantas e é encontrado na raiz da chicória, na dália e na alcachofra, além de outras plantas (NINESS, 1999). Quimicamente consiste de uma longa cadeia de moléculas de frutose e uma molécula de glicose no final, característica esta que a faz poder se enquadrar dentre os fruto-oligossacarídeos. Industrialmente, é obtida a partir da raiz da chicória por extração a altas temperaturas, seguida de um processo de exclusão de íons. (HENELLY et al., 2006) Do ponto de vista fisiológico, por não sofrer hidrólise enzimática no corpo humano, a inulina possui características de fibra alimentar, em especial da fração solúvel desta. À inulina vêm sendo atribuídas propriedades fisiológicas de redução de lipídeos e colesterol na corrente sanguínea, bem como regulação do trânsito gastrointestinal e aumento da absorção do cálcio (ROBERFROID, 1993).

No entanto, é na função prebiótica que se vislumbra uma das maiores propriedades funcionais da inulina. Fruto-oligossacarídeos como a inulina tem sido testados em diversos estudos para aumentar a sobrevivência e colonização de bactérias probióticas em alimentos que os contêm em associação. Özer, Akin & Özer (2005) relatam que a adição de 0,5% ou 1% de inulina em iogurtes aumentou em grande extensão o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* BB-02, embora não tenha exercido o mesmo efeito em *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Akalin et al. (2007) elaboraram iogurtes probióticos com culturas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* isoladas e/ou com 2% de fruto-oligossacarídeos, aumentando o teor de CLA em 1,58 vezes quando testaram *L. acidophilus* e em 1,75 vezes ao testar *B. animalis*, ao comparar ambos com o iogurte controle (*S. termophilus* e *L. bulgaricus*). Contudo, ao suplementar as formulações com o fruto-oligossacarídeo, o aumento do teor de CLA foi mais significativo: 2,71 vezes para tratamento com *L. acidophilus* + FOS e em 2,90 vezes para *B. animalis* + FOS, concluindo que a adição de culturas probióticas aumentou o teor de CLA, todavia quando associadas a um prebiótico o incremento é ainda mais expressivo.

## 2.4 Ácido linoléico conjugado (CLA)

### 2.4.1 Histórico do CLA

Na década de 70, Pariza e colaboradores sugeriram que a carne bovina grelhada possuía um componente carcinogênico, buscando desde então identificar este componente (PARIZA et al., 1979). Em outro estudo, observaram que extratos de carne bovina possuíam tanto componentes mutagênicos quanto compostos antimutagênicos e que este estava presente independente do cozimento, ao contrário do que se acreditava anteriormente (PARIZA et al., 1983).

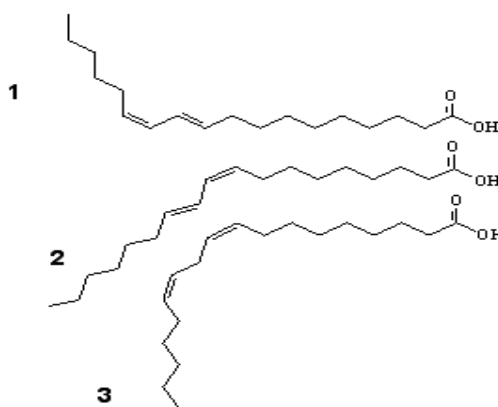
Em 1985, Pariza & Hargraves demonstraram que este extrato de carne bovina era capaz de inibir a progressão de tumores em células epiteliais de camundongos (PARIZA & HARGRAVES, 1985). Somente após dois anos, Ha et al. (1987) isolaram e caracterizaram este desconhecido componente antimutagênico da fração lipídica da carne, através de técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrofotômetro de Massas, Espectro Ultravioleta e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Neste trabalho, os autores descobriram que a fração isolada continha quatro isômeros do ácido linoléico, sendo que cada um continha um sistema de ligação conjugada, portanto sendo designados ácidos linoléicos conjugados (CLAs).

Desde então, diversos estudos confirmaram a atividade anticarcinogênica do CLA, fato este que os levaram a ser considerados pela *National Academy of Sciences* como os únicos ácidos graxos que, indubitavelmente, são capazes de inibir a carcinogênese em animais experimentais (HAYASHI, 2003).

### 2.4.2 Estrutura química e propriedades fisiológicas

O ácido linoléico conjugado refere-se a uma mistura de isômeros do ácido octadecadienóico, mais conhecido como ácido linoléico (18:2 n-6), em que as duplas ligações são conjugadas em vez de existirem na configuração interrompida metilênica típica. (SANTOS et al., 2001; MOURÃO et al., 2005). A conjugação ocorre no rúmen de animais pela enzima ácido-linoléico isomerase, proveniente da bactéria anaeróbica ruminal

*Butyrivibrio fibrisolvens*, durante a conversão do ácido linoléico (18:2) em oléico (18:1) como um primeiro intermediário da biohidrogenação; ou através da conversão endógena do ácido vacênico (11-trans C18:1). A conjugação da ligação dupla é geralmente nas posições 9 e 11 ou 10 e 12, podendo originar até oito diferentes isômeros nas configurações cis ou trans; porém, é no isômero 9-cis, 11-trans que se encontra a maior atividade biológica do CLA (COLLOMB et al., 2006; SHORTT & O'BRIEN, 2004). A estrutura do ácido linoléico e dois de seus isômeros conjugados podem ser observados na Figura 1.



**Figura 1. Estruturas dos isômeros do ácido linoléico 1) isômero CLA (10-trans, 12-cis); 2) isômero CLA (9-cis, 11-trans); 3) ácido linoléico (18:2; 9-cis, 12-cis). Adaptado de: FUNK, BARRERA-ARELLANO & BLOCK, 2006.**

Outras bactérias são capazes de produzir CLA mais eficientemente que a *Butyrivibrio fibrisolvens*, especialmente as probióticas (OGAWA et al., 2005; SANTOS et al., 2001). A produção de CLA também ocorre em humanos, por ação da enzima delta-9-dessaturase em 7-trans 18:1 e 11-trans 18:1, embora em proporção ínfima quando comparada a ruminantes (MEDEIROS, 2002). O CLA também pode ser sinteticamente produzido por diferentes métodos, o que influencia diretamente na composição dos isômeros produzidos. As metodologias mais empregadas são a partir de desidratação de óleo de rícino, de tratamento com álcalis fortes de óleo de girassol a altas pressões e de óleo de cártamo com solução concentrada de hidróxido de potássio em propilenoglicol, tendo este último a maior concentração de CLA (90%) (MEDEIROS, 2002).

O CLA tem sido foco de estudos desde que foi comprovado ser responsável por diversas propriedades benéficas à saúde. Entre elas, destaca-se sua potente atividade anticarcinogênica. O CLA está entre os compostos que atuam reduzindo tanto a incidência de

tumor em modelos experimentais de carcinogênese em ratos, ou como agentes citotóxicos existentes nas células cancerígenas. Estes resultados foram também demonstrados em estudos *in vitro* de células cancerígenas de melanoma, carcinoma de cólon, carcinoma de próstata, leucemia, carcinoma de ovário e tumor mamário (SHORTT & O'BRIEN, 2004).

Os tumores da glândula mamária são particularmente sensíveis aos efeitos do CLA, o que pode ser explicado, em parte, pela acumulação preferencial do CLA em lipídios neutros de adipócitos, tipo de célula predominante no tecido mamário. Sua atividade anticarcinogênica se daria por sua atuação como “fator parácrino” na regulação do crescimento de células epiteliais. No caso da glândula mamária, o mecanismo de ação ainda poderia ser a redução da diferenciação das células do estroma mamário e na redução da capacidade do estroma mamário em formar redes microcapilares (angiogênese), além de estimular a apoptose (HAYASHI, 2003; MEDEIROS, 2002). Além da propriedade anticarcinogênica, vários estudos sugerem que o CLA apresenta propriedade hipocolesterolêmica e pode atuar como antioxidante, além de atividade na inibição da síntese de nucleotídeo, da propriedade proliferativa e da formação de DNA tumoral (SHORTT & O'BRIEN, 2004).

O leite e seus derivados, bem como a carne bovina, são as principais fontes de CLA na dieta humana, onde o 9-cis, 11-trans 18:2 é o isômero mais abundante, com uma representatividade média de 80-90% do CLA. A concentração típica de CLA na gordura do leite é de 3 a 6 mg/g, porém, pode ocorrer grandes variações dependendo do rebanho leiteiro (MAIA, BRANCO & MOURO, 2006) e do seu estado de lactação (VAN NIEUWENHOVE et al., 2007). O conteúdo de CLA no leite e em alguns de seus derivados pode ser conferido na Tabela 1.

#### 2.4.3 Fatores que influenciam os teores de CLA

Diversos são os fatores que influenciam os níveis de CLA em laticínios, desde a matéria-prima até a armazenagem, além das condições de fabricação. Segundo Palmquist, Beaulieu & Barbano (1993), o teor e a composição da gordura do leite são mais afetados pela quantidade e pelo tipo de gordura na dieta do animal do que por qualquer outro componente. Jiang et al. (1996) verificaram variação de 2,5 a 17,7 mg de CLA/g de ácidos graxos no leite e sugeriram que este ácido graxo pode ser diretamente aumentado por meio da dieta. Baseando-

se nesta afirmação, diversos autores buscaram em seus trabalhos incrementar a ração de rebanhos bovinos com suplementos de lipídeos e óleo de soja, obtendo resultados satisfatórios (MEDEIROS et al., 2002).

O CLA também pode ser produzido naturalmente por cepas de bactérias, com o atrativo principal de produzir altas quantidades de 9-cis, 11-trans 18:2, o isômero do CLA com maior atividade biológica. O ácido linoléico livre é tóxico para muitos micro-organismos

**Tabela 1- Conteúdo de ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**

Amostra	mg CLA*/g lipídeo	mg CLA*/100g amostra**
<i>Leites</i>		
Leite Integral (3,2%gordura)	4,49	14,2
Leite (1,9%gordura)	4,14	8,0
<i>Fermentados</i>		
Iogurte (1,9%gordura)	3,82	7,4
Gordura do Soro	4,14	76,1
Buttermilk	4,66	5,7
<i>Queijos</i>		
Brie	4,75	129,4
Cheddar médio	4,02	140,0
Cream	4,30	142,9
Cottage	4,80	19,6
Edam	5,38	141,7
Mozzarella	4,31	91,4
Queijo Processado (marca 1)	4,26	85,4
Queijo Processado (marca 2)	4,02	39,0
Queijo Processado Americano	3,64	91,1
Parmesão	4,00	89,9
Queijo Suíço	5,45	160,9

\*quantidades expressas em isômero 9-cis, 11-trans 18:2.

\*\*com base na matéria seca.

Adaptado de LIN et al., 1995.

e sua conversão em CLA parece funcionar como um mecanismo de detoxificação através da ação da enzima isomerase (DAS et al., 2005). Colônias *starter* com habilidade de converter o

ácido linoléico em CLA têm sido identificadas, a exemplo das propionibactérias, bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias (OGAWA et al., 2005). Entretanto, a contribuição das culturas no aumento do conteúdo de CLA em laticínios parece ser menor do que o esperado ou ainda apresenta resultados controversos. Em estudo recente de Das et al. (2005), foi mostrado que a adição de lipase e propionibactéria em queijos de massa lavada e salgados a seco não foram eficientes em aumentar o conteúdo de CLA, embora estivesse presente ácido linoléico livre. Já estudos de Lin (2003) mostraram que o teor de CLA em iogurtes preparados com culturas de *Lactobacillus acidophilus* foram significativamente majorados pela adição de ácido linoléico (0,1%).

As reações oxidativas também têm sido postuladas como responsáveis por aumentar as concentrações de CLA. O mecanismo para tal seria a formação acelerada de radicais livres de ácido linoléico e uma subsequente mudança nas duplas ligações do sistema conjugado (HA, GRIMM & PARIZA, 1989). Entretanto, alguns pesquisadores cogitam que as reações oxidativas podem também causar a destruição do sistema de duplas ligações, conseqüentemente reduzindo o teor de CLA. Com isso, fatores que podem levar a incorporação de ar em laticínios (como por exemplo, na fabricação do sorvete), bem como a exposição ao ar durante a estocagem, podem afetar os níveis de CLA (SHANTA et al., 1995).

O tempo de maturação dos queijos também é controverso quanto aos efeitos sobre o CLA. Luna, Juárez & De la Fuente (2007) estudaram a influência do período de maturação sobre queijos espanhóis, observando que apesar de os queijos com tempos de maturação mais prolongada (três meses) apresentarem menores valores de CLA em relação aos queijos com apenas dois dias de fabricação, a diferença não foi estatisticamente significante, sugerindo que a maturação não afeta substancialmente o conteúdo de CLA. É levantada a hipótese de que a atividade proteolítica da microflora do queijo tenha sido responsável pela diminuição do CLA ao longo do tempo, uma vez que compostos protéicos de baixo peso molecular podem atuar como doadores de hidrogênio em reações que convertem o CLA em ácidos monoenólicos ou saturados. O efeito do tempo na quantidade de CLA em queijos também foi estudado por Zlatanos et al. (2002), onde os autores obtiveram resultados opostos aos encontrados por Luna, Juárez & De la Fuente (2007), ou seja, os queijos com maior tempo de maturação apresentaram maiores valores de CLA em relação aos menos maturados. Dados semelhantes foram obtidos por Lavillonnière et al. (1998) e por Chamba & Perreard (2002).

#### 2.4.3.1 Influência da composição química e do processamento no teor de CLA

Existe uma correlação significativa entre a composição química do produto e o teor de CLA. O conteúdo de proteína está diretamente relacionado ao CLA por atuar como doador de prótons. Esta relação foi confirmada por Shanta & Decker (1992), que ao incrementarem amostras de queijo processado com aditivos protéicos obtiveram elevados níveis de CLA.

Da mesma forma, os lipídeos apresentam correlação positiva com o conteúdo de CLA, uma vez que são precursores de ácido linoléico e do próprio CLA. Segundo Lin et al. (1999), a acidez titulável e o conteúdo de umidade também apresentam relação direta com CLA. É proposto que um aumento na acidez titulável favoreça a doação de hidrogênio para os radicais dienos; já a água exerceria sua influência por ser imprescindível para as reações lipolíticas e proteolíticas, as quais favorecem indiretamente a formação do isômero conjugado.

A influência das condições de fabricação no conteúdo de CLA em laticínios tem sido explorada por muitos autores, sendo a temperatura de processamento um dos tópicos mais discutidos (COLLOMB et al., 2006). Os primeiros estudos indicavam que um aquecimento moderado (<100 °C) poderia favorecer a formação do CLA durante os estágios de fabricação de diferentes laticínios. Entretanto, estudos mais recentes apontam o oposto. A aplicação de diferentes tratamentos térmicos durante a fabricação de leite fermentado (LUNA et al., 2004) e queijo processado (LUNA et al., 2005) não alterou o conteúdo de CLA no produto (LUNA et al., 2004); o mesmo ocorreu para o estudo de Gnädig et al. (2004) onde o uso de diferentes temperaturas de cozimento e moldagem de queijo Emmental não produziu nenhum efeito nos teores de CLA. Cogita-se que somente em condições mais severas, com altas temperaturas (>200 °C), diferente das tradicionais aplicadas na fabricação de diversos tipos de queijos, afetariam significativamente os níveis de CLA (LUNA, JUÁREZ & DE LA FUENTE, 2007).



**3 MANUSCRITOS E ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### 3.1 Manuscrito 1

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à International  
Journal of Food Microbiology

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo B)

#### **Desenvolvimento de *cream cheeses* elaborados com adição de probióticos e inulina**

**Larissa de Lima Alves<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa*

*Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil*

#### **Resumo**

Queijos frescos são propícios a adição de culturas probióticas por sua composição físico-química favorável. O objetivo deste estudo foi investigar a influência de diferentes concentrações de prebiótico (inulina) e de probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) sobre as características físico-químicas e de viabilidade das culturas starter (*Streptococcus thermophilus*) e probiótica em *cream cheeses* armazenados por 45 dias a 4°C. O delineamento central composto rotacional foi adotado, totalizando doze tratamentos. Apenas os termos linear e quadrático ( $p < 0,05$ ) da concentração de probióticos influenciaram na acidez titulável e pH durante o armazenamento. *S. thermophilus* apresentou alta viabilidade para todos os tratamentos (mínimo 6,66 log UFC/g e máximo 9,39 UFC/g). A cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* variou de 6,12 UFC/g a 7,76 UFC/g, mantendo-se acima de  $10^6$  UFC/g em todas as formulações durante o período avaliado. *Lactobacillus acidophilus* apresentou variação de 3,20 UFC/g a 8,20 UFC/g, com acentuado declínio após

30 ou 45 dias de experimento. A viabilidade de *B. animalis* foi atribuída às características de umidade, gordura, acidez titulável e pH dos *cream cheeses*, além do efeito prebiótico da inulina, mesmo em baixas concentrações (0,3%). Assim sendo, demonstra-se que *cream cheeses* elaborados nas condições deste estudo podem trazer benefícios ao organismo por sua potencialidade funcional ainda que adicionado de baixas concentrações de cultura probiótica (0,5%).

*Palavras-chave:* queijo fresco, alimento funcional, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, superfície de resposta.

## **1. Introdução**

Dentre os alimentos funcionais popularmente conhecidos, os laticínios compõem o grupo com maior variedade de produtos atualmente disponíveis no mercado (Saxelin et al., 2003). A adição de probióticos é o meio mais comum de tornar um lácteo funcional, pela distinta capacidade destes alimentos em prover o ambiente ideal para crescimento e sobrevivência destes micro-organismos (Yilmaztekin et al., 2004).

Os probióticos são conceituados como organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro pela redução da intolerância à lactose, inibição de micro-organismos patogênicos, produção de vitaminas e prevenção de alguns tumores (Shortt e O'Brien, 2004). Para ser considerado probiótico, o micro-organismo deve incluir certas propriedades, como adesão ao epitélio intestinal, resistência ao ácido e à bile e produção de bacteriocinas (Boylston et al., 2004). Por possuírem tais características, as espécies do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são as mais empregadas pela indústria de lácteos funcionais (Shortt e O'Brien, 2004). Entretanto,

vários fatores afetam a sobrevivência destas culturas, como a presença de oxigênio, peróxido de hidrogênio e quantidade excessiva de ácidos orgânicos (Akalin et al., 2004). Por outro lado, oligossacarídeos como a inulina têm recebido atenção por sua atividade prebiótica, ou seja, quando adicionados juntamente com probióticos são capazes de aumentar seu número e/ou atividade, auxiliando na manutenção da quantidade considerada ideal para obtenção dos benefícios desejados ( $10^6$  UFC/g) (Uysal et al., 2003; Boylston et al., 2004).

Diversas pesquisas têm se concentrado em desenvolver novos produtos contendo pre- e probióticos. A idéia do uso de culturas probióticas em queijos não é nova; entretanto, comparando-se com o número de estudos em leites fermentados, sua exploração pode ser considerada escassa (Yilmaztekin et al., 2004). Alguns autores sugerem que os queijos são promissores em termos de viabilidade de culturas probióticas e sua influência nas características físico-químicas e sensoriais os tornam ideais para a adição destas (Vinderola et al., 2000; Kasimoglu et al., 2004). Em comparação aos leites fermentados, a estrutura coesa, o pH e o teor de gordura dos queijos fazem com que estes sejam capazes de oferecer proteção adicional ao probiótico durante sua passagem no trato gastro-intestinal (Stanton et al., 1998). Daigle et al. (1999) relatam manutenção de *Bifidobacterium infantis* em queijo Cheddar embalado à vácuo e mantido a 4°C por 84 dias a níveis acima de  $10^6$  UFC/g no fim do período de estocagem. Do mesmo modo, Cardarelli et al. (2008) testaram *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* em queijo *petit-suisse*, com viabilidade dos microorganismos garantida durante 28 dias de armazenamento. Dados semelhantes foram obtidos para queijo Crescenza (Gobbetti et al., 1998), Árzua-Ulloa (Menéndez et al., 2000) e Cottage (Blanchette et al., 1996).

O *cream cheese* é um queijo que se caracteriza por possuir consistência fina e untuosa e sabor levemente ácido (Albuquerque, 2002), com consumo em expansão no Brasil. Por ser rico em creme, permite adaptar-se a um grande número de combinações e ocasiões conforme

a consistência e os hábitos culinários de cada país, sendo mais consumido em sanduíches, como acompanhamento para saladas e como ingrediente principal do bolo de queijo (Sanches et al., 1996). Em razão da sua natureza de queijo fresco, a adição de micro-organismos probióticos e de inulina é atrativa, uma vez que as baixas temperaturas de fermentação, a alta umidade e sua curta vida-de-prateleira beneficiam a sobrevivência das culturas (Vinderola et al., 2000).

Sendo inexistentes pesquisas que avaliem a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* em *cream cheese*, especialmente quando adicionadas em baixas concentrações, o objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade de tais culturas probióticas em doze formulações de *cream cheese* acrescidas de inulina, e suas implicações nas características físico-químicas durante armazenamento a 4°C durante 45 dias.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Elaboração dos cream cheeses*

Doze formulações de *cream cheese* foram preparadas (T1 a T12) em duplicata adaptando-se procedimento descrito por Furtado e Neto (1994). Em tanque para queijos, duas replicatas de 25 L de leite pasteurizado (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) foram padronizados para 8% de gordura com creme de leite pasteurizado (50% gordura) (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) e acrescidos de 2% (p/v) de cultura starter mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca) e 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Valinhos, SP). A fermentação ocorreu durante cerca de 18h a 25°C. Ao atingir o pH de 4,60, o coágulo foi cortado em cubos para facilitar a liberação do soro. Após a lavagem da massa com 25% de

água a 25°C, a coalhada foi colocada em formas próprias com dessorador de algodão (capacidade 500g aproximadamente) e mantida em refrigerador a  $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por cerca de 15h.

Após 20 horas, a massa de coalhada de cada replicata foi dividida em doze porções, as quais compuseram os doze tratamentos (Tabela 1). Em seguida, foram misturados os demais ingredientes: 1% (p/p) de sal de cozinha (Salsul<sup>®</sup>, Rio Grande, RS); 0,2% (p/p) de ervas finas (mistura de salsa, cerfólio, estragão, cebolinha verde e orégano desidratados); 0,1% (p/p) de sorbato de potássio; 0,005% (p/p) de nisina (Chr. Hansen, Valinhos, SP), em concentrações iguais para todos os tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline<sup>®</sup>, Orafti, Bélgica) e de culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus* La-5 / *Bifidobacterium animalis* Bb-12 (BioRich<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Dinamarca) foram adicionadas a cada tratamento de acordo com a Tabela 1. Para preparo da cultura-mãe dos micro-organismos probióticos, 5g da cultura foram diluídos em 30 mL de leite UHT comercial (Elegê<sup>®</sup>, Eleva Alimentos S/A, Teutônia, RS). Os *cream cheeses* foram acondicionados em embalagens plásticas de 150g e armazenados em refrigerador a  $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante todo o período de análise (45 dias).

## 2.2 Análises físico-químicas

Uma fração de cada tratamento foi analisada em triplicata quanto à sua composição físico-química entre 1 e 5 dias de armazenamento. Para obtenção da umidade, 5g de amostra foram secos em estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 2005). O teor de cinzas foi determinado por gravimetria pelo aquecimento de 2g de amostra isenta de umidade em forno de mufla a 550°C até completa incineração (AOAC, 2005). A proteína foi estimada pelo método de Kjeldahl, utilizando fator de correção 6,38 (IAL,1985). Para obtenção da fração lipídica, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959), com correção para o teor de umidade de cada tratamento. O valor de pH foi medido utilizando-se pHmetro digital (Digimed DM-

20, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil) (AOAC, 2005) previamente calibrado e a acidez titulável (expressa em porcentagem de ácido láctico) foi obtida por titulação com NaOH 0,1N (AOAC, 2005). As análises de pH e acidez titulável foram realizadas quinzenalmente, para que pudesse ser feita uma comparação com a viabilidade das culturas neste período.

### 2.3 Análises microbiológicas

A viabilidade das culturas *starter* (*Streptococcus termophilus*) e probiótica (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) foram avaliadas quinzenalmente durante 45 dias de estocagem. Para tal, 25g de amostra (em duplicata) foram misturados em bag mixer com 225 ml de água peptonada (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) utilizando saco plástico estéril. Diluições subseqüentes foram preparadas e o número de células viáveis determinado em uma alíquota de 1 ml pela técnica *pour plate*. *S. termophilus* foi enumerado em meio M17 ágar (Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Suíça) com adição de 5% de solução de lactose a 10%, seguida de incubação aeróbica a 37°C/48h (IDF, 1997). Para contagem das colônias de *B. animalis* foi usado MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, India) com adição de 100 ml de solução de glicose a 20%, 5 ml de solução de dicloxacilina a 0,01%, 10 ml de solução de cloreto de lítio a 11,11% e 5 ml de solução de cloreto de cisteína a 10% para cada 1000 ml de meio de cultura; seguido de incubação anaeróbica a 37°C/72h (Chr Hansen, 1999). *L. acidophilus* foi contado em MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, India) com 10% de solução de maltose 20% (IDF, 1999); a maltose permite somente o crescimento deste micro-organismo.

### 2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O Delineamento Central Composto Rotacional (Box et al., 1978) foi adotado, sendo a concentração de probiótico ( $X_1$ ) e de prebiótico ( $X_2$ ) os fatores independentes. As variáveis dependentes (Y) foram acidez (% ácido láctico) e pH, cujas superfícies de resposta foram geradas a partir das médias entre os dias de análise (1, 15, 30 e 45 dias). Os ensaios foram numerados de 1 a 12 (Tabela 1), sendo os tratamentos T9, T10 e T11 as repetições do ponto central (Rodrigues e Iemma, 2005) e T12 o tratamento controle, isento de pre- e probióticos. Os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e de interação foram determinados pelo uso de regressão linear múltipla, sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas para os dados da composição físico-química obtidas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Todos os cálculos e gráficos foram gerados utilizando-se o pacote estatístico Statistica 6.0 for Windows.

### **3. Resultados e Discussão**

#### *3.1 Composição química*

As médias com os respectivos desvio-padrões da composição química são apresentadas na Tabela 2. Conforme esperado, os tratamentos que continham maior teor de inulina apresentaram umidade inferior, em função de o prebiótico contribuir com os sólidos totais. Resultados semelhantes foram relatados por Akalin et al. (2007) e Guggisberg et al. (2009).

A fração lipídica foi estatisticamente igual para todos os tratamentos. Não foi encontrada relação entre a adição de micro-organismos probióticos e o teor de gordura em



queijo de leite de búfala (Van Nieuwenhove et al., 2007) e em leite fermentado indiano (Yadav et al., 2007). Entretanto, Buriti et al. (2007) e Cardarelli et al. (2008) descrevem que o acréscimo de inulina reduziu o teor de gordura em *cream cheese* e *mousse* de chocolate; por outro lado, a quantidade do prebiótico adicionada foi superior a deste estudo (8% e 5%, respectivamente).

O teor protéico dos *cream cheeses* variou de  $7,05\pm 0,02\%$  a  $7,81\pm 0,01\%$ . De acordo com Kasimoglu et al. (2004), a adição de 1% de *Lactobacillus acidophilus* não alterou o valor de proteína em queijo branco. O mesmo é descrito por Yilmaztekin et al. (2004) para queijo fresco, onde os autores acrescentaram 2,5% ou 5,0% dos mesmos probióticos adotados neste estudo. Akalin et al. (2007) igualmente não encontraram influência da adição de 2% de prebiótico em iogurtes probióticos. As diferenças estatísticas para proteína encontradas neste estudo podem ter ocorrido em razão da variação na atividade proteolítica das culturas *starter* e probiótica e do efeito de suas interações na proteólise.

Segundo Buriti et al. (2007) e Cardarelli et al. (2008), a adição de inulina reduziu a quantidade de cinzas em *cream cheese* e *mousse* de chocolate, respectivamente. Esta tendência foi observada neste estudo, onde o tratamento-controle apresentou o maior teor de cinzas, embora esta diferença não tenha sido significativa em relação aos demais tratamentos, exceto T4. Resultados similares foram encontrados por Souza e Saad (2009) em queijo Minas fresco com adição de *Lactobacillus acidophilus*.

### 3.2 Avaliação da acidez titulável e pH durante estocagem

Com a média dos dados de acidez titulável e pH obtidos durante o armazenamento foram elaboradas as superfícies de resposta, representadas nas Figuras 1 e 2 para acidez titulável e pH, respectivamente. Conforme pode ser observado na Tabela 3, apenas os termos

linear e quadrático da concentração de probióticos influenciaram na acidez titulável e pH ( $p < 0,05$ ). Guven et al. (2005) e Guggisberg et al. (2009) igualmente não encontraram efeito da adição de inulina em iogurtes sobre estes parâmetros.

Bergamini et al. (2005) apontam o gênero *Lactobacillus* como capaz de reduzir o pH do meio, especialmente *Lactobacillus acidophilus*. Do mesmo modo, Ong et al. (2007) afirmam que o gênero *Bifidobacterium* produz ácidos acético e láctico via rota frutose 6-fosfato. Deste modo, a adição dos probióticos adotados neste estudo contribuíram para o aumento da acidez titulável e consequente queda do pH.

### 3.3 Viabilidade das culturas starter e probiótica durante estocagem

A principal população de micro-organismos é representada em todos os tratamentos pela cultura starter *S. thermophilus* (Tabela 4), com níveis elevados durante todo o período de avaliação. A viabilidade deste micro-organismo é associada à sua capacidade de liberar ácidos para o meio pela degradação da lactose como parte de seu metabolismo (Shah, 1995; Martín-Diana et al., 2003). Esta afirmação está de acordo com as representações gráficas para acidez titulável (Figura 1) e pH (Figura 2) durante a estocagem dos *cream cheeses*, onde os tratamentos com maior acidez titulável e menor pH (T7, T8, T9, T10, T11) apresentaram contagens elevadas para a cultura starter.

A contagem de *Bifidobacterium animalis* (Tabela 5) manteve-se a níveis acima de  $10^6$  UFC/g para todos os tratamentos até o fim do período de estocagem, garantindo a quantidade considerada mínima para obtenção dos benefícios proporcionados pelo consumo de probióticos (Uysal et al., 2003; Boylston et al., 2004). A viabilidade de *B. animalis* após 45 dias de armazenamento variou de 80,00% (T3) a 98,67% (T7), sendo que todas as formulações do ponto central (T9, T10 e T11) mantiveram acima de 90,00% da concentração

inicial do micro-organismo. Este resultado é interessante, uma vez que geralmente é utilizado concentração de cultura superior a 1,5% para obter valores desta magnitude (Ekinçi et al., 2008; Magariños et al., 2008).

Diversos autores apontam a presença excessiva de ácidos e o baixo pH como fatores decisivos na viabilidade dos probióticos, especialmente de *Bifidobacterium* (Dave e Shah, 1997; Shah, 2000; Kailasapathy, 2006). Kailasapathy et al. (2008) relatam que a manutenção do pH a níveis acima de 4,40 em iogurte confere maior sobrevivência a este micro-organismo. Deste modo, a conservação do pH acima deste valor (Figura 2) seguramente contribuiu para a elevada taxa de sobrevivência de *B. animalis* neste estudo. Resultados similares são descritos por Dinakar e Mistry (1994) para queijo Cheddar e por Vinderola et al. (2000) para queijo fresco Argentino. Além disso, a adição de inulina, mesmo a baixos níveis, pode ter contribuído para a manutenção do número de células viáveis de *B. animalis* pelo seu efeito prebiótico, conforme Akin et al. (2007) e Oliveira et al. (2009).

No entanto, as contagens de *Lactobacillus acidophilus* apontam queda brusca na sua viabilidade ao final do armazenamento (Tabela 6). Ishibashi e Shimamura (1993) e Dave e Shah (1997) descrevem que a cultura starter em elevada concentração causa injúrias às células de *L. acidophilus*. Este fato pode ser observado comparando-se as contagens de *S. termophilus* e *L. acidophilus*, onde os tratamentos que continham maior número de células viáveis da cultura starter (T7, T8, T9, T10, T11) conseqüentemente apresentaram menores contagens do micro-organismo probiótico ao longo do período de análise. Yilmaztekin et al. (2004) relatam queda acentuada de *L. acidophilus* em queijo branco após 30 dias de estocagem em salmoura. Martín-Diana et al. (2003) observaram que o número de células viáveis de *L. acidophilus* em leite fermentado de leite de cabra caiu a  $<10^6$  UFC/g após 21 dias de estocagem à frio. Shah et al. (1995) obtiveram resultado similar para iogurtes comerciais.

Com os resultados obtidos pode-se inferir que o *cream cheese* é um alimento viável em termos de potencialidade probiótica, uma vez que a concentração de *Bifidobacterium animalis* manteve-se acima de  $10^6$  UFC/g durante 45 dias de armazenamento, independentemente da quantidade de inóculo adicionada. Sendo assim, o consumo de pequenas porções diárias de *cream cheese*, produzido nas condições deste estudo, pode desempenhar efeitos benéficos ao organismo por sua potencialidade funcional, mesmo quando elaborado com baixos níveis de probiótico (0,5%). Este resultado é interessante do ponto de vista da indústria laticinista, que vê na baixa adição de cultura probiótica uma alternativa para redução de custos sem deixar de garantir o apelo funcional do produto.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI-UFSM) pela doação de leite e suporte técnico prestado para elaboração dos *cream cheeses*, à Clariant S.A. pela doação de inulina e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa de mestrado do primeiro autor.

### **Referências**

Akalin, A.S.; Fenderya, S.; Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerate storage. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 613-621.

Akalin, A.S.; Tokusoglu, Ö.; Gönç, S.; Aycan, S., 2007. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal* 17, 1089-1095.

- Albuquerque, L.C., 2002. Queijos no mundo – origem e tecnologia. Editora do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, Brazil. 140pp.
- AOAC, 2005. Official methods of analysis. 18th. ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, USA.
- Bergamini, C.V.; Hynes, E.R.; Quiberoni, A.; Suárez, V.B.; Salazar, C.A., 2005. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinian cheese. *Food Research International* 38, 597-604.
- Blanchette, L.; Roy, D.; Belanger, G.; Gauthier, S.F., 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 79, 8-15.
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 27, 911-917.
- Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S., 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building. New York, Wiley.
- Boylston, T.D.; Vinderola, C.G.; Ghoddusi, H.B.; Reinheimer, J.A., 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 14, 375-387.
- Buriti, F.C.A.; Cardarelli, H.R.; Filisetti, T.M.C.C.; Saad, S.M.I., 2007. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus termophilus*. *Food Chemistry* 104, 1605-1610.
- Cardarelli, H.R.; Aragon-Alegro, L.C.; Alegro, J.H.A.; Castro, I.A., 2008. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1318-1324.
- Cardarelli, H.R.; Buriti, F.C.A.; Castro, I.A.; Saad, S.I., 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic petit-suisse cheese. *LWT* 41, 1037-1046.

- Christian Hansen, 1999. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. 5 p. [Analytical Proceedment].
- Daigle, A.; Roy, D.; Belanger, G.; Vuillemand, J.C., 1999. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. Journal of Dairy Science 82, 1081-1091.
- Dave, R.I.; Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal 7, 31-41.
- Dinakar, P.; Mistry, V.V., 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. Journal of Dairy Science 77, 2854-2864.
- Furtado, M.M.; Neto, J.P.M., 1994. Tecnologia de queijos - manual técnico para a produção industrial de queijos. 1 ed. Dipemar LTDA, São Paulo, Brazil.
- Gobbetti, M.; Corsetti A.; Smacchi, E.; Zocchetti, A.; De Angelis, M., 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. Journal of Dairy Science 81, 37-47.
- Guggisberg, D.; Cuthbert-Steven, J.; Piccinali, P.; Bütikofer, U.; Eberhard, P., 2009. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. International Dairy Journal 19, 107-115.
- Güven, M.; Yasar, K.; Karaca, O.B.; Hayaloglu, A.A., 2005. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. International Journal of Dairy Technology 58, 180-184.
- IAL, 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz (533 pp).
- International Dairy Federation, 1997. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. IDF/ISO Standard. 5 p.

- International Dairy Federation, 1999. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bulletin of the IDF 306, 23-33.
- Ishibashi, N.; Shimamura, S., 1993. Bifidobacteria: Research and development in Japan. Food Technology 47 129-134.
- Kailasapathy, K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT - Food Science and Technology 39, 1221–1227.
- Kailasapathy, K.; Harmstof, I.; Phillips, M., 2008. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. LWT –Food Science and Technology 41, 1317-1322.
- Kasimoglu, A.; Göncüoglu, M; Akgün, S., 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. International Dairy Journal 14, 1067-1073.
- Martín-Diana, A.B.; Janer, C.; Peláez, C.; Requena, T., 2003. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. International Dairy Journal 13, 827-833.
- Menéndez, S.; Centeno, J.A.; Godínez, R.; Rodríguez-Otero, J.L., 2000. Effect of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. International Journal of Food Microbiology 59, 37-46.
- Oliveira, R.P.S.; Florence, A.C.R.; Silva, R.C.; Perego, P.; Converti, A.; Gioielli, L.A.; Oliveira, M.N., 2009. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. International Journal of Food Microbiology 128, 467-472.
- Ong, L.; Henriksson, A.; Shah, N.P., 2007. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. International Dairy Journal 17, 937-345.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F.; 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1.ed. Casa do Pão Editora, Campinas, Brazil.

- Sanchez, C.; Beauregard, J.L.; Chassagne, M.H.; Bimbenet, J.J.; Hardy, J., 1996. Effects of processing on rheology and structure of double cream cheese. *Food Research International* 28, 547-552.
- Saxelin, M.; Korpela, R.; Mayra-Makinen, A., 2003. Classifying functional dairy products. In: Matilla-Sandholm, T.; Saarela, M. (Eds). *Functional dairy products*. CRC Press, Washington. Chap.1.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894-907.
- Shah, N.P. Lankaputhra, W., Britz, M.L.; Kyle, W.S.A., 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 5, 515-521.
- Shortt, C.; O'Brien, J., 2004. *Handbook of functional dairy products*. CRC Press, Washington. 294pp.
- Souza, C.H.B; Saad, S.M.I., 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh during storage. *LWT-Food Science and Technology* 42, 633-640.
- Stanton, C.; Gardiner, G.; Lynch, P.B.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G.; Ross, R.P., 1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal* 8, 491-496.
- Uysal, H.; Kilic, S.; Kavas, G.; Akbulut, N. and Kesenkas, H., 2003. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 56, 177-181.
- Van Nieuwenhove, C.P.; Oliszewski, R.; González, S.N.; Chaia, A.B.P., 2007. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Research International* 40, 559-564.



Vinderola, C.G.; Prosello, W.; Ghiberto, D.; Reinheimer, J.A., 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83, 1905-1911.

Yadav, H.; Jain, S.; Sinha, P.R., 2007. Production of free fatty acids and conjugated linoléico acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal* 17, 1006-1010.

Yilmaztekin, M.; Özer, B.H.; Atasoy, F., 2004. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium* BB-02 in white-brined cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55, 53-60.

**Tabela 1**Delineamento experimental para formulação de *cream cheeses* simbióticos

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais		
	X <sub>1</sub> <sup>*</sup>	X <sub>2</sub> <sup>**</sup>	X <sub>1</sub> <sup>*</sup>	X <sub>2</sub> <sup>**</sup>	
T1	-1	-1	0,7	0,5	
T2	-1	1	0,7	1,5	
T3	1	-1	1,3	0,5	
T4	1	1	1,3	1,5	
T5	1,414	0	1,5	1,0	
T6	-1,414	0	0,5	1,0	
T7	0	1,414	1,0	1,7	
T8	0	-1,414	1,0	0,3	
T9	0	0	1,0	1,0	
T10	0	0	1,0	1,0	
T11	0	0	1,0	1,0	
T12***	-----	-----	-----	-----	
Variáveis	Níveis codificados				
símbolos					
independentes	-1,414	-1	0	1	1,414
X <sub>1</sub> <sup>*</sup> (%)	0,5	0,7	1	1,3	1,5
X <sub>2</sub> <sup>**</sup> (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

\*X<sub>1</sub> = concentração de probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*).\*\*X<sub>2</sub> = concentração de prebiótico (inulina).

\*\*\*T12= tratamento controle, isento de probióticos e prebiótico.

**Tabela 2**

Composição química de *cream cheeses* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina (ver Tabela 1).

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Umidade	Gordura	Proteína	Cinzas
T1	0,7	0,5	65,55 ±0,11 <sup>a</sup>	22,24 ±0,11 <sup>a</sup>	7,38 ±0,04 <sup>cd</sup>	1,51 ±0,02 <sup>ab</sup>
T2	0,7	1,5	60,54 ±0,29 <sup>b</sup>	25,16 ±0,03 <sup>a</sup>	7,05 ±0,02 <sup>e</sup>	1,49 ±0,01 <sup>ab</sup>
T3	1,3	0,5	66,56 ±0,21 <sup>a</sup>	21,01 ±0,06 <sup>a</sup>	7,32 ±0,07 <sup>cde</sup>	1,53 ±0,22 <sup>ab</sup>
T4	1,3	1,5	60,86 ±0,30 <sup>b</sup>	26,69 ±0,30 <sup>a</sup>	7,15 ±0,07 <sup>de</sup>	1,45 ±0,01 <sup>b</sup>
T5	1,5	1,0	65,58 ±0,49 <sup>a</sup>	26,50 ±0,49 <sup>a</sup>	7,37 ±0,19 <sup>cd</sup>	1,53 ±0,12 <sup>ab</sup>
T6	0,5	1,0	65,06 ±0,20 <sup>a</sup>	21,74 ±0,24 <sup>a</sup>	7,10 ±0,06 <sup>de</sup>	1,56 ±0,17 <sup>ab</sup>
T7	1,0	1,7	60,84 ±0,34 <sup>b</sup>	26,40 ±0,55 <sup>a</sup>	7,51 ±0,15 <sup>bc</sup>	1,58 ±0,02 <sup>ab</sup>
T8	1,0	0,3	66,11 ±0,27 <sup>a</sup>	21,27 ±0,08 <sup>a</sup>	7,81 ±0,01 <sup>a</sup>	1,62 ±0,04 <sup>ab</sup>
T9	1,0	1,0	61,03 ±0,29 <sup>b</sup>	25,72 ±0,08 <sup>a</sup>	7,33 ±0,03 <sup>cde</sup>	1,55 ±0,06 <sup>ab</sup>
T10	1,0	1,0	61,07 ± 0,07 <sup>b</sup>	26,02 ±0,17 <sup>a</sup>	7,50 ±0,04 <sup>bc</sup>	1,61 ±0,02 <sup>ab</sup>
T11	1,0	1,0	61,14 ±0,13 <sup>b</sup>	26,27 ±0,41 <sup>a</sup>	7,25 ±0,05 <sup>cde</sup>	1,62 ±0,03 <sup>ab</sup>
T12	----	---	66,49 ±0,36 <sup>a</sup>	21,11 ±0,01 <sup>a</sup>	7,74 ±0,18 <sup>ab</sup>	1,64 ±0,05 <sup>a</sup>

Resultados expressos em g/100g de amostra. Valores são as médias ± desvio padrão.

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

\* X<sub>1</sub> = concentração de probióticos (%).

\*\* X<sub>2</sub> = concentração de prebiótico (%).

**Tabela 3**

Coefficientes de regressão múltipla dos modelos matemáticos<sup>a</sup> para as variáveis resposta de acidez titulável e pH durante armazenamento de *cream cheeses* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina.

Coeficiente		Acidez titulável	pH
	$\beta_0$	-0,02	4,84
Linear	$\beta_1$	1,44*	-0,49*
	$\beta_2$	0,07	-0,14
Quadrático	$\beta_{11}$	-0,75*	0,22*
	$\beta_{22}$	-0,06	0,05
Interação	$\beta_{12}$	0,05	0,03
	$R^2$	0,981	0,977

<sup>a</sup> $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$ , onde Y = acidez titulável ou pH,  $X_1$  = concentração de probiótico e  $X_2$  = concentração de prebiótico.

\*=significativo a  $p < 0,05$ .

**Tabela 4**

Contagens ( $\log_{10}$  UFC/g) de *Streptococcus thermophilus* em *cream cheeses* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina (ver Tabela 1) durante armazenamento

	$X_1^*$	$X_2^*$	Dias de estocagem			
			1	15	30	45
T1	0,7	0,5	8,22±0,07 <sup>a</sup>	7,95±0,01 <sup>b</sup>	7,47±0,02 <sup>c</sup>	7,17±0,05 <sup>d</sup>
T2	0,7	1,5	8,20±0,05 <sup>a</sup>	8,04±0,02 <sup>b</sup>	7,72±0,00 <sup>c</sup>	7,13±0,05 <sup>d</sup>
T3	1,3	0,5	8,04±0,04 <sup>a</sup>	7,93±0,04 <sup>b</sup>	7,54±0,04 <sup>c</sup>	7,08±0,03 <sup>d</sup>
T4	1,3	1,5	8,53±0,05 <sup>a</sup>	7,83±0,01 <sup>b</sup>	7,59±0,02 <sup>c</sup>	7,04±0,04 <sup>d</sup>
T5	1,5	1,0	8,58±0,04 <sup>a</sup>	7,96±0,01 <sup>b</sup>	7,59±0,01 <sup>c</sup>	6,90±0,05 <sup>d</sup>
T6	0,5	1,0	8,64±0,02 <sup>a</sup>	7,87±0,02 <sup>b</sup>	7,72±0,05 <sup>c</sup>	6,66±0,06 <sup>d</sup>
T7	1,0	1,7	9,38±0,02 <sup>a</sup>	9,07±0,02 <sup>c</sup>	9,10±0,02 <sup>c</sup>	9,23±0,02 <sup>b</sup>
T8	1,0	0,3	9,10±0,03 <sup>c</sup>	9,17±0,02 <sup>b</sup>	9,10±0,01 <sup>c</sup>	9,24±0,02 <sup>a</sup>
T9	1,0	1,0	9,05±0,03 <sup>a</sup>	9,11±0,01 <sup>a</sup>	9,07±0,01 <sup>a</sup>	8,80±0,05 <sup>b</sup>
T10	1,0	1,0	9,09±0,04 <sup>a</sup>	9,13±0,01 <sup>a</sup>	9,02±0,03 <sup>b</sup>	8,91±0,01 <sup>c</sup>
T11	1,0	1,0	9,17±0,02 <sup>a</sup>	9,25±0,01 <sup>a</sup>	8,95±0,04 <sup>b</sup>	8,93±0,03 <sup>b</sup>
T12	---	---	9,25±0,03 <sup>a</sup>	9,17±0,01 <sup>b</sup>	8,98±0,02 <sup>c</sup>	9,28±0,01 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*  $X_1$  = concentração de probióticos (%).

\*\*  $X_2$  = concentração de prebiótico (%).

**Tabela 5**

Contagens ( $\log_{10}$  UFC/g) de *Bifidobacterium animalis* em *cream cheeses* contendo probióticos e inulina (ver Tabela 1) durante armazenamento

	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub> *	Dias de estocagem			
			1	15	30	45
T1	0,7	0,5	7,74±0,23 <sup>a</sup>	7,27±0,02 <sup>b</sup>	6,44±0,08 <sup>c</sup>	6,49±0,03 <sup>c</sup>
T2	0,7	1,5	7,76±0,15 <sup>a</sup>	7,19±0,01 <sup>b</sup>	6,59±0,05 <sup>c</sup>	6,48±0,01 <sup>c</sup>
T3	1,3	0,5	7,60±0,01 <sup>a</sup>	7,45±0,04 <sup>b</sup>	6,52±0,07 <sup>c</sup>	6,04±0,01 <sup>d</sup>
T4	1,3	1,5	7,54±0,28 <sup>a</sup>	7,01±0,02 <sup>b</sup>	6,48±0,04 <sup>c</sup>	6,19±0,04 <sup>c</sup>
T5	1,5	1,0	7,70±0,20 <sup>a</sup>	7,34±0,01 <sup>b</sup>	6,73±0,06 <sup>c</sup>	6,51±0,04 <sup>c</sup>
T6	0,5	1,0	7,52±0,07 <sup>a</sup>	7,16±0,04 <sup>b</sup>	6,49±0,06 <sup>c</sup>	6,12±0,03 <sup>d</sup>
T7	1,0	1,7	7,02±0,06 <sup>a</sup>	6,47±0,07 <sup>b</sup>	6,90±0,03 <sup>a</sup>	6,93±0,08 <sup>a</sup>
T8	1,0	0,3	7,08±0,07 <sup>a</sup>	6,47±0,08 <sup>c</sup>	6,87±0,04 <sup>b</sup>	6,88±0,01 <sup>b</sup>
T9	1,0	1,0	7,03±0,01 <sup>a</sup>	6,46±0,04 <sup>d</sup>	6,85±0,02 <sup>b</sup>	6,67±0,05 <sup>c</sup>
T10	1,0	1,0	7,22±0,04 <sup>a</sup>	7,18±0,02 <sup>a</sup>	6,83±0,01 <sup>b</sup>	6,84±0,08 <sup>b</sup>
T11	1,0	1,0	7,50±0,01 <sup>a</sup>	7,57±0,05 <sup>ab</sup>	6,86±0,04 <sup>ab</sup>	6,75±0,01 <sup>b</sup>

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*X<sub>1</sub> = concentração de probióticos (%).

\*\*X<sub>2</sub> = concentração de prebiótico (%).

**Tabela 6**

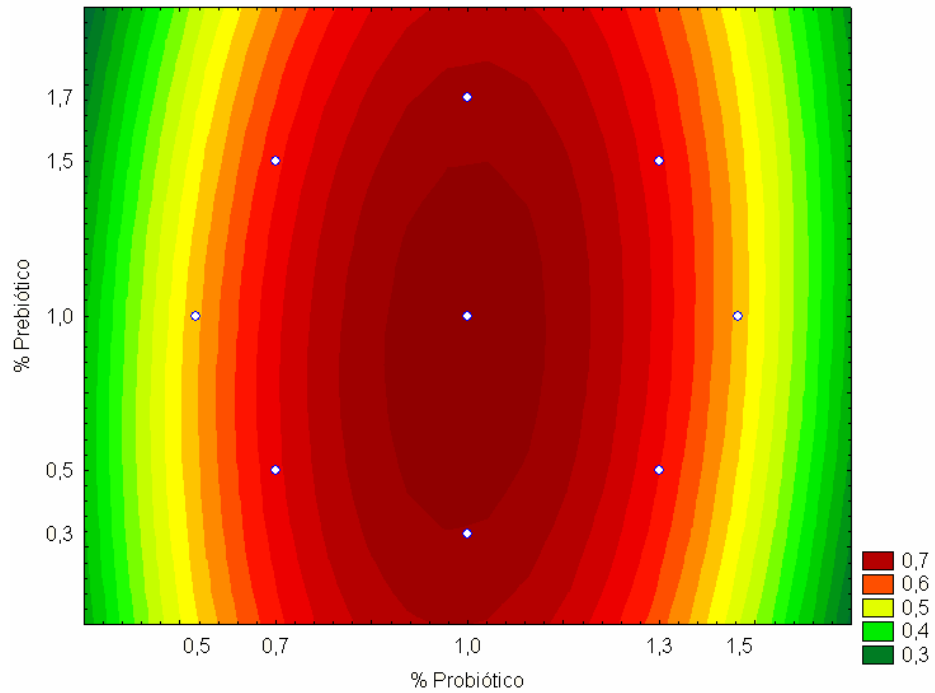
Contagens ( $\log_{10}$  UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus* em *cream cheeses* contendo probióticos e inulina (ver Tabela 1) durante armazenamento

	$X_1^*$	$X_2^*$	Dias de estocagem			
			1	15	30	45
T1	0,7	0,5	8,00±0,04 <sup>a</sup>	7,18±0,04 <sup>b</sup>	6,26±0,01 <sup>c</sup>	4,56±0,08 <sup>d</sup>
T2	0,7	1,5	8,20±0,05 <sup>a</sup>	7,15±0,03 <sup>b</sup>	6,23±0,01 <sup>c</sup>	5,40±0,12 <sup>d</sup>
T3	1,3	0,5	7,89±0,11 <sup>a</sup>	7,31±0,10 <sup>b</sup>	6,50±0,07 <sup>c</sup>	4,05±0,13 <sup>d</sup>
T4	1,3	1,5	7,85±0,14 <sup>a</sup>	7,05±0,01 <sup>b</sup>	6,47±0,03 <sup>c</sup>	4,12±0,07 <sup>d</sup>
T5	1,5	1,0	7,93±0,08 <sup>a</sup>	7,54±0,01 <sup>b</sup>	6,57±0,03 <sup>c</sup>	4,03±0,14 <sup>d</sup>
T6	0,5	1,0	7,87±0,11 <sup>a</sup>	7,44±0,07 <sup>b</sup>	6,54±0,04 <sup>c</sup>	3,97±0,12 <sup>d</sup>
T7	1,0	1,7	6,84±0,02 <sup>a</sup>	4,52±0,07 <sup>b</sup>	4,42±0,10 <sup>b</sup>	3,20±0,17 <sup>c</sup>
T8	1,0	0,3	6,73±0,02 <sup>a</sup>	5,09±0,08 <sup>b</sup>	5,09±0,02 <sup>b</sup>	3,26±0,24 <sup>c</sup>
T9	1,0	1,0	6,86±0,01 <sup>a</sup>	5,18±0,09 <sup>b</sup>	4,16±0,02 <sup>c</sup>	3,26±0,24 <sup>d</sup>
T10	1,0	1,0	6,67±0,01 <sup>a</sup>	5,14±0,06 <sup>b</sup>	4,16±0,04 <sup>c</sup>	3,10±0,17 <sup>d</sup>
T11	1,0	1,0	6,97±0,01 <sup>a</sup>	5,06±0,06 <sup>b</sup>	4,12±0,02 <sup>c</sup>	3,20±0,17 <sup>d</sup>

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* $X_1$  = concentração de probióticos (%).

\*\* $X_2$  = concentração de prebiótico (%).

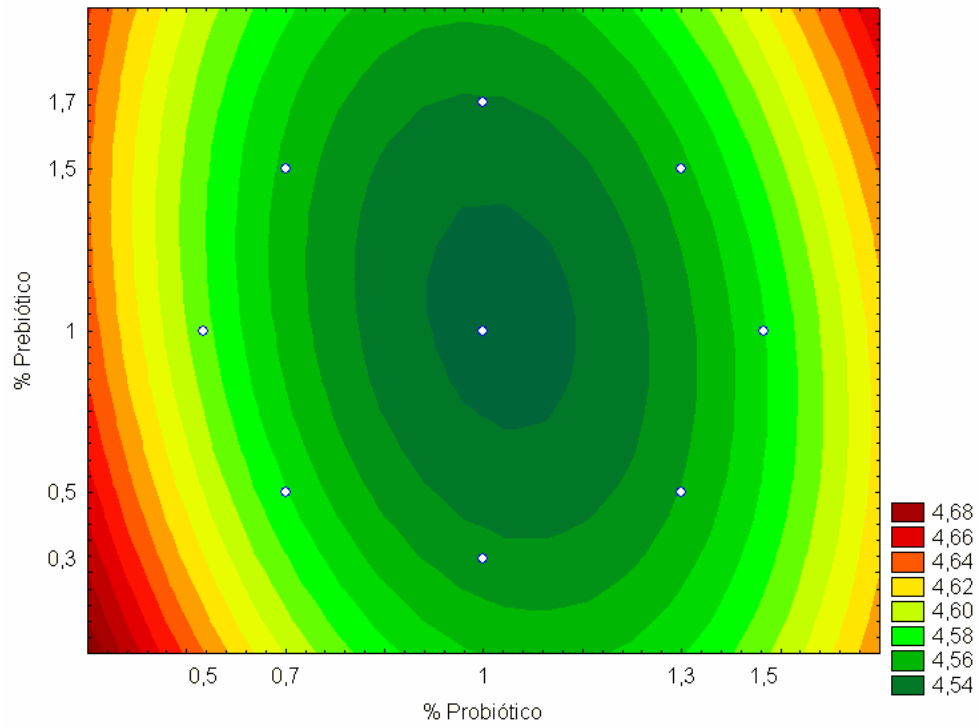


**Figura 1**

Superfície de resposta para acidez titulável (mg/g ácido láctico) de *cream cheeses* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina.

A figura é relativa à média entre os dias de armazenamento (1, 15, 30 e 45 dias).





**Figura 2**

Superfície de resposta para pH de *cream cheeses* contendo probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. A figura é relativa à média entre os dias de armazenamento (1, 15, 30 e 45 dias).

### 3.2 Artigo 1

Artigo aceito para publicação na revista Alimentos & Nutrição

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo C)

## **AVALIAÇÃO SENSORIAL DE *CREAM CHEESES* POTENCIALMENTE SIMBIÓTICOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA\***

Larissa de Lima ALVES\*\*

**RESUMO:** Os queijos frescos são propícios à adição de pre- e probióticos por seu pH, umidade e temperatura de fermentação característicos. Doze formulações de *cream cheese* simbióticos foram elaboradas com concentrações de probióticos (*Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5) e prebiótico (inulina) adotadas conforme delineamento central composto rotacional. A avaliação sensorial foi realizada por 80 painelistas não treinados através de teste com escala hedônica (7 níveis) e de ordenação quanto aos parâmetros sensoriais de aparência geral, cor, aroma, textura, acidez e sabor. Com os mesmos dados foram obtidas as superfícies de resposta para os mesmos parâmetros. Não foi detectada diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) na avaliação por escala hedônica, exceto para aroma; tampouco foi verificada preferência estatisticamente significativa entre as formulações no teste de ordenação. Contudo, as superfícies de resposta apontam diferentes regiões com tendência à melhor aceitação, variando cada região conforme o atributo analisado. Demonstra-se a viabilidade da elaboração de *cream cheese* simbiótico, sendo que a concentração de pre- e probióticos aos níveis estudados neste trabalho não afetaram

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor (Bolsista CAPES-Brasil).

\*\*Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Av. Roraima, nº1000, CEP 97105-900 - Santa Maria - RS - Brasil. Email para correspondência: [larissafarm@yahoo.com.br](mailto:larissafarm@yahoo.com.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bifidobacterium animalis*; *Lactobacillus acidophilus*; inulina; escala hedônica.

## INTRODUÇÃO

A crescente preocupação na melhora da qualidade de vida tem estimulado o desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Paralelamente, a indústria de laticínios vem se adaptando a esta tendência em um mercado competitivo e exigente, buscando oferecer ao consumidor alternativas alimentares que possuam propriedades funcionais, mas sem perderem a aparência, o sabor e a textura característicos.

Um dos métodos mais explorados de tornar um lácteo funcional é a adição de probióticos, definidos como micro-organismos viáveis que beneficiam a saúde de quem os consome por manter e/ou melhorar o balanço microbiano intestinal<sup>16,28</sup>, além de aumentar a defesa do organismo contra patógenos, aliviar a intolerância à lactose, estimular o sistema imune e reduzir a propensão a certos carcinomas.<sup>20,28</sup> Dentre os diversos micro-organismos probióticos já estudados, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* figuram como os mais comumente adotados pela indústria laticinista em uma adição de pelo menos  $10^6$  UFC/g de produto, quantidade considerada como mínima satisfatória para obter os efeitos desejados.<sup>22,28</sup>

Outro procedimento bem sucedido de tornar um alimento funcional é o acréscimo de prebióticos concomitantemente à adição de probióticos. Os prebióticos são conceituados como ingredientes não digeríveis seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal e, desta forma, trazem benefícios à saúde.<sup>19</sup> Um dos prebióticos mais estudados é a inulina, polímero que ocorre como material de reserva em plantas e que possui atividade

prebiótica especialmente quando associada à *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.<sup>21</sup> O termo simbiótico é usado quando existe a associação de prebióticos e probióticos em um mesmo produto<sup>3</sup>; deste modo, um alimento que contenha inulina e *Bifidobacterium* e/ou *Lactobacillus* nas concentrações adequadas atende a esta definição.

Devido a características específicas, como uso de baixas temperaturas de fermentação e pH e atividade de água, os queijos frescos são propícios à adição de pre e probióticos, uma vez que tais características favorecem a viabilidade dos microorganismos, seja durante a elaboração do produto ou estocagem.<sup>32</sup> Buriti et al.<sup>10</sup> adicionaram *Lactobacillus acidophilus* em queijo tipo Minas Frescal, obtendo excelente aceitação sensorial e viabilidade garantida do probiótico durante o armazenamento. Da mesma forma, Aragon-Alegro et al.<sup>3</sup> obtiveram boa aceitação sensorial de *mousse* de chocolate acrescido de inulina e/ou *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Resultados semelhantes foram obtidos por Vinderola et al.<sup>32</sup> ao testar diferentes espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em queijo fresco Argentino.

O *cream cheese* é um queijo fresco de textura suave, levemente acidificado e de consistência cremosa<sup>17,26</sup> que tem obtido espaço crescente no mercado queijeiro brasileiro, chegando a um incremento de mais de 28% na produção nacional somente entre os anos 2000 e 2004.<sup>8</sup> Neste contexto, é de especial interesse que a elaboração de *cream cheese* potencialmente simbiótico seja explorada. Uma vez que a opinião de consumidores é de suma importância no desenvolvimento de produtos, este trabalho visou avaliar sensorialmente formulações de *cream cheese* contendo diferentes concentrações de inulina como prebiótico e *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* como probióticos. Para tal, foram adotados testes com escala hedônica e de ordenação, além da metodologia de superfície de resposta, um método matemático e

estatístico efetivamente utilizado para desenvolver, melhorar e otimizar processos em que se busca a formulação de novos produtos.<sup>4, 25</sup>

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Elaboração dos *cream cheeses*

Foram preparadas 12 formulações de *cream cheese* (T1 a T12), com diferentes concentrações de pre- e probiótico (Tabela 1). A formulação-base seguiu a tecnologia descrita por Furtado & Neto<sup>17</sup>, com alteração na padronização da gordura do leite (de 12% para 8%). Os queijos foram elaborados em quatro blocos (um bloco para cada sessão sensorial, conforme descrito posteriormente), em dias consecutivos e nas mesmas condições, a fim de garantir que os painelistas avaliassem as formulações sempre após 24h da elaboração. Em cada bloco, 20 litros de leite pasteurizado integral (3% gordura) (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) foram padronizados para 8% de gordura com creme de leite pasteurizado (50% gordura) (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) em tanque para queijos; em seguida foram adicionados 2% (p/v) cultura starter mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca) e 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Valinhos, SP). O tanque foi coberto com tampa de inox e a fermentação ocorreu a 25°C durante cerca de 18h. Após atingir pH de 4,60, o coágulo foi cortado em cubos de 1,5 cm de aresta para facilitar a liberação do soro; foram então adicionados 25% de água (em relação ao volume inicial de leite) a 25°C para lavagem da massa, sendo posteriormente colocada em formas próprias com dessorador (pano de coton esterilizado) e mantida em refrigerador a 8±0,5°C durante cerca de 15h.

Após a pesagem da coalhada, o volume total foi dividido em quatro porções de peso igual (1000g cada), sendo destinada uma porção para cada tratamento do bloco. Em seguida, foram misturados os demais ingredientes: 1% (p/p) de sal de cozinha (Salsul<sup>®</sup>, Rio Grande, RS); 0,2% (p/p) de ervas finas (mistura de salsa, cerefólio, estragão, cebolinha verde e orégano desidratados); 0,1% (p/p) de sorbato de potássio; 0,005% (p/p) de nisina (Chr. Hansen, Valinhos, SP), em concentrações iguais para todos os tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline<sup>®</sup>, Orafiti, Bélgica) e de culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus* La-5 / *Bifidobacterium* Bb-12 (BioRich<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Dinamarca) foram adicionadas a cada tratamento de acordo com a Tabela 1. Para preparo da cultura-mãe dos micro-organismos probióticos, 5g da cultura foram diluídos em 30 mL de leite UHT comercial (Elegê<sup>®</sup>, Eleva Alimentos S/A, Teutônia, RS). Os *cream cheeses* foram acondicionados em embalagens plásticas de 300g, selados com folha de alumínio e mantidos sob refrigeração a  $5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  até o dia seguinte (cerca de 24h), quando foram avaliados. Os queijos foram elaborados de acordo com as boas práticas de fabricação, havendo amplo controle da higiene dos utensílios empregados e da manipulação das matérias-primas e das formulações durante todo o processamento.

### **Composição físico-química**

O teor de extrato seco total foi determinado segundo metodologia descrita pela AOAC<sup>2</sup> para queijos de alta umidade. Para determinação da gordura, o método proposto por Bligh & Dyer<sup>6</sup> foi adotado, com correção para o teor de umidade de cada tratamento. A fração protéica foi estimada pelo método de Kjeldahl<sup>21</sup>, com fator de correção 6,38. O teor de cinzas foi obtido por incineração de 5g de amostra isenta de

umidade em forno de mufla a 550°C.<sup>2</sup> O valor de pH foi obtido em pHmetro digital (Digimed DM-20, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil) previamente calibrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **Avaliação sensorial**

Devido ao grande número de tratamentos, os *cream cheeses* foram divididos em três sessões sensoriais de quatro tratamentos, sempre contendo uma formulação do ponto central. Desta forma, na 1ª sessão constavam T1, T2, T3 e T9; na 2ª sessão T4, T5, T6 e T10; e na 3ª T7, T8, T11 e T12. Os *cream cheeses* foram servidos em potes brancos de cerâmica contendo em torno de 50g, acompanhados de bolacha água e sal e água. A ficha sensorial foi composta pelos parâmetros aparência global, cor, aroma, textura, acidez e sabor, avaliados através de teste com escala hedônica de 7 níveis (1- desgostei muitíssimo, 4-indiferente, 7- gostei muitíssimo) e teste de ordenação.<sup>14</sup> Do teste de ordenação foram obtidas as formulações “preferidas” de cada sessão conforme a Tabela de Newell & Mac Farlane<sup>14</sup>, sendo estas três submetidas a uma quarta sessão sensorial para que fosse encontrada a melhor formulação dentre as doze. Cada sessão contou com 80 painelistas não treinados (consumidores), escolhidos conforme disponibilidade.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

As concentrações de pre- e probióticos foram adicionadas de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional<sup>4</sup> com dois fatores independentes (concentração de pre- e probióticos). Os ensaios foram numerados de 1 a 12 (Tabela 1),

sendo os tratamentos T9, T10 e T11 as repetições do ponto central<sup>21</sup> e T12 o tratamento controle, isento de pre- e probióticos. Os dados da avaliação sensorial por escala hedônica foram analisados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância e regressão múltipla. As superfícies de resposta foram obtidas utilizando o pacote estatístico Statistica<sup>®</sup> 6.0 for Windows, excluindo-se o tratamento-controle por concentrações nulas de variáveis reais não estarem inclusas no delineamento adotado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Composição físico-química

A legislação brasileira atual não dispõe de padrões de identidade e qualidade específicos para *cream cheese*. Entretanto, os dados obtidos para a composição físico-química de todos os tratamentos (Tabela 2) encontram-se semelhantes aos relatados por outros autores para este produto. Os valores de extrato seco total encontrados (variando de  $33,44 \pm 0,21\%$  a  $39,46 \pm 0,29\%$ ) são similares aos de *cream cheeses* comercializados no Brasil.<sup>1</sup> O teor de gordura variou de  $21,01 \pm 0,06\%$  a  $26,69 \pm 0,30\%$ , enquanto a composição média de gordura relatada por Furtado & Neto<sup>17</sup> para este produto é de 27 a 29%. Entretanto, tais autores recomendam padronização do teor de gordura do leite em 12% para ser utilizado como matéria-prima na elaboração do *cream cheese*; em nosso estudo este valor foi de 8% a fim de reduzir o aspecto gorduroso do queijo e, deste modo, evitar alguma rejeição pelos painelistas no momento da avaliação sensorial.

O teor protéico variou de  $7,05 \pm 0,02\%$  a  $7,81 \pm 0,01\%$  e encontram-se superiores aos encontrados para *cream cheeses* comerciais (4,32% a 8,47%).<sup>1</sup> Para cinzas, a variação foi de  $1,45 \pm 0,01\%$  a  $1,64 \pm 0,05\%$ , valores semelhantes aos relatados por



Sainani et al.<sup>26</sup> para o mesmo produto. Os pHs de todos os tratamentos estão de acordo com Furtado & Neto<sup>17</sup>, que relatam variação de pH em 4,40 a 4,60 para *cream cheese*.

### **Avaliação sensorial por escala hedônica**

Embora a concentração de pre- e probiótico fosse distinta entre os tratamentos, não foi detectada diferença estatística pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos parâmetros avaliados, exceto aroma (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Gardiner et al.<sup>18</sup> e Stanton et al.<sup>30</sup> para queijos Cheddar contendo culturas de *Lactobacillus*, onde a avaliação do flavor e textura dos queijos contendo o probiótico foram semelhantes aos do tratamento-controle. Da mesma forma, Aragon-Alegro et al.<sup>3</sup> relatam que a adição do micro-organismo probiótico *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* e inulina não interferiram na preferência sensorial de *mousse* de chocolate simbiótico. Além disso, a falta do hábito de consumo de *cream cheese* e/ou produtos suplementados com pre- e probióticos pode ter contribuído para a falta de distinção entre os tratamentos.

### **Avaliação sensorial por teste de ordenação**

As formulações preferidas nas três primeiras sessões sensoriais (Tabela 3) foram T2, T10 e T8, respectivamente, conforme menor escore de pontuação (1º lugar = 1 ponto; 4º lugar = 4 pontos).<sup>15</sup> No entanto, as diferenças entre os somatórios dos tratamentos dentro de cada sessão sensorial não foram significativas pela Tabela de Newell & Mac Farlane ( $p > 0,01$ ).<sup>15</sup> Ainda assim, os tratamentos que alcançaram menores escores de pontuação em cada sessão sensorial (T2, T10 e T8) foram

novamente preparados e submetidos aos testes sensoriais. Esta quarta sessão igualmente não detectou diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos; contudo, T2 foi considerado como preferido em relação a T8 e T10.

### **Superfícies de resposta**

Apesar de não ter sido detectada diferença estatística entre os diferentes níveis de pre- e probiótico através do Teste de Tukey ( $p<0,05$ ) e de ordenação ( $p<0,01$ ), ao plotar o gráfico de superfície de resposta para os mesmos dados (Figura 1) é possível detectar diferentes interações entre os fatores e os parâmetros sensoriais. A Tabela 4 apresenta os coeficientes dos modelos de regressão para cada variável resposta, obtidos a partir dos resultados experimentais.

De acordo com a Tabela 4, na avaliação da aparência apenas o intercepto foi significativo ( $p<0,01$ ), indicando que a concentração de pre- e probiótico pouco influenciaram na avaliação deste parâmetro. Buriti et al.<sup>12</sup>, ao comparar a preferência entre queijo fresco cremoso probiótico (*Lactobacillus paracasei*), simbiótico (*Lactobacillus paracasei* e inulina) e controle, observaram que este atributo pouco contribuiu para a escolha dos painelistas. Semelhante resultado pode ser observado na Figura 1a, onde se percebe que as notas mais elevadas estão relacionadas a uma ampla faixa de variação tanto de pre- quanto de probióticos.

Na avaliação da cor das formulações, igualmente apenas o intercepto foi significativo ( $p<0,01$ ) (Tabela 4). Entretanto, observa-se uma tendência de melhor aceitação quando são utilizadas concentrações de prebiótico de 0,3% e de probióticos em torno de 1% (Figura 1b). Silva<sup>29</sup> observou que a concentração de 1% dos mesmos probióticos utilizados neste trabalho em iogurte apresentou valores de aceitabilidade

estatisticamente superiores aos obtidos quando a concentração era de 0,5% ou 1,5%. O atributo de cor dificilmente é levado em consideração na avaliação sensorial de lácteos funcionais, com dados escassos na literatura.

O parâmetro aroma do mesmo modo apresentou apenas o intercepto significativo ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4). O diagrama de superfície (Figura 1c) aponta que as maiores notas concentram-se ao redor de 0,3% de inulina e 1,5% de probióticos. É esperado que o incremento de culturas probióticas melhore o aroma do produto, uma vez que os *Lactobacillus* são considerados micro-organismos proteolíticos.<sup>24</sup> A proteólise é um processo bioquímico que representa um importante papel nas características sensoriais dos queijos, especialmente aroma, sabor e textura. Diversos trabalhos descrevem que as bactérias ácido-lácticas e os *Lactobacillus* possuem um complexo sistema de proteinases e peptidases que liberam aminoácidos livres, aminas e peptídeos, influenciando as características de flavour de diferentes variedades de queijos.<sup>5</sup> Brearty et al.<sup>9</sup> afirma que o gênero *Bifidobacterium* também contribui para o aroma de queijos, relatando que a adição destes probióticos melhorou o aroma de queijos Cheddar em relação ao controle.

O modelo de regressão para textura (Tabela 4) indica que, além do intercepto, o coeficiente linear ( $p < 0,10$ ) e quadrático ( $p < 0,05$ ) da concentração de probiótico foram significativos na avaliação deste parâmetro. Ong, Henriksson & Shah<sup>20</sup> afirmam que a hidrólise da caseína, especialmente da fração  $\alpha_{S1}$ , é responsável pelo abrandamento da textura de queijos Cheddar, dando características de maciez e suavidade ao queijo. Sendo assim, a adição de probióticos proteolíticos como o *Lactobacillus acidophilus* pode ter melhorado a textura dos *cream cheeses*. Além disso, a superfície de resposta da textura (Figura 1d) indica que as concentrações mais elevadas de inulina tenderam à melhor aceitação. Resultado similar foi observado por Tárrega & Costell<sup>31</sup>, onde a

adição de inulina em concentrações crescentes melhorou proporcionalmente a cremosidade de sobremesas lácteas. Buriti et al.<sup>12</sup> também relatam que o acréscimo de inulina conferiu características mais suaves, cremosas e de espalhabilidade em queijo fresco cremoso simbiótico.

Para a acidez, apenas o intercepto apresentou-se como significativo ( $p < 0,05$ ). A superfície de resposta (Figura 1e), entretanto, distingue duas áreas com tendência de melhor aceitação, uma com níveis de prebiótico a 0,3% e probiótico na faixa de 1,3% a 1,5%; e outra na combinação de prebiótico a 1,7% e probiótico em torno de 0,5%. A adição de micro-organismos probióticos geralmente afeta negativamente a acidez de queijos, por torná-los demasiadamente ácidos.<sup>5</sup> Contudo, a primeira região citada indica que a adição destes micro-organismos a níveis mais elevados melhorou a acidez do produto, oposto ao relatado por Bergamini et al.<sup>5</sup> para queijo fresco Argentino com *Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* e por Buriti et al.<sup>12</sup> para queijo fresco cremoso com *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*. Já a segunda região encontrada está de acordo com tais autores, bem como com Cardarelli et al.<sup>13</sup>, que considera a suplementação com inulina em queijo *petit-suisse* como capaz de interferir na percepção da acidez.

A avaliação do sabor também apresentou somente o intercepto significativo ( $p < 0,05$ ). Duas regiões com tendência a maiores notas para este parâmetro podem ser distinguidas na Figura 1f, uma com níveis baixos de probiótico (0,5%) e outra a níveis mais elevados (1,5%), ambas com a menor concentração de inulina (0,3%). Bergamini et al.<sup>5</sup> descrevem que a adição de *Lactobacillus acidophilus* interferiu negativamente na avaliação do sabor de queijo fresco Argentino. Ong, Henriksson & Shah<sup>24</sup> observaram que a adição de *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium* de diferentes espécies em queijo Cheddar causaram sabores mais amargos, ácidos e de vinagre em comparação ao queijo

controle. Entretanto, alguns autores relatam que a adição destes micro-organismos pode melhorar o sabor, por promover uma acidificação reduzida do produto.<sup>15,27</sup>

## **CONCLUSÃO**

A adição de diferentes concentrações de pre- e probiótico de modo geral não influenciou na percepção sensorial dos painelistas, sendo as médias das notas intermediárias entre os termos hedônicos “gostei” e “gostei muito” para todos os parâmetros e estatisticamente iguais ao tratamento-controle. Entretanto, nos gráficos de superfície de resposta foram distinguidas regiões de interação entre as variáveis que apontam tendências de maior aceitação, sendo diferentes para cada parâmetro sensorial avaliado. Deste modo, demonstra-se a viabilidade da elaboração de *cream cheese* simbiótico, podendo variar a concentração de pre- e probióticos aos níveis estudados neste trabalho, sem que esta adição afete a aceitabilidade do consumidor pelo produto.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI) da UFSM pelo fornecimento de alguns ingredientes e apoio técnico durante a elaboração do produto; à Clariant-Brasil pela doação de inulina; à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luísa Helena Rycheki Hecktheuer do DTCA/UFSM pelas informações prestadas acerca da avaliação sensorial e à CAPES-Brasil pela concessão de bolsa de mestrado.

ALVES, L.L.; MATTANNA, P.; BECKER, L.V.; RICHARDS, N.S.P.S.; ANDRADE, D.F. Sensory evaluation of potentially symbiotic cream cheese using the surface response methodology.

## **ABSTRACT**

Fresh cheeses are propitious to addition of pre- and probiotics by suitable pH, moisture and fermentation temperature. Twelve treatments of cream cheese were elaborated with prebiotic (inulin) and probiotics (*Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5) concentration according to central composite design. The sensory analysis was performed by 80 untrained panelists using an ordering test and a hedonic scale (7 levels) as to global appearance, color, aroma, texture, acidity and taste. The surface plots of the same sensory parameters were obtained with the same data. No statistical difference was detected by Tukey's test ( $p>0,05$ ) in the hedonic scale test; except for aroma; nor was found statistically significant preference among treatments in the ordering test. However, the surface plots suggest different areas with tendency to better acceptance, varying according to the sensory attribute. It was shown the feasibility of developing of symbiotic cream cheese, in as much as pre- and probiotic concentration on the levels included in this study did not affect the consumer's product acceptability.

**KEYWORDS:** *Bifidobacterium animalis*; *Lactobacillus acidophilus*; inulin; hedonic scale.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ALVES, L.L. et al. Qualidade físico-química e microbiológica de amostras comerciais de *cream cheese* e queijo processado consumidos no RS. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Anais...**Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008. 1 CD-ROM.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of AOAC International**. 18th ed., Washington, DC, 2005.
3. ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT- Food Sci. Technol.**, v.40, n.4, p.669-675, 2007.
4. BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. **J. Food Eng.**, v.78, n.3, p.836-845, 2007.
5. BERGAMINI, C.V. et al. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Res. Int.**, v.38, n.5, p.597-604, 2005.
6. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, p. 911-917, 1959.
7. BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: An introduction to design data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978. 653p.
8. BRASIL. Produção Brasileira de Queijo 1991/1995/2000/2004. Tabela 04.24. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Gado de Leite. Disponível em:<<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0424.php>> Acesso em: 08 ago. 2007.
9. BREARTY, S.Mc. et al. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **Int. Dairy J.**, v.11, n.8, p.599-610, 2001.

10. BURITI; F.C.A.; ROCHA, J.S.R.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **Int. Dairy J.**, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005a.
11. BURITI; F.C.A.; ROCHA, J.S.R.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT- Food Sci. Technol.**, v.38, n.2, p.173-180, 2005b.
12. BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R., SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **RBCF**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.
13. CARDARELLI, H.R. et al. Inulin and oligofrutose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Sci. Technol.**, v.41, n.6, p.1037-1046, 2008.
14. DUTCOSKI, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.122 p.
15. FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Higiene Alimentar**, v.22, n.163, p.16-21, 2008.
16. FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p. 365-378, 1989.
17. FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M. **Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar LTDA, 1.ed., 1994. p.30-32.
18. GARDINER, G. et al. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.2192-2199, 1998.



19. GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p.1401-1412, 1995.
20. HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.**, v.35, p.109-116. 2002.
21. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3.ed. São Paulo:IAL, 1985. 533p.
22. KIP, P.; MEYER, D.; JELLEMA, R.H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **Int. Dairy J.**, v.16, n.9, p.1098-1103, 2006.
23. MAGARIÑOS, H. et al. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **Int. J. Dairy Technol.**, v.60, n.2, p.128-134, 2007.
24. ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. **Int. Dairy J.**, v.17, n.8, p.937-345, 2007.
25. RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 1. ed. Campinas:Casa do Pão Editora, 2005.
26. SAINANI, M.R.; VYAS, H.K.; TONG, P.S. Characterization of particles in cream cheese. **J. Dairy Sci.**, v.87, n.9, p.2854-2863, 2004.
27. SANZ, Y.; COLLADO, M.C.; DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. **Acta Pediatr. Esp.**, v.61, n.9, p.476-482, 2003.
28. SHORTT, C.; O'BRIEN, J. **Handbook of functional dairy products.** 1.ed. Florida:CRC Press, 2004. 294p.
29. SILVA, S.V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico.** 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

30. STANTON, C. et al. Probiotic cheese. **Int. Dairy J.**, v.8, n.5-6, p.491-496, 1998.
31. TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. **Int. Dairy J.**, v.16, n.9, p.1104-1112, 2006.
32. VINDEROLA, C.G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **J. Dairy Sci.**, v.83, n.9, p.1905-1911, 2000.

Tabela 1 - Delineamento experimental para formulação de *cream cheeses* potencialmente simbióticos

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais		
	X <sub>1</sub> <sup>*</sup>	X <sub>2</sub> <sup>**</sup>	X <sub>1</sub> <sup>*</sup>	X <sub>2</sub> <sup>**</sup>	
T1	-1	-1	0,7	0,5	
T2	-1	1	0,7	1,5	
T3	1	-1	1,3	0,5	
T4	1	1	1,3	1,5	
T5	1,414	0	1,5	1,0	
T6	-1,414	0	0,5	1,0	
T7	0	1,414	1,0	1,7	
T8	0	-1,414	1,0	0,3	
T9	0	0	1,0	1,0	
T10	0	0	1,0	1,0	
T11	0	0	1,0	1,0	
T12	-----	-----	-----	-----	
Variáveis símbolos independentes	Níveis codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
X <sub>1</sub> <sup>*</sup> (%)	0,5	0,7	1	1,3	1,5
X <sub>2</sub> <sup>**</sup> (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

\*X<sub>1</sub> = Concentração de probióticos

\*\*X<sub>2</sub> = Concentração de prebiótico.

Tabela 2 – Composição físico-química de *cream cheeses* potencialmente simbióticos

	Extrato Seco Total*	Gordura*	Proteína*	Cinzas*	pH
T1	33,52 ± 0,36	22,24 ± 0,11	7,38 ± 0,04	1,51 ± 0,02	4,59 ± 0,04
T2	39,46 ± 0,29	25,16 ± 0,03	7,05 ± 0,02	1,49 ± 0,01	4,58 ± 0,03
T3	33,44 ± 0,21	21,01 ± 0,06	7,32 ± 0,07	1,53 ± 0,22	4,56 ± 0,03
T4	39,14 ± 0,30	26,69 ± 0,30	7,15 ± 0,07	1,45 ± 0,01	4,57 ± 0,03
T5	34,42 ± 0,49	26,50 ± 0,49	7,37 ± 0,19	1,53 ± 0,12	4,57 ± 0,04
T6	34,94 ± 0,20	21,74 ± 0,24	7,10 ± 0,06	1,56 ± 0,17	4,56 ± 0,05
T7	39,16 ± 0,34	26,40 ± 0,55	7,51 ± 0,15	1,58 ± 0,02	4,52 ± 0,04
T8	33,89 ± 0,27	21,27 ± 0,08	7,81 ± 0,01	1,62 ± 0,04	4,54 ± 0,03
T9	38,97 ± 0,29	25,72 ± 0,08	7,33 ± 0,03	1,55 ± 0,06	4,53 ± 0,05
T10	38,93 ± 0,07	26,02 ± 0,17	7,50 ± 0,04	1,61 ± 0,02	4,51 ± 0,05
T11	38,86 ± 0,13	26,27 ± 0,41	7,25 ± 0,05	1,62 ± 0,03	4,52 ± 0,05
T12	34,45 ± 0,11	21,11 ± 0,01	7,74 ± 0,18	1,64 ± 0,05	4,54 ± 0,05

Resultados são as médias ± desvio padrão.

\* expressos em g/100g de amostra.

Tabela 3 – Média das notas da avaliação sensorial por escala hedônica.

Tratamento	Sessão Sensorial	Parâmetros Sensoriais*					
		Aparência Global	Cor	Aroma	Textura	Acidez	Sabor
T1	1	5,47 <sup>a</sup>	5,53 <sup>a</sup>	5,45 <sup>ab</sup>	5,23 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>	5,80 <sup>a</sup>
T2**	1	5,33 <sup>a</sup>	5,48 <sup>a</sup>	5,52 <sup>ab</sup>	5,22 <sup>a</sup>	5,42 <sup>a</sup>	5,82 <sup>a</sup>
T3	1	5,60 <sup>a</sup>	5,57 <sup>a</sup>	5,61 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	5,43 <sup>a</sup>	5,70 <sup>a</sup>
T4	2	5,58 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	5,33 <sup>ab</sup>	5,62 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	5,67 <sup>a</sup>
T5	2	5,38 <sup>a</sup>	5,47 <sup>a</sup>	5,37 <sup>ab</sup>	5,10 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	5,65 <sup>a</sup>
T6	2	5,30 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>	5,27 <sup>ab</sup>	5,10 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	5,60
T7	3	5,48 <sup>a</sup>	5,43 <sup>a</sup>	5,28 <sup>ab</sup>	5,37 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>
T8**	3	5,48 <sup>a</sup>	5,58 <sup>a</sup>	5,35 <sup>ab</sup>	5,28 <sup>a</sup>	5,52 <sup>a</sup>	5,75 <sup>a</sup>
T9	1	5,45 <sup>a</sup>	5,58 <sup>a</sup>	5,47 <sup>ab</sup>	5,38 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>	5,77 <sup>a</sup>
T10**	2	5,45 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	5,38 <sup>ab</sup>	5,50 <sup>a</sup>	5,32 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>
T11	3	5,57 <sup>a</sup>	5,43 <sup>a</sup>	5,17 <sup>ab</sup>	5,28 <sup>a</sup>	5,43 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>
T12	3	5,45 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	5,05 <sup>b</sup>	5,25 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>
DP***		0,8439	0,9084	0,9152	0,8953	0,9580	0,9529

\* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* Formulações escolhidas nas diferentes sessões.

\*\*\* Desvio padrão.

Tabela 4 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos<sup>a</sup> das variáveis resposta para avaliação sensorial

Coeficiente	Parâmetros Sensoriais					
	Aparência Global	Cor	Aroma	Textura	Acidez	Sabor
$\beta_0$	5,06*	5,41*	5,14*	4,59*	4,50*	5,84*
Linear $\beta_1$	1,04	0,23	0,26	1,70***	1,63	-0,08
$\beta_2$	-0,31	0,01	0,19	-0,36	0,09	-0,10
Quadrático $\beta_{11}$	-0,51	-0,12	0,10	1,05**	-0,51	0,05
$\beta_{22}$	0,05	-0,04	0,10	-0,04	0,20	0,04
Interação $\beta_{12}$	0,17	0,03	-0,44	0,55	-0,58	-0,08
$R^2$	0,0078	0,0006	0,0030	0,0174	0,0095	0,0023

<sup>a</sup> $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$ , onde Y= parâmetro sensorial,  $X_1$ = probióticos e  $X_2$  = prebiótico.

\*, \*\*, \*\*\* = significativos a  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,10$ , respectivamente.

FIGURA 1 – Diagramas de superfície de resposta para avaliação sensorial de *cream cheeses* potencialmente simbióticos. (a) aparência geral; (b) cor; (c) aroma.

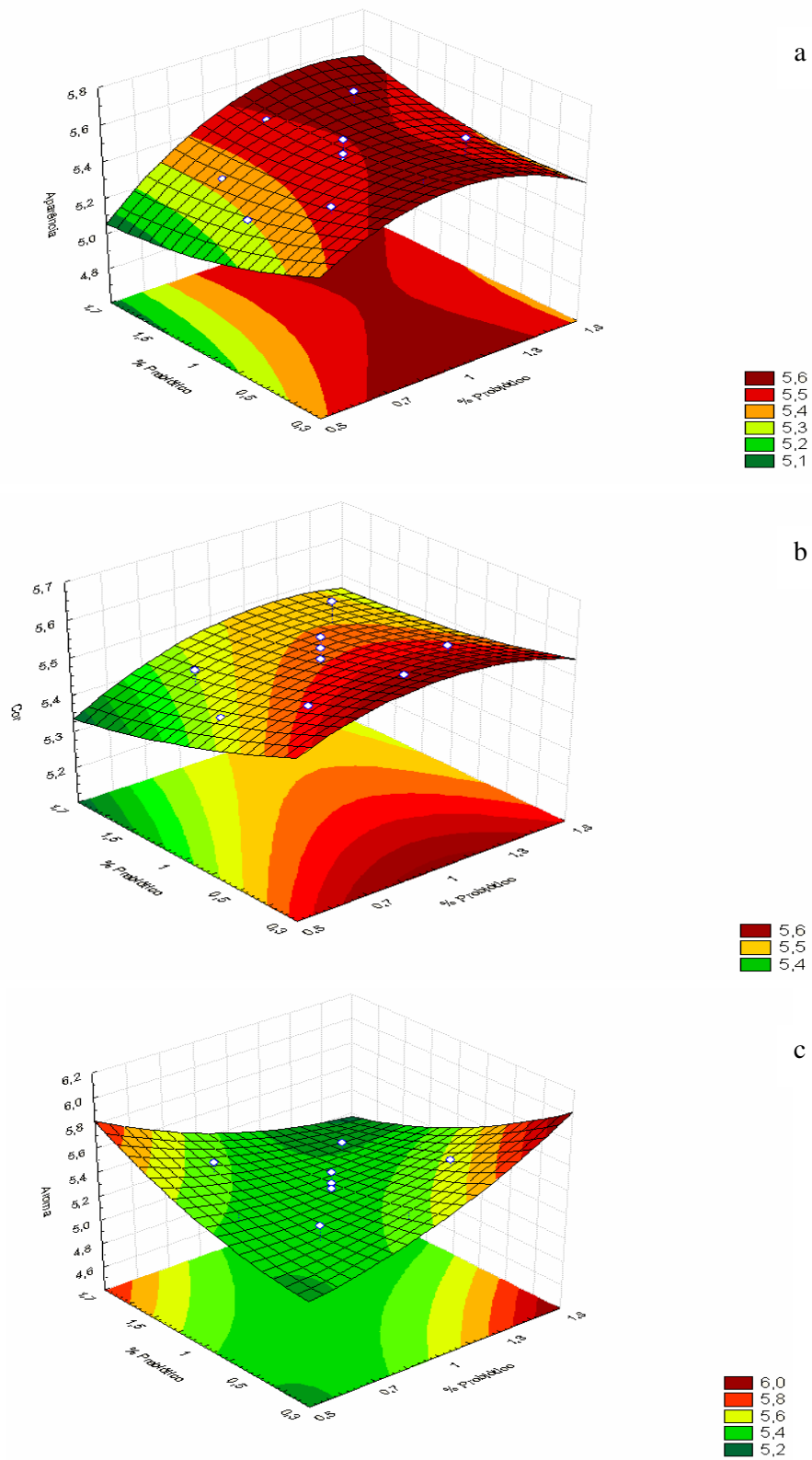
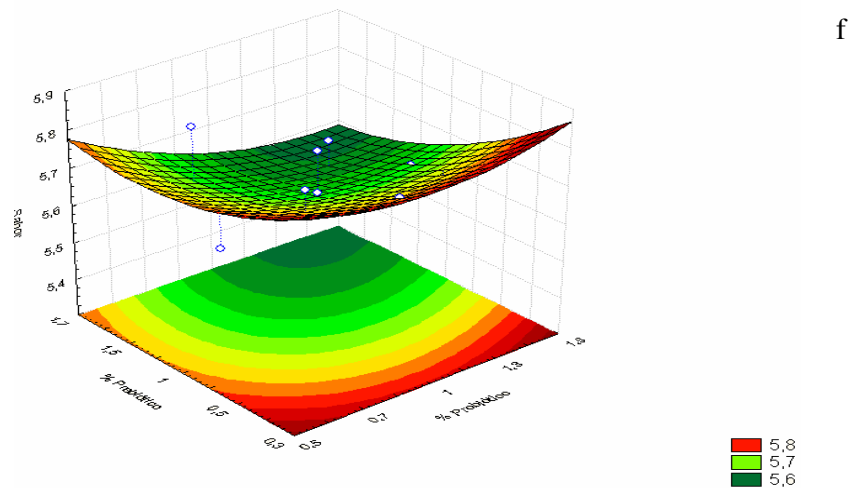
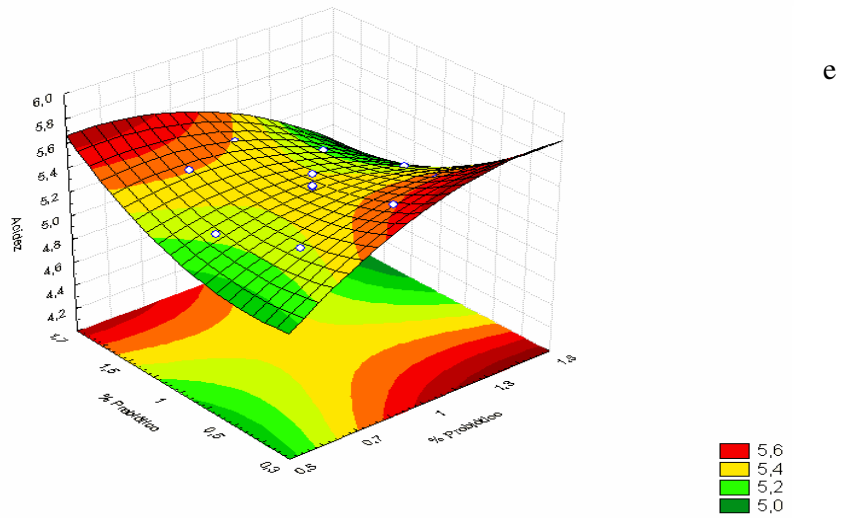
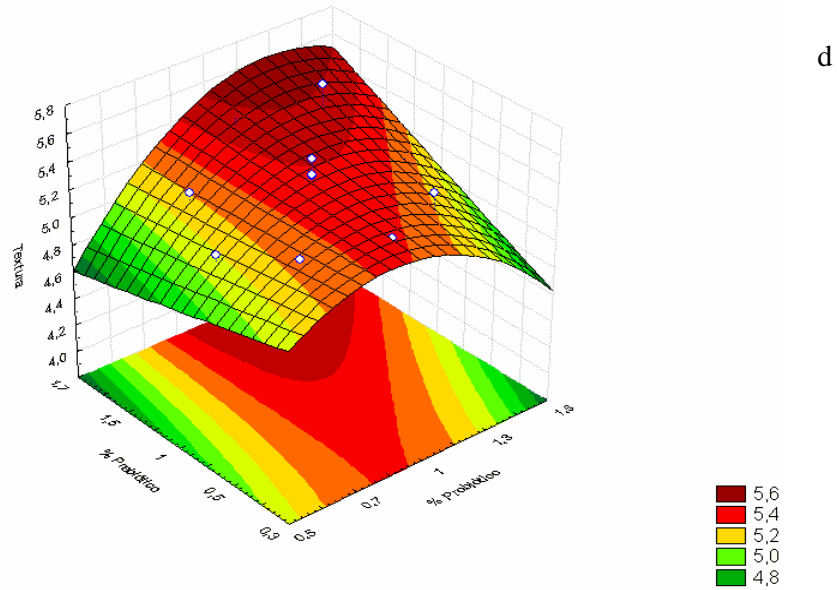


FIGURA 1 – Diagramas de superfície de resposta para avaliação sensorial de *cream cheeses* potencialmente simbióticos: (d) textura; (e) acidez; (f) sabor (Continuação).





### 3.3 Manuscrito 2

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à International Dairy Journal

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo D)

#### **Efeito da concentração de probióticos e inulina sobre o perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado em *cream cheese*: uso da superfície de resposta**

**Larissa de Lima Alves\***

*Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil*

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças no perfil lipídico, especialmente de ácido linoléico conjugado (CLA), em doze formulações de *cream cheese* armazenados por 45 dias (análise: 1, 15, 30 e 45 dias) contendo diferentes concentrações de prebiótico (inulina) e probiótico (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) em quantidades adotadas de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional. A superfície de resposta foi elaborada para verificar o efeito da concentração de pre- e probióticos sobre o teor de CLA (mg/g de gordura). Os coeficientes linear, quadrático e de interação da regressão linear múltipla não foram significativos ( $p > 0,05$ ) tanto para pre- quanto para probióticos. Não foi verificada mudança significativa no perfil lipídico tampouco no teor de CLA nos diferentes tratamentos, apresentando concentrações de ácidos graxos e CLA semelhantes ao leite usado na elaboração do *cream cheese* e ao tratamento controle. As concentrações de probióticos usadas neste estudo não foram capazes de aumentar o teor de CLA em *cream cheese*.

## 1. Introdução

Ácido linoléico conjugado (CLA) é um termo coletivo que se refere aos isômeros geométricos e posicionais do ácido octadecadienóico (C18:2) contendo insaturações conjugadas (Luna et al., 2007). O CLA é produzido predominantemente durante o metabolismo de animais ruminantes como primeiro intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico ou através da conversão endógena do ácido vacênico (11-*trans* C18:1) pela enzima  $\Delta^9$ -dessaturase (Bauman et al., 2003).

Nas duas últimas décadas, o CLA tem atraído grande interesse da comunidade científica por seus isômeros apresentarem comprovada funcionalidade fisiológica (Sieber et al., 2004). Os principais benefícios incluem capacidade de redução ao risco de tumores cancerígenos, do colesterol plasmático e da gordura corporal. Outros efeitos discutidos em menor proporção são a normalização da glicemia, a diminuição da disposição à agregação plaquetária e a melhora do sistema imune (Bauman et al., 2003, Sieber et al., 2004). Dois isômeros são distinguidos pela atividade biológica, 9-*cis*, 11-*trans* C18:2 e 10-*trans*, 12-*cis* C18:2 (Luna et al., 2007).

O leite e a carne de ruminantes são apontados como as maiores fontes de CLA na dieta humana (Luna et al., 2007). Dentre os derivados lácteos o queijo é reconhecido como o principal representante (Van Nieuwenhove et al., 2007), com concentração dependente da quantidade original de CLA no leite (Kelly et al., 1998), das condições de processamento (Lin et al., 1998, Shanta et al., 1992) e das culturas bacterianas usadas no processo fermentativo (Kim & Liu, 2002, Lin, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que bactérias lácticas e probióticas são capazes de produzir CLA. Lin et al. (1999) encontraram que seis culturas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*,

*Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus*) aumentaram o conteúdo de CLA em até quatro vezes usando um sistema modelo contendo leite desnatado esterilizado e ácido linoléico livre. Bactérias probióticas, incluindo *Lactobacillus rhamnosus* e três subespécies de *Propionibacterium freudenreichii*, foram hábeis em produzir CLA em um sistema modelo com leite contendo 1% de óleo de soja hidrolisado e esterificado (Xu et al., 2004). Oliveira et al. (2009) relatam que a adição de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* aumentaram o teor de CLA em leite fermentado quando usados como co-cultura com *Streptococcus thermophilus*. Similarmente, Akalin et al. (2007) obtiveram maior quantidade de CLA em iogurtes contendo probióticos em comparação ao controle.

Entretanto, para surtir tais efeitos, é preciso garantir a viabilidade das culturas probióticas, sensíveis ao oxigênio, baixo pH e acidez encontrados em derivados lácteos (Lankaputhra & Shah, 1996). Neste sentido, tem-se adotado a adição concomitante de substâncias não digeríveis ao intestino humano, mas passíveis de metabolização por culturas probióticas, conhecidas como prebióticos (Gibson, 1999). Um dos prebióticos mais utilizados é a inulina, uma mistura de fruto-oligosacarídeos presente como material de reserva em plantas como banana, cebola, alho, alcachofra e chicória (Niness, 1999). Este polímero é reconhecido como capaz de manter a viabilidade de culturas probióticas, especialmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Özer, 2005).

A maioria dos estudos sobre produção de CLA usando micro-organismos probióticos é realizada em leites fermentados, iogurtes ou queijos com períodos de maturação longos. São escassos os dados a respeito da quantidade de CLA em queijos não maturados adicionados de culturas probióticas. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a produção de CLA em *cream cheese*, um queijo fresco em expansão de consumo no Brasil,

adicionado de diferentes concentrações de uma mistura de probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e inulina como prebiótico.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Elaboração dos cream cheeses

Doze formulações de *cream cheese* foram preparadas (T1 a T12) em duplicata adaptando-se procedimento descrito por Furtado e Neto (1994). Em tanque para queijos, duas replicatas de 25 L de leite pasteurizado (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) foram padronizados para 8% de gordura com creme de leite pasteurizado (50% gordura) (UNI-UFSM, Santa Maria, RS) e acrescidos de 2% (p/v) de cultura starter mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca) e 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Valinhos, SP). A fermentação ocorreu durante cerca de 18h a 25°C. Ao atingir o pH de 4,60, o coágulo foi cortado em cubos de 1,5cm de aresta para facilitar a liberação do soro. Após a lavagem da massa com 6,5 L de água a 25°C, a coalhada foi colocada em formas próprias com dessorador de cóton (capacidade 500g aproximadamente) e mantida em refrigerador a 8 ±0,5°C.

Após 15 horas, a massa de coalhada de cada replicata foi dividida em doze porções, as quais compuseram os doze tratamentos (Tabela 1). Em seguida, foram misturados os demais ingredientes: 1% (p/p) de sal de cozinha (Salsul<sup>®</sup>, Rio Grande, RS); 0,2% (p/p) de ervas finas (mistura de salsa, cerfólio, estragão, cebolinha verde e orégano desidratados); 0,1% (p/p) de sorbato de potássio; 0,005% (p/p) de nisina (Chr. Hansen, Valinhos, SP), em concentrações iguais para todos os tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline<sup>®</sup>, Orafiti, Bélgica) e de culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus* La-5 / *Bifidobacterium animalis* Bb-

12 (BioRich<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Dinamarca) foram adicionadas a cada tratamento de acordo com a Tabela 1. Para preparo da cultura-mãe dos micro-organismos probióticos, 5g da cultura foram diluídos em 30 mL de leite UHT comercial (Elegê<sup>®</sup>, Eleva Alimentos S/A, Teutônia, RS). Os *cream cheeses* foram acondicionados em embalagens plásticas de 150g e armazenados em refrigerador a  $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante todo o período de análise (45 dias).

## 2.2 Extração e esterificação da gordura

A gordura dos *cream cheeses* foi extraída pelo método de Bligh e Dyer (1959), corrigindo a proporção de água conforme a umidade de cada tratamento. Metil-ésteres de ácidos graxos foram preparados com NaOH/metanol (1,5 mL, 0,5N) em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de  $\text{BF}_3$ , seguido de incubação a  $100^{\circ}\text{C}/30$  min. Depois de frio, foram realizadas duas extrações com isoctano (2x 1mL), passando a fase superior para outro tubo. O isoctano foi então evaporado em nitrogênio gasoso e hexano grau cromatográfico (1mL) foi adicionado à gordura esterificada como solvente.

## 2.4 Análises por cromatografia gasosa

Os metil-ésteres de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa (CG) usando aparelho Shimadzu 2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com coluna CP-Sil 88 (Chromopack CP7489, número de série 318802252, Middleburg, Holanda) de sílica fundida (100m de comprimento X 0,25 mm diâmetro interno X 0,20  $\mu\text{m}$  de espessura de membrana) e detector por ionização de chama (FID). A coluna foi aquecida a  $120^{\circ}\text{C}$  com tempo de equilíbrio de 3 min; após injeção permaneceu a  $120^{\circ}\text{C}$  por 5 min, subindo para

208°C a 4°C/min; ao atingir esta temperatura subiu para 210°C a 1°C/min onde permaneceu por 5 min; em seguida passou para 220°C a 1°C/min permanecendo nesta temperatura por 6 minutos. Hidrogênio foi usado como gás de arraste a 20 cm/s e nitrogênio como gás make-up a 30 mL/min. O volume de amostra injetada (modo split) foi de 1µL, com temperatura do injetor de 250°C. A temperatura usada para o detector (FID) foi de 260°C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões de referência (Supelco 37 FAME Mix, Sigma, Bellefonte, EUA). Os tempos de retenção e as áreas foram computados automaticamente pelo software GC Solution (versão 2.30, Shimadzu). A identificação do CLA foi obtida pela comparação com o tempo de retenção de padrão composto por uma mistura de isômeros (9-*cis*, 11-*trans* e 10-*trans*, 12-*cis*) de metil-éster do ácido octadecadienóico (C18:2) (Cód O-5632, Lote 22k1186, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), onde a área dos dois picos de isômeros foram consideradas e expressas como CLA total. A área dos picos foi calculada em mg/g de gordura usando o ácido nonadecanóico (C19:0) como padrão interno.

Os seguintes ácidos graxos saturados foram identificados no leite usado como matéria-prima e nos queijos: C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C22:0 e C24:0; monoinsaturados: C14:1n-9, C15:1, C16:1n-7, C17:1n-7, C18:1n-9, C20:1n-9 e C22:1n-9; poliinsaturados: C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:3n-3, C20:4n-6 e C22:2; e os isômeros trans C18:1n-9t e C18:2n-6t.

## 2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Diferentes preparações de *cream cheese* foram elaboradas com variação na concentração de probióticos ( $X_1$ ) e prebiótico ( $X_2$ ), adicionados à formulação-base de *cream cheese* de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (Box et al., 1978). O

total de formulações foi 12 (T1 a T12), onde T9, T10 e T11 representam as formulações do ponto central (Rodrigues & Iemma, 2005) e T12 o tratamento controle, isento de pre- e probióticos. A variável resposta (Y) foi a média da concentração de CLA (mg/g de gordura) entre o 1º, 15º, 30º e 45º dia de armazenamento. A Regressão Linear Múltipla (RLM) foi usada para obter os termos linear, quadrático e de interação do modelo matemático abaixo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 \quad (\text{Equação 1}),$$

onde somente os termos com significância acima de 95% foram considerados significativos. A superfície de resposta foi elaborada para ilustrar os efeitos de interação entre a concentração de probióticos ( $X_1$ ) e prebiótico ( $X_2$ ) sobre o teor de CLA (Y). Os dados de perfil lipídico foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas entre os dias de análise para cada tratamento calculadas pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para obtenção dos cálculos estatísticos, gráficos e ilustrações o pacote Statistica<sup>®</sup> 6.0 for Windows foi usado.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Viabilidade dos micro-organismos

A cultura starter *S. termophilus* apresentou alta viabilidade durante todo o período de avaliação, variando sua concentração de  $6,66 \pm 0,06$  log UFC/g a  $9,38 \pm 0,02$  log UFC/g (dados não mostrados). O probiótico *Bifidobacterium animalis* manteve-se acima de 6,00 log UFC/g durante todo o período avaliado (dado não mostrado). É recomendado que o consumo de probióticos seja de 7,00 a 8,00 log UFC/dia (Uysal et al., 2003; Boylston et al., 2004); deste modo, a ingestão de pelo menos 10g diários de *cream cheese* elaborado nas condições deste estudo auxilia na garantia dos efeitos proporcionados pelo consumo destes micro-organismos.

Em contrapartida, o probiótico *Lactobacillus acidophilus* teve sua viabilidade reduzida ao longo do armazenamento, apresentando variação de  $6,67 \pm 0,01$  a  $8,20 \pm 0,05$  log UFC no dia 1 e  $3,10 \pm 0,17$  a  $5,40 \pm 0,12$  log UFC/g no 45° dia (dados não mostrados).

### 3.2 Perfil de ácidos graxos saturados, insaturados e trans

Conforme pode ser observado na Tabela 2 e Tabela 3, a maior parte dos ácidos graxos é representada em todos os tratamentos pela sua porção saturada (AGS) (mínimo  $226,74 \pm 0,39$  mg/g de gordura e máximo  $411,17 \pm 20,79$  mg/g de gordura). Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por Lucas et al. (2008) para queijos frescos. Yadav et al. (2007) descrevem que a adição de probióticos em leite fermentado indiano *dahi* aumentou sua porção saturada em comparação ao controle isento de probióticos; os teores de ácidos graxos saturados encontrados por estes autores mantiveram-se estáveis até o fim do armazenamento; entretanto, o período considerado (10 dias) é inferior ao do presente estudo.

A quantidade de ácidos graxos insaturados (monoinsaturados e poliinsaturados, AGMI e AGPI, respectivamente) variou de  $102,62 \pm 4,32$  a  $189,90 \pm 7,87$  mg/g de gordura para AGMI, enquanto a variação de AGPI foi de  $10,20 \pm 0,12$  a  $17,44 \pm 0,59$  mg/g de gordura. De modo geral, a concentração dos ácidos graxos insaturados foram inferiores ao leite usado como matéria-prima, mas similares ao tratamento-controle isento de probióticos. Ekinci et al. (2008) não observaram influência de diferentes culturas probióticas em cremes de leite no teor de ácido oléico (C18:1), principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados em queijos. Van Nieuwenhove et al. (2007) relatam que o uso de culturas probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*) não afetou significativamente o teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados em queijo de leite de búfala durante o armazenamento. No presente estudo, alguns tratamentos tenderam a reduzir



AGMI e AGPI durante a estocagem. A oxidação lipídica em derivados lácteos é apontada como o fator que mais afeta sua qualidade no armazenamento, principalmente em produtos com alto teor de umidade e gordura (Kristensen & Skibsted, 1999; Pettersen et al., 2005). Tais condições são encontradas no *cream cheese*, o que pode ter favorecido a oxidação das duplas ligações e conseqüente redução dos ácidos graxos insaturados durante o armazenamento. Entretanto, como a oxidação lipídica não foi medida neste trabalho, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Os valores encontrados para gordura trans (variação de  $8,47 \pm 0,01$  a  $16,28 \pm 0,68$  mg/g de gordura) foram na sua maioria semelhantes ao leite usado na elaboração dos *cream cheeses*, bem como com os valores encontrados para o tratamento-controle. Dados similares são relatados por Lucas et al. (2008) para queijo fresco, embora estes autores tenham encontrado número maior de isômeros trans que este trabalho. A adição de 0,5% de diferentes micro-organismos probióticos em queijo de leite de búfala não alterou a produção de ácido graxo trans em comparação ao teor encontrado no leite cru (Van Nieuwenhove et al., 2007).

### 3.3 Ácido Linoléico Conjugado

As Tabelas 2 e 3 mostram a quantidade de CLA nos diferentes tratamentos durante a estocagem por 45 dias. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os coeficientes lineares, quadráticos e de interação para pre- e probióticos não foram significativos ( $p > 0,05$ ), ou seja, a adição de inulina e probióticos não afetou significativamente o teor de CLA dos queijos. Esta afirmação pode ser verificada ao comparar o teor de CLA dos tratamentos T1 a T11 (contendo probióticos) com o tratamento controle, onde os valores encontrados são semelhantes ao longo da estocagem, sendo que o tratamento-controle apresentou quantidade de CLA similar a de *cream cheese* comercial (Lin et al., 1995). Lin (2003) e Akalin et al. (2007) relatam que a

adição de prebiótico influenciou apenas em pequena extensão o teor de CLA em iogurte, exercendo maior efeito sobre o crescimento do micro-organismo produtor de CLA.

A transformação do leite em queijo igualmente não alterou a quantidade de CLA. Lin et al. (1995) e Boylston & Beitz (2002) também não encontraram diferença significativa na quantidade de CLA entre iogurte e sua matéria-prima. Xu et al. (2005) não observaram efeito sobre CLA ao adicionar *Lactobacillus rhamnosus* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* em leite fermentado, sendo que os isômeros de CLA permaneceram praticamente em quantidades iguais durante o armazenamento. Em outro trabalho (Xu et al., 2006), os mesmos autores adicionaram diferentes níveis de probióticos ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g) em leite fermentado, sem observar alteração na produção de CLA pela crescente quantidade de inóculo e durante o armazenamento.

Entretanto, a maioria dos trabalhos indica que a adição de probióticos incrementa a quantidade de CLA em lácteos (Akalin et al., 2007; Ekinici et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Van Nieuwenhove et al., 2007; Yadav et al., 2007). Embora os coeficientes da regressão múltipla (Tabela 4) não tenham sido significativos ( $p>0,05$ ), observa-se na superfície de resposta (Figura 1) que existe uma tendência em aumentar o teor de CLA conforme o nível de probiótico aumenta, sugerindo que níveis maiores de probiótico poderiam produzir maior quantidade de CLA.

Diversos fatores podem ter contribuído para os baixos teores de CLA encontrados neste trabalho. Alguns autores propõem que os micro-organismos probióticos necessitam de ácido linoléico exógeno para produzir CLA. Lin et al. (1999) adicionaram 0, 1000 e 5000  $\mu\text{g/mL}$  de ácido linoléico em meio de cultura contendo leite em pó desnatado, onde foi testada a capacidade de produção de CLA de seis micro-organismos; os autores verificaram que no meio isento de ácido linoléico exógeno a produção de CLA foi mínima, enquanto a adição de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de ácido linoléico aumentou em 3 ou 4 vezes a quantidade de CLA. Van

Nieuwenhove et al. (2007) também descrevem que a adição de óleo de girassol com 66% de ácido linoléico aumentou o teor de CLA em queijos de leite de búfala, em comparação ao queijo isento do óleo.

Neste trabalho nenhuma fonte exógena de ácido linoléico foi adicionada porque o gênero *Lactobacillus* usado neste estudo é reconhecido por sua alta capacidade lipolítica, produzindo CLA pela isomerização do ácido linoléico liberado durante a lipólise natural da gordura do leite (Menéndez et al., 2000; Yadav et al., 2007). Entretanto, este micro-organismo apresentou brusco declínio durante a estocagem, reduzindo a liberação de ácido linoléico e consequentemente de CLA. O gênero *Bifidobacterium* também possui capacidade de produzir CLA (Akalin et al., 2007; Ekinci et al., 2008). Contudo, Coakley et al. (2003) observaram que a formação do principal isômero do CLA (*cis*-9, *trans*-11) cessou quando a cultura de *Bifidobacterium* entrou na fase estacionária; situação semelhante foi obtida neste trabalho, onde os níveis de *Bifidobacterium animalis* permaneceram praticamente constantes com 30 dias de armazenamento (dado não mostrado).

Aliado a isso, alguns autores sugerem que a produção de CLA só aumente significativamente após meses de maturação. (Lavillonnière et al., 1998; Chamba & Perreard., 2002; Zlatanov et al., 2002). Deste modo, os queijos frescos como o *cream cheese* são desfavorecidos como fonte de CLA em relação aos demais queijos maturados por seu curto período de validade.

#### **4. Conclusões**

Nas condições deste estudo, a adição de diferentes concentrações de inulina e/ou probióticos não afetou o perfil lipídico, tampouco a quantidade de ácido linoléico conjugado (CLA) em comparação ao teor encontrado no leite usado como matéria-prima e ao tratamento

controle. Sendo assim, sugerem-se novos estudos onde concentrações mais elevadas de probiótico e/ou fontes exógenas de ácido linoléico sejam utilizadas a fim de garantir que o *cream cheese* não seja apenas um alimento fornecedor de probióticos, mas também de CLA.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI-UFSM) pela doação de leite e suporte técnico prestado para elaboração dos *cream cheeses*, à Clariant S.A. pela doação de inulina e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa de mestrado do primeiro autor.

### **Referências**

- Akalin, A.S.; Tokusoglu, Ö.; Gönç, S.; Aycan, S., 2007. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal* 17, 1089-1095.
- Bauman, D.E.; Corl, B.A.; Peterson, D.G., 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. In J.L. Sebédio, W.W. Christie & R. Adlof (Eds.) *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol.2, pp.46-173). Champaign:AOCS.
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 27, 911-917.
- Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S., 1978. *Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building*. New York, Wiley.
- Boylston, T.D.; Beitz, D.C., 2002. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *Journal of Food Science* 67, 1973-1978.

- Boylston, T.D.; Vinderola, C.G.; Ghoddusi, H.B.; Reinheimer, J.A., 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 14, 375-387.
- Chamba, J.F.; Perreard, E., 2002. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait* 82, 33-44.
- Christian Hansen, 1999. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. 5 p. [Analytical Proceedment].
- Coakley, M.; Ross, R.P.; Nordgren, M.; Fitzgerald, G.; Devery, R.; Stanton, C., 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology* 94, 138-145.
- Dave, R.I.; Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
- Ekinci, F.Y.; Okur, O.D.; Ertekin, B.; Guzel-Seydim, Z., 2008. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 216-224.
- Furtado, M.M.; Neto, J.P.M., 1994. Tecnologia de queijos - manual técnico para a produção industrial de queijos. 1 ed. Dipemar LTDA, São Paulo, Brazil.
- Gibson, G.R., 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition* 129, 1438S-1441S.
- International Dairy Federation, 1997. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. IDF/ISO Standard. 5 p.
- International Dairy Federation, 1999. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. *Bulletin of the IDF* 306, 23-33.
- Ishibashi, N.; Shimamura, S., 1993. Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technology* 47 129-134.

Kelly, M.L.; Berry, J.R.; Dwyer, D.A.; Grinari, J.M., Chouinard, P.Y., Van Amburgh, M.E. et al., 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 128, 881-885.

Kim, Y.L.; Liu, R.H., 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 67, 1731-1737.

Kristensen, D.; Skibsted, L.H., 1999. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3099-3104.

Lankaputhra, W.E.V.; Shah, N.P., 1996. A simple method for selective enumeration medium of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft* 51, 446- 451.

Lavillonnière, F.; Martin, J.C.; Bognoux, P.; Sebédio, J.L., 1998. Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *Journal of American Oil Chemist's Society* 75, 343-352.

Lin, H.; Boylston, T.D.; Chang, M.J.; Luedecke, L.O.; Shultz, T.D., 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *Journal of Dairy Science* 78, 2358-2365.

Lin, H.; Boylston, T.D.; Luedecke, L.O.; Shultz, T.D., 1998. Factors affecting the conjugated linoleic acid content of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 801-807.

Lin, T.Y., 2000. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chemistry* 69, 27-31.

Lin, T.Y., 2003. Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology* 58, 11-14.

- Lin, T.Y.; Lin, C.W.; Lee, C.H., 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry* 67, 1-5.
- Lucas, A.; Andueza, D.; Ferlay, A.; Martin, B., 2008. Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheese by visible-near-infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal* 18, 595-604.
- Luna, P.; Juarez, M.; Fuente, M.A., 2007. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheese protected with designation of origin. *Food Chemistry* 103, 1465-1472.
- Menéndez, S.; Centeno, J.A.; Godínez, R.; Rodríguez-Otero, J.L., 2000. Effect of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *International Journal of Food Microbiology* 59, 37-46.
- Niness, K.R., 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition* 129, 1402-1406.
- Oliveira, R.P.S.; Florence, A.C.R.; Silva, R.C.; Perego, P.; Converti, A.; Gioielli, L.A.; Oliveira, M.N., 2009. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 128, 467-472.
- Özer, D.; Akin, S.; Özer, B., 2005. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International* 11, 19-26.
- Pettersen, M.K.; Eie, T.; Nilsson, A., 2005. Oxidative stability of cream cheese stored in thermoformed trays as affected packaging material, drawing depth and light. *International Dairy Journal* 15, 355-362.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F.; 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1.ed. Casa do Pão Editora, Campinas, Brazil.

Shanta, N.C.; Decker, E.A.; Ustunol, Z., 1992. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 69, 425-428.

Shanta, N.C.; Ram, L.N.; O'Leary, J.; Hicks, C.L; Decker, E.A., 1995. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affect by processing and storage. *Journal of Food Science* 60, 695-697.

Sieber, R.; Collomb, M.; Aeschlimann, A.; Jelen, P.; Eyer, H., 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal* 14, 1-15.

Uysal, H.; Kilic, S.; Kavas, G.; Akbulut, N. and Kesekas, H., 2003. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 56, 177-181.

Van Nieuwenhove, C.P; Oliszewski, R.; González, S.N.; Chaia, A.B.P., 2007. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Research International* 40, 559-564.

Xu, S.; Boylston, T.D.; Glatz, B.A., 2004. Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *Journal of American Oil Chemist's Society* 81, 589-895.

Xu, S.; Boylston, T.D.; Glatz, B.A., 2005. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9064-9072.

Xu, S.; Boylston, T.D.; Glatz, B.A., 2006. Effect of inoculation level of *Lactobacillus rhamnosus* and yogurt cultures on conjugated linoleic acid content and quality attributes of fermented milk products. *Journal of Food Science* 71, 275-280.



Yadav, H.; Jain, S.; Sinha, P.R., 2007. Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal* 17, 1006-1010.

Zlatanov, S.; Laskaradis, K.; Feist, C.; Sagredos, A., 2002. CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry* 78, 471-477.

**Tabela 1**

Delineamento experimental para formulação de *cream cheeses* contendo prebiótico e probióticos

<i>Tratamento</i>	<i>Variáveis codificadas</i>		<i>Variáveis reais</i>		
	$X_1^*$	$X_2^{**}$	$X_1^*$	$X_2^{**}$	
T1	-1	-1	0,7	0,5	
T2	-1	1	0,7	1,5	
T3	1	-1	1,3	0,5	
T4	1	1	1,3	1,5	
T5	1,414	0	1,5	1,0	
T6	-1,414	0	0,5	1,0	
T7	0	1,414	1,0	1,7	
T8	0	-1,414	1,0	0,3	
T9	0	0	1,0	1,0	
T10	0	0	1,0	1,0	
T11	0	0	1,0	1,0	
T12***	-----	-----	-----	-----	
Variáveis símbolos independentes	Níveis codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
$X_1^*$ (%)	0,5	0,7	1	1,3	1,5
$X_2^{**}$ (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

\*  $X_1$  = concentração de probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*).

\*\*  $X_2$  = concentração de prebiótico (inulina).

\*\*\*T12 = tratamento-controle (isento de prebiótico e probióticos).

**Tabela 2**

Perfil de ácidos graxos e CLA (expressos em mg/g gordura) em *cream cheeses* contendo inulina e probióticos durante o armazenamento<sup>a,b</sup> (Parte I)

		AGS	AGMI	AGPI	Trans	CLA
Leite		359,38±13,10	183,28±15,90	19,07±1,78	12,70±1,51	4,57±0,15
T1	1d	333,50±35,91 <sup>a</sup>	143,07±13,13 <sup>a</sup>	15,64±1,73 <sup>a</sup>	13,19±1,31 <sup>a</sup>	4,05±0,16 <sup>a</sup>
	15d	303,23±7,73 <sup>ab</sup>	133,46±2,35 <sup>ab</sup>	14,20±0,24 <sup>ab</sup>	14,20±0,18 <sup>a</sup>	3,98±0,03 <sup>a</sup>
	30d	254,12±21,93 <sup>ab</sup>	117,89±9,26 <sup>ab</sup>	13,61±1,16 <sup>ab</sup>	13,61±0,90 <sup>a</sup>	3,17±0,19 <sup>a</sup>
	45d	230,03±6,39 <sup>b</sup>	102,62±4,32 <sup>b</sup>	10,62±0,46 <sup>b</sup>	9,37±0,02 <sup>b</sup>	3,28±0,01 <sup>a</sup>
T2	1d	411,18±20,79 <sup>a</sup>	189,90±7,87 <sup>a</sup>	15,80±1,02 <sup>a</sup>	16,28±0,68 <sup>a</sup>	5,91±0,02 <sup>a</sup>
	15d	296,59±2,91 <sup>b</sup>	129,67±0,25 <sup>b</sup>	13,49±0,20 <sup>ab</sup>	11,93±0,31 <sup>b</sup>	3,86±0,01 <sup>bc</sup>
	30d	274,95±2,14 <sup>b</sup>	124,81±6,76 <sup>b</sup>	13,85±1,05 <sup>ab</sup>	10,82±0,28 <sup>b</sup>	3,57±0,13 <sup>c</sup>
	45d	290,29±0,61 <sup>b</sup>	121,56±1,99 <sup>b</sup>	12,72±0,08 <sup>b</sup>	11,36±0,06 <sup>b</sup>	4,06±0,07 <sup>b</sup>
T3	1d	347,99±10,27 <sup>a</sup>	148,90±10,27 <sup>a</sup>	10,94±0,04 <sup>c</sup>	13,86±0,18 <sup>a</sup>	4,83±0,10 <sup>a</sup>
	15d	346,06±12,91 <sup>a</sup>	152,65±0,57 <sup>a</sup>	16,09±0,14 <sup>a</sup>	13,88±0,01 <sup>a</sup>	4,59±0,01 <sup>b</sup>
	30d	272,37±14,29 <sup>b</sup>	120,87±4,76 <sup>b</sup>	13,24±0,67 <sup>b</sup>	10,76±0,60 <sup>c</sup>	3,60±0,03 <sup>c</sup>
	45d	321,14±2,11 <sup>a</sup>	143,30±3,78 <sup>a</sup>	15,01±0,42 <sup>a</sup>	12,39±0,06 <sup>b</sup>	4,60±0,04 <sup>ab</sup>
T4	1d	386,54±5,39 <sup>a</sup>	168,91±7,81 <sup>a</sup>	13,84±0,6 <sup>ab</sup>	15,08±0,58 <sup>a</sup>	5,59±0,12 <sup>a</sup>
	15d	322,71±24,81 <sup>b</sup>	143,33±11,22 <sup>a</sup>	14,88±1,28 <sup>a</sup>	12,10±0,70 <sup>b</sup>	4,28±0,14 <sup>b</sup>
	30d	229,42±8,13 <sup>c</sup>	103,43±1,31 <sup>b</sup>	11,32±0,21 <sup>b</sup>	9,45±0,49 <sup>c</sup>	3,24±0,05 <sup>c</sup>
	45d	239,99±6,29 <sup>c</sup>	107,63±0,74 <sup>b</sup>	12,01±0,36 <sup>b</sup>	9,80±0,28 <sup>c</sup>	3,36±0,08 <sup>c</sup>
T5	1d	250,77±6,57 <sup>d</sup>	111,22±5,10 <sup>b</sup>	11,36±0,20 <sup>d</sup>	10,64±0,16 <sup>b</sup>	3,63±0,14 <sup>c</sup>
	15d	322,20±2,65 <sup>b</sup>	145,23±0,44 <sup>a</sup>	15,22±0,44 <sup>b</sup>	12,27±0,12 <sup>a</sup>	4,42±0,09 <sup>b</sup>
	30d	388,03±8,15 <sup>a</sup>	140,02±4,01 <sup>a</sup>	16,77±0,44 <sup>a</sup>	10,33±0,34 <sup>b</sup>	5,04±0,08 <sup>a</sup>
	45d	276,68±2,10 <sup>c</sup>	120,75±2,37 <sup>b</sup>	12,87±0,19 <sup>c</sup>	10,78±0,05 <sup>b</sup>	3,86±0,03 <sup>c</sup>
T6	1d	386,20±15,40 <sup>a</sup>	135,45±5,93 <sup>a</sup>	10,20±0,12 <sup>b</sup>	13,59±0,39 <sup>a</sup>	4,50±0,01 <sup>a</sup>
	15d	304,54±33,45 <sup>ab</sup>	121,94±4,30 <sup>a</sup>	13,25±1,02 <sup>a</sup>	12,07±1,26 <sup>ab</sup>	3,61±0,17 <sup>a</sup>
	30d	295,82±11,84 <sup>ab</sup>	131,74±6,28 <sup>a</sup>	14,10±0,47 <sup>a</sup>	11,99±0,59 <sup>ab</sup>	4,03±0,17 <sup>a</sup>
	45d	255,31±19,19 <sup>b</sup>	115,17±9,47 <sup>a</sup>	11,80±0,04 <sup>ab</sup>	10,17±0,13 <sup>b</sup>	3,57±0,19 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Os valores são as médias±DP. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p<0,05$ ) para os dias de estocagem em um mesmo tratamento. <sup>b</sup>Abreviaturas: AGS=Σácidos graxos saturados; AGMI=Σácidos graxos monoinsaturados; AGPI=Σácidos graxos poliinsaturados; CLA= ácido linoléico conjugado.

**Tabela 3**

Perfil de ácidos graxos e CLA (expressos em mg/g gordura) em *cream cheeses* contendo inulina e probióticos durante o armazenamento<sup>a,b</sup> (Continuação)

		AGS	AGMI	AGPI	Trans	CLA
T7	1d	300,96±32,31 <sup>a</sup>	147,95±11,07 <sup>a</sup>	13,02±0,28 <sup>b</sup>	10,80±1,85 <sup>a</sup>	4,57±0,20 <sup>a</sup>
	15d	318,46±0,64 <sup>a</sup>	160,03±4,06 <sup>a</sup>	15,47±0,35 <sup>a</sup>	11,64±0,10 <sup>a</sup>	4,88±0,19 <sup>a</sup>
	30d	226,74±0,39 <sup>a</sup>	103,68±0,04 <sup>b</sup>	11,13±0,21 <sup>c</sup>	8,47±0,01 <sup>a</sup>	2,78±0,01 <sup>b</sup>
	45d	272,62±5,23 <sup>a</sup>	137,59±1,61 <sup>ab</sup>	13,86±0,22 <sup>b</sup>	9,46±0,42 <sup>a</sup>	3,77±0,13 <sup>ab</sup>
T8	1d	331,89±8,90 <sup>a</sup>	169,64±6,35 <sup>a</sup>	13,08±1,33 <sup>ab</sup>	12,18±0,50 <sup>a</sup>	5,09±0,10 <sup>a</sup>
	15d	339,61±1,09 <sup>a</sup>	167,07±0,43 <sup>a</sup>	16,54±0,62 <sup>a</sup>	12,13±0,28 <sup>a</sup>	4,85±0,16 <sup>a</sup>
	30d	240,28±9,90 <sup>b</sup>	121,34±1,22 <sup>b</sup>	12,45±1,14 <sup>b</sup>	9,06±0,41 <sup>b</sup>	2,62±0,06 <sup>c</sup>
	45d	265,46±3,68 <sup>b</sup>	131,82±2,14 <sup>b</sup>	13,23±0,01 <sup>ab</sup>	9,41±0,20 <sup>b</sup>	3,72±0,04 <sup>b</sup>
T9	1d	317,53±7,76 <sup>a</sup>	159,81±5,65 <sup>a</sup>	16,24±0,51 <sup>a</sup>	11,47±0,28 <sup>a</sup>	3,57±0,05 <sup>b</sup>
	15d	33,93±12,06 <sup>a</sup>	150,75±4,52 <sup>a</sup>	14,66±0,44 <sup>ab</sup>	11,28±0,28 <sup>a</sup>	4,49±0,06 <sup>a</sup>
	30d	227,77±1,03 <sup>c</sup>	116,30±0,30 <sup>b</sup>	12,68±0,33 <sup>b</sup>	9,02±0,18 <sup>b</sup>	2,70±0,02 <sup>c</sup>
	45d	283,01±3,19 <sup>b</sup>	140,70±6,31 <sup>a</sup>	13,74±0,65 <sup>b</sup>	9,48±0,08 <sup>b</sup>	3,70±0,02 <sup>b</sup>
T10	1d	313,15±39,03 <sup>a</sup>	165,71±12,83 <sup>a</sup>	12,34±0,28 <sup>b</sup>	11,97±2,07 <sup>a</sup>	4,14±0,03 <sup>b</sup>
	15d	327,17±4,46 <sup>a</sup>	165,61±0,87 <sup>a</sup>	15,90±0,14 <sup>a</sup>	11,86±0,51 <sup>a</sup>	4,99±0,01 <sup>a</sup>
	30d	265,90±6,65 <sup>a</sup>	135,21±0,15 <sup>a</sup>	14,77±0,19 <sup>a</sup>	10,25±0,28 <sup>a</sup>	3,00±0,12 <sup>c</sup>
	45d	272,11±11,62 <sup>a</sup>	136,01±1,14 <sup>a</sup>	12,84±0,84 <sup>b</sup>	9,47±0,21 <sup>a</sup>	3,61±0,16 <sup>b</sup>
T11	1d	354,58±32,49 <sup>a</sup>	177,26±10,88 <sup>a</sup>	14,71±1,68 <sup>a</sup>	12,74±0,83 <sup>a</sup>	5,10±0,20 <sup>a</sup>
	15d	292,97±7,73 <sup>ab</sup>	150,11±0,51 <sup>ab</sup>	15,59±0,08 <sup>a</sup>	10,27±0,20 <sup>b</sup>	3,73±0,10 <sup>b</sup>
	30d	247,88±1,12 <sup>b</sup>	126,27±1,27 <sup>b</sup>	13,84±0,08 <sup>a</sup>	9,76±0,07 <sup>b</sup>	2,85±0,05 <sup>b</sup>
	45d	298,45±4,57 <sup>ab</sup>	163,36±0,61 <sup>ab</sup>	15,83±0,77 <sup>a</sup>	9,71±0,09 <sup>b</sup>	4,09±0,02 <sup>ab</sup>
T12	1d	287,50±19,67 <sup>ab</sup>	143,37±12,67 <sup>b</sup>	13,48±1,36 <sup>b</sup>	11,23±1,16 <sup>a</sup>	4,36±0,15 <sup>a</sup>
	15d	339,47±35,16 <sup>a</sup>	182,53±8,16 <sup>a</sup>	17,44±0,59 <sup>a</sup>	11,90±0,08 <sup>a</sup>	3,93±0,09 <sup>a</sup>
	30d	236,81±4,98 <sup>b</sup>	120,53±2,12 <sup>b</sup>	12,86±0,21 <sup>b</sup>	9,22±0,25 <sup>a</sup>	2,74±0,11 <sup>b</sup>
	45d	288,13±5,32 <sup>ab</sup>	146,49±0,77 <sup>b</sup>	14,23±0,17 <sup>b</sup>	10,15±0,69 <sup>a</sup>	3,89±0,18 <sup>a</sup>

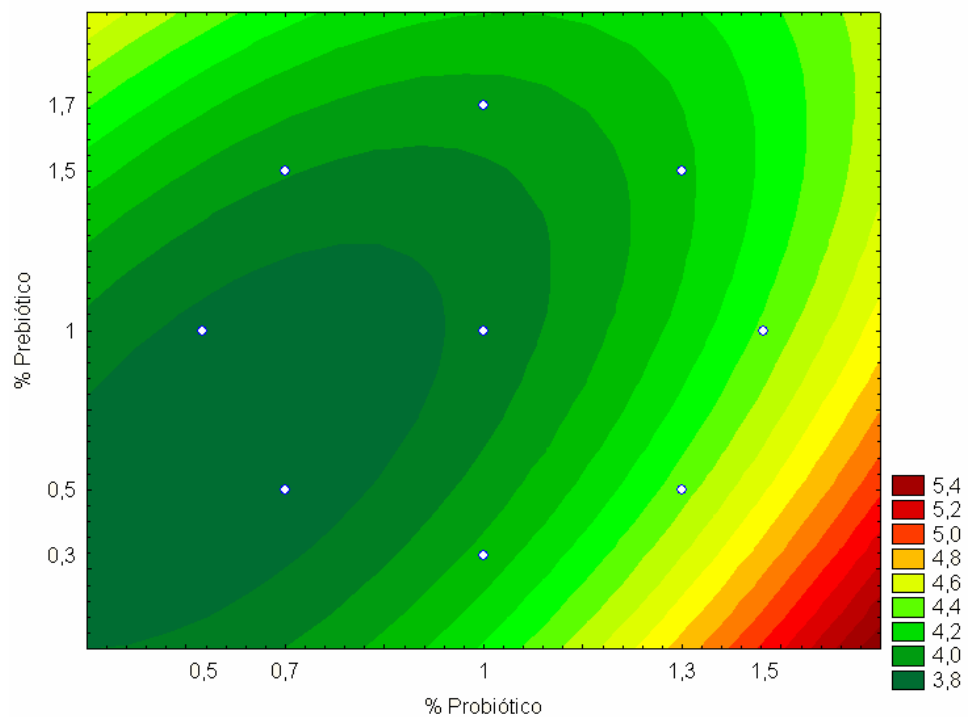
<sup>a</sup>Os valores são as médias±DP. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05) para os dias de estocagem em um mesmo tratamento.

<sup>b</sup>Abreviaturas:AGS=Σácidos graxos saturados; AGMI=Σácidos graxos monoinsaturados; AGPI=Σácidos graxos poliinsaturados; CLA= ácido linoléico conjugado.

**Tabela 4**Coeficientes do modelo<sup>a</sup> de regressão linear múltipla

Coeficientes		Constante	p
Intercepto	$\beta_0$	3,097	0,165
Linear	$\beta_1$	0,165	0,959
	$\beta_2$	0,942	0,637
Quadrático	$\beta_{11}$	0,952	0,514
	$\beta_{22}$	0,420	0,558
Interação	$\beta_{12}$	-1,696	0,218
$R^2$		0,073	

<sup>a</sup> $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$ , onde  $Y = \text{CLA (mg/g gordura)}$ ,  $X_1 =$  concentração de probiótico e  $X_2 =$  concentração de prebiótico.



**Figura 1**

Superfície de resposta mostrando o efeito da interação de prebiótico (inulina) e probióticos (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) sobre o teor de ácido linoléico conjugado (CLA) (mg/g gordura) em *cream cheese*.

## 4 DISCUSSÃO GERAL

A preocupação com a melhora na qualidade de vida da população tem despertado interesse científico e comercial nas últimas décadas. O conceito de alimento funcional tem evoluído com o surgimento constante de novos alimentos com alegações de propriedades benéficas ao organismo. Dentre os alimentos funcionais atualmente disponíveis no mercado, os derivados do leite figuram como os mais conhecidos e consumidos. Estes produtos incluem principalmente leites fermentados e queijos, com alegações funcionais principalmente pela adição de bactérias benéficas, conhecidas como probióticas.

Sendo de grande interesse da população o desenvolvimento de novos produtos com propriedades funcionais, foi desenvolvido o presente trabalho buscando estudar o efeito da adição de bactérias probióticas (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) e de prebiótico (inulina) sobre *cream cheese*. Além de analisar as modificações físico-químicas e sensoriais ocorridas pela adição dos pre- e probióticos em diferentes concentrações, foi verificado o quanto esta adição afetou o perfil lipídico das formulações, enfocando especialmente no teor de ácido linoléico conjugado (CLA), um conjunto de isômeros do ácido linoléico capaz de proporcionar efeitos benéficos ao organismo.

O Manuscrito 1 mostrou que diferentes concentrações de pre- e probiótico pouco influenciaram nas características físico-químicas dos queijos, apresentando composições semelhantes ao tratamento-controle. A viabilidade dos micro-organismos foi garantida para a cultura *starter* (*Streptococcus thermophilus*) e para a cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* em todos os tratamentos; o mesmo não ocorreu para *Lactobacillus acidophilus*, que teve seu número de células viáveis reduzido ao longo do armazenamento. Ainda assim, o fato de a cultura bífida permanecer a níveis acima de  $10^6$  UFC/g durante os 45 dias de armazenamento é interessante, já que o produto atende a quantidade mínima satisfatória para obter os efeitos desejados mesmo nos tratamentos com baixas concentrações de probióticos. Deste modo, atende-se tanto a necessidade do consumidor em ingerir um produto dotado de potencial probiótico quanto aos anseios da indústria, que vê na adição de baixas concentrações de cultura uma alternativa de redução de custos.

Do mesmo modo, as diferentes concentrações de inulina e de cultura probiótica não afetaram a qualidade sensorial das formulações, como pode ser visto no Artigo 1. A média das

notas obtidas para os parâmetros sensoriais na avaliação por escala hedônica foram estatisticamente iguais às da formulação-controle; tampouco foi encontrada diferença estatística no teste de ordenação. Superfícies de resposta foram elaboradas para verificar a interação entre os diferentes níveis de pre- e probióticos adotados e os parâmetros sensoriais analisados, verificando que, apesar dos termos lineares, quadráticos e de interação não terem sido significativos ( $p > 0,05$ ) (excetuando textura), os gráficos apontam regiões com tendência de maior aceitação sensorial, diferentes para cada parâmetro analisado.

Assim como o potencial funcional de um alimento, a quantidade de gorduras saturadas, insaturadas e trans também interessam ao consumidor preocupado com o bem-estar e saúde. O perfil lipídico das formulações foi verificado no Manuscrito 2, com interesse especial sobre a quantidade de ácido linoléico conjugado (CLA). Inúmeros estudos atestam as propriedades fisiológicas deste ácido graxo, incluindo prevenção a certos carcinomas, melhora do sistema imune, redução do risco de doenças coronárias e diminuição da gordura corporal. Apesar do CLA existir naturalmente no leite e seus derivados, a adição probióticos tem sido indicada para aumentar os níveis deste ácido graxo em lácteos, uma vez que estas bactérias possuem enzima capaz de isomerizar o ácido linoléico.

Dado o exposto acima, esperava-se que a adição de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* incrementasse os níveis de CLA das formulações, proporcionalmente à quantidade de inóculo. Entretanto, os diferentes níveis de probiótico não afetaram significativamente a quantidade de CLA, apresentando coeficientes linear, quadrático e de interação insignificantes ( $p > 0,05$ ) na regressão linear múltipla. Os teores de CLA encontrados em todas as formulações acrescidas de probióticos, assim como a quantidade de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e trans, foram de modo geral similares à composição lipídica do leite usado na elaboração dos queijos e à formulação-controle. Ainda assim, a superfície de resposta elaborada com os diferentes níveis de pre- e probióticos indicam que quanto maior o nível de probiótico adicionado, maior tendência à produção de CLA, sugerindo novos estudos em que concentrações superiores de probiótico sejam avaliadas. Contudo, deve-se levar em consideração aspectos como a capacidade lipolítica e proteolítica das culturas a serem usadas, uma vez que lipólise e/ou proteólise excessiva podem alterar os atributos sensoriais do produto e comprometer sua qualidade como um todo e o custo do produto.



## 5. CONCLUSÕES

- *Cream cheese* é um bom carreador de probióticos mesmo quando adicionado de baixas concentrações de cultura, uma vez que garantiu por até 45 dias a quantidade mínima considerada ideal para obtenção dos benefícios proporcionados pela ingestão de probióticos em todos os tratamentos.
- A adição de diferentes concentrações de cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* e do prebiótico inulina não alteraram significativamente as características físico-químicas e sensoriais das formulações de *cream cheese*.
- As diferentes quantidades de probiótico adotadas neste estudo não alteraram o perfil lipídico de *cream cheese*, tampouco foram capazes de aumentar o teor de ácido linoléico conjugado (CLA), sugerindo novos estudos em que concentrações superiores de cultura probiótica sejam avaliadas e/ou fontes exógenas de ácido linoléico sejam adotadas para tornar o *cream cheese* um alimento fornecedor não apenas de probióticos, mas também de CLA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerate storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 613-621, 2004.

AKALIN, A.S. et al. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 9, p. 1089-1095, 2007.

ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentration. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 201-208, 2002.

ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: origem e tecnologia**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002. 140p.

ALVES, L. L. et al. Qualidade físico-química e microbiológica de amostras comerciais de *cream cheese* e queijo processado consumidos no RS. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008, 1CD-ROM.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC**. 18th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 2005.

ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.

BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology, **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BAUMAN, D.E.; CORL, B.A.; PETERSON, B.A. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. In: Sebédio, J.L., Christie, W.W.; Adlof, R. (Editores). **Advances in conjugated linoleic acid research**. Champaign:AOCS, 2003. p.46-173.

BERGAMINI, C.V., et al. Probiotic bacteria as adjunct starters:influence of addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinian cheese. **Food Research International**, v. 38, n. 5, p. 597-604, 2005.

BEIJERINCK, M.W. Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry). **Arch. Neerland des sciences exactes et naturelles**, v. 6, p. 212-243, 1901 (em francês).

BLANCHETTE, L. et al. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 27, p. 911-917, 1959.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**: an introduction to design data analysis and model building. New York: Wiley, 1978. 653p.

BOYLSTON, T.D.; BEITZ, D.C. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1973-1978, 2002.

BOYLSTON, T.D. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BRASIL. Produção Brasileira de Queijo 1991/1995/2000/2004. Tabela 04.24. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0424.php>> Acesso em: 08 ago. 2007.

BREARTY, S.Mc. et al. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 599-610, 2001.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.R.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005a.

\_\_\_\_\_. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p.173-180, 2005b.

BURITI, F.C.A. et al. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus termophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1605-1610, 2007.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R., SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

CARDARELLI, H.R. et al. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1318-1324, 2008a.

CARDARELLI, H.R. et al. Inulin and oligofrutose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008b.

CAHN, Dr. Über die nach Gram färbbaren Bacillen ds Säulingsstuhles (Bacilli of infant stools stainable according to Gram). **Centralblatt für Bakteriologie I. Abteilung Originale**, v. 30, p. 721-726, 1901 (em alemão).

CHAMBA, J.F.; PERREARD, E. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. **Lait**, v. 82, n. 1, p. 33-44, 2002.

CHRISTIAN HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. 5 p. [Analytical Procedment]. 1999.

COAKLEY, M. et al. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 138-145, 2003.

COLLOMB, M. et al. Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects- Review. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10/11, p. 1347-1361, 2006.

CONWAY, P. Prebiotics and human health: the state –of-the-art and future perpectivas. **Scandinavian Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 13-21, 2001.

DAIGLE, A. et al. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacetrium infantis*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 6, p. 1081-1091, 1999.

DAS, S. et al. Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6/9, p. 807-815, 2005.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 31-41, 1997.

DAVIDSON, R.H. et al. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yoghurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2854-2864, 1994.

DÖDERLEIN, A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber (The vaginal transsudate and its significance for childbed fever). **Centralblatt für Bacteriologie**, v. 11, p. 699-700 (em alemão).

DUTCOSKI, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.122 p.

EKINCI, F.Y. et al. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 216-224, 2008.

FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Higiene Alimentar**, v. 22, n. 163, p. 16-21, 2008.

FERREIRA, C.L.L.; TESHIMA, E. Prebióticos: estratégia dietética para manutenção da microbiota colônica desejável. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 22-25, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FUNK, L.G.; BARRERA-ARELLANO, D.; BLOCK, J.M. Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 2, p. 123-134, 2006.

FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M. **Tecnologia de Queijos**: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar LTDA, p. 30-32, 1994.

GARCIA-LÓPEZ, S. et al. Changes in the content of conjugated linoleic acid (CLA) in processed cheese during processing. **Food Research International**, v. 27, p. 61-64, 1994.

GARDINER, G. et al. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2192-2199, 1998.

GIBSON, G.R.;ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GNÄDIG, S. et al. Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.1-5, 2004.

GOBBETTI, M. et al. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 37-47, 1998.

GUGGISBERG, D. et al. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 2, 107-115, 2009.

GUVEN, M. et al. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 3, p. 180-184, 2005.

HA, Y.;GRIMM, N.; PARIZA, M. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1881-1887, 1987.

\_\_\_\_\_.Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheese. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 75-81, 1989.

HARTMAN,L.; LAGO,R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Lab. Pract.**, London, v. 22, p. 475-476, 1973.

HAYASHI, A.A. **Efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA) na composição do leite, no perfil de ácidos graxos e na atividade de enzimas lipogênicas em ratas lactantes**. 2003. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz , Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HEKMAT, S.; McMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 6, p. 1415-1422, 1992.

HENNELLY, P.J. et al. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 3, p. 388-395, 2006.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 109-116, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IAL, 1985. 533p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms**. IDF/ISO Standard, 1997. 5p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Bulletin of the IDF 306, 23-33. 1999.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: Research and development in Japan. **Food Technology**, v. 47, p. 129-134, 1993.

JIANG, J. et al. Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11 octadecenoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 3, p. 438-445, 1996.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KAISALAPATHY, K.; HARMSTOF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1317-1322, 2008.

KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1067-1073, 2004.

KELLY, M.L. et al. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 881-885, 1998.

KIM, Y.L.; LIU, R.H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1731-1737, 2002.

KIP, P.; MEYER, D.; JELLEMA, R.H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1098-1103, 2006.

KRAFT FOODS. Contém informações sobre histórico, linha de produtos, filiais e contato da empresa. Disponível em <<http://www.kraft.com>> Acesso em 02 abr.2007.

KRISTENSEN, D.; SKIBSTED, L.H.. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3099-3104, 1999.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration medium of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 446- 451, 1996.

LAVILLONNIÈRE, F. et al. Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in Frech cheeses. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 75, n. 3, p. 343-352, 1998.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factores produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIN, H. et al. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2358-2365, 1995.

LIN, H. et al. Factors affecting the conjugated linoleic acid content of Cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 801-807, 1998.

LIN, T.Y. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. **Food Chemistry**, v. 69, n.1, p. 27-31, 2000.

LIN, T.Y. Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 11-14, 2003.

LIN, T.Y.; LIN, C.W.; LEE, C.H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. **Food Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 1-5, 1999.

LUCAS, A. et al. Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheese by visible-near-infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 6, p. 595-604, 2008.



LUCKEY, T.D.; FLOCH, M. H. Introduction to intestinal microecology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 25, p. 1291-1295, 1972.

LUNA, P. et al. Milk fat replacement by PUFA enriched fat in fermented milks: effects on healthy fatty acids and volatile compounds. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 7, p. 417-423, 2004.

LUNA, P.; DE LA FUENTE, M.A.; JUÁREZ, M.A. Conjugated linoleic acid in processed cheeses during the manufacturing stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2690-2695, 2005.

LUNA, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M.A. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheese protected with designation of origin. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1465-1472, 2007.

MAIA, F. et al. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: produção, composição e perfil dos ácidos graxos do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1504-1513, 2006.

MAGARIÑOS, H. et al. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 128-134, 2007.

MARTÍN-DIANA, A.B. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 10, p. 827-833, 2003.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional dairy products**. New York: CRS Press, 2003. 395p.

MEDEIROS, S.R. **Ácido linoléico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado**. 2002. 114f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MENÉNDEZ, S. et al. Effect of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n. 1/2, p. 37-46, 2000.

MORO, E. Über den *Bacillus acidophilus* n. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings (*Bacillus acidophilus* n. spec.) (A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infants). **Jahrbuch für Kinderheilkunde**, v. 52, p. 38-55, 1900 (em alemão).

MOURÃO, D. et al. Ácido linoléico conjugado e perda de peso. **Revista de Nutrição**, v. 18 n. 3, p. 391-399, 2005.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1402-1406, 1999.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D.C. Frutooligosacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

OGAWA, J. et al. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria – Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 355-364, 2005.

OLIVEIRA, R.P.S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 467-472, 2009.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 937-945, 2007.

ÖZER, D.; AKIN, S.; ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 1, p. 19-26, 2005.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors affecting milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.

PARIZA, M.W. et al. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, v. 7, p. 63-69, 1979.

PARIZA, M.W. et al. Mutagens and modulator on mutagenesis in fried ground beef. **Cancer Research**, v. 43, p. 2444s-2446s, 1983.

PARIZA, M.W.; HARGRAVES, W.A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7-12dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 591-593, 1985.

PARIZA, M.W. et al. Modulation of carcinogenesis by dietary factors. **Environmental Health Perspectives**, v.67, p.25-29, 1986.

PETTERSEN, M.K.; EIE, T.; NILSSON, A. Oxidative stability of cream cheese stored in thermoformed trays as affected packaging material, drawing depth and light. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 355-362, 2005.

PHILADELPHIA CREAM CHEESE. Site da marca Philadelphia®, Kraft Foods. Disponível em: <[www.philadelphia.com.uk](http://www.philadelphia.com.uk)> Acesso em: 27 abr. 2007.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas:Casa do Pão Editora, 2005.

SAINANI, M.R; VYAS, H.K.; TONG, P.S. Characterization of particles in cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2854-2863, 2004.

SANCHEZ, C. et al. Effects of processing on rheology and structure of double cream cheese. **Food Research International**, v. 28, n. 6, p. 547-552, 1995.

SANTOS, F. et al. Efeito da suplementação de lipídios na ração sobre a produção de ácido linoléico conjugado (CLA) e na composição da gordura do leite de vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1931-1938, 2001.

SANZ, Y.; COLLADO, M.C.; DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. **Acta Pediatrica Espanhola**, v. 61, p. 476-482, 2003.

SAXELIN, M.; KORPELA, R.; MAYRA-MAKINEN, A. Classifying functional dairy products. In: Matilla-Sandholm, T.; Saarela, M. (editores). **Functional dairy products**. Washington:CRC Press, 2003. cap. 1, p. 1-16.

SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHANTA, N.C.; DECKER, E.A.; USTUNOL, Z. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 69, n. 5, p. 425-428, 1992.

SHANTA, N.C. et al. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affect by processing and storage. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 695-697, 1995.

SHORTT, C.; O'BRIEN, J., 2004. **Handbook of functional dairy products**. Washington: CRC Press, 2004. 294p.

SIEBER, R. et al. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2004.

SILVA, S.V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SOUZA, C.H.B; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 633-640, 2009.

STANTON, C. et al. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5/6, p. 491-496, 1998.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1104-1112, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT)**. 6. ed. Santa Maria:Editora da UFSM, 2006.68p.

UYSAL, H. et al. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 3, p. 177-181, 2003.

VAN NIEUWENHOVE, C.P. et al. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p.559-564, 2007.

VERGIO, F. Anti- und Probiotika. **Hippokrates**, v. 25, p. 16-119, 1954.

VINDEROLA, C.G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal Dairy Science.**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.

XU, S.; BOYLSTON, T.D.; GLATZ, B.A. Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 81, n. 6, p. 589-895, 2004.

\_\_\_\_\_. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9064-9072, 2005.

\_\_\_\_\_. Effect of inoculation level of *Lactobacillus rhamnosus* and yogurt cultures on conjugated linoleic acid content and quality attributes of fermented milk products. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. 275-280, 2006.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 1006-1010, 2007.

YILMAZTEKIN, M.; ÖZER, B.H.; ATASOY, F. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium* BB-02 in white-brined cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 53-60, 2004.

ZLATANOS, S. et al. CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 471-477, 2002.

## **ANEXOS**



## ANEXO A – Ficha de Avaliação Sensorial

(Exemplo de uma ficha sensorial de um bloco)

### ANÁLISE SENSORIAL DE *CREAM CHEESE*

Você está recebendo 4 amostras de *cream cheese*. Por favor, assinale uma nota (número) para cada parâmetro conforme a legenda abaixo:

<i>Parâmetro/Amostra</i>	<b>286</b>	<b>453</b>	<b>714</b>	<b>352</b>
Aparência Global				
Cor				
Aroma				
Textura				
Acidez				
Sabor				

#### **Legenda:**

- |                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 1 – Desgostei muitíssimo | 4 – Indiferente  |
| 2 – Desgostei muito      | 5 - Gostei       |
| 3 – Desgostei            | 6 – Gostei muito |
| 7 – Gostei muitíssimo    |                  |

Agora ordene as amostras conforme sua preferência:

- 1° lugar (mais gostei): \_\_\_\_\_ 3° lugar: \_\_\_\_\_  
 2° lugar: \_\_\_\_\_ 4° lugar (menos gostei): \_\_\_\_\_

## **Anexo B – Normas para publicação no periódico International Journal of Food Microbiology**

### **Guide for Authors**

An official journal of [the International Union of Microbiological Societies \(IUMS\)](#) and the [International Committee on Food Microbiology and Hygiene \(ICFMH\)](#)

#### **Submission of Papers**

Submission of all types of manuscripts to *International Journal of Food Microbiology* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal (☞ <http://ees.elsevier.com/food>) you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail generated by EES and via the author's homepage, removing the need for a hard copy paper trail. Authors must submit revisions via EES. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status or journal procedures to [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Editor-in-Chief: Professor Luca CoccolinDIVAPRA, Faculty of Agriculture, University of TurinVia Leonardo da Vinci 4410095 GrugliascoTurinItaly

E-mail: [lsocolin.ijfm@unito.it](mailto:lsocolin.ijfm@unito.it) It is the author's responsibility to ensure that manuscripts are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted for further review. *Language Polishing*: For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission (for which there will be a charge) please visit ☞ <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions [www.elsevier.com/termsconditions](http://www.elsevier.com/termsconditions).

Submission of a manuscript implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

**Funding body agreements and policies** Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.



### Types of Contributions

- *Full-length Research Articles* are complete reports of original, scientifically sound research. They must contribute new knowledge and be organized as described in this Guide. Manuscripts should not exceed 8000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- *Short Communications* are brief reports of scientifically sound research, but of limited scope (for example, limited number of samples analysed), that contribute new knowledge. They should be prepared as described in this Guide, and should not exceed 4000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- *Reviews* are papers which provide an analysis of a scientific or applied field, which include all important findings and bring together reports from a number of sources. Manuscripts should not exceed 12,000 words (excluding references). Review articles may be invited by the Editor or the Editorial Board. Alternatively, potential authors considering the preparation of a Review article should contact the Editor to suggest the topic and its scope, providing an outline in the form of major headings and a summary statement. In any case, such articles are subject to the normal processes of peer review and revision.

### Manuscript Preparation

**General:** Most wordprocessing formats are accepted, but Microsoft Word, WordPerfect or LaTeX are preferred. Ensure that any security code/password protection that may have been incorporated into the document is removed. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used. Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. A font size of 12 or 10 pt is required. The corresponding author should be identified (an E-mail address is mandatory - if there is a change to this e-mail contact, the author must notify the publisher as soon as possible). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style - sample copies of the journal can be obtained from the journal website ⇨ <http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

**Abstract:** Each manuscript should be provided with an Abstract of no more than 400 words, stating concisely the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**Preparation of Text Files:** Follow this order when typing manuscripts:

*Full length papers:* abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, tables and figures;

*Short communications:* abstract, introduction, materials and methods, results and discussion, acknowledgments, references, tables and figures. Do not import the Figures or Tables into your text. Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers. **Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.** The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

**Title:** The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

**Equations and variables:** All equations should be centered and sequentially numbered. All variables used in the manuscript should be fully defined in a nomenclature section at the start of the paper only.

**Units:** The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' ( $10^9$  in America,  $10^{12}$  in Europe) is ambiguous and should not be used. Units must be indicated as g/L and not gL<sup>-1</sup>.

**References:** Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors. Please ensure that every reference cited within the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list, they should follow the standard reference style and should include a substitution of the publication date with either "unpublished results" or "personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

All citations in the text should refer to:

- Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
- Two authors: both authors' names and the year of publication;
- Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...". The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. Note that journal names are not to be abbreviated. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ono, K., Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology* 47, 211-219.

Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 22-70

Caddick, M.X., 1994. Nitrogen metabolite repression. In: S.D. Martinelli, S.D., Kinghorn, J.P. (Eds.), *Aspergillus: 50 Years on Progress in Industrial Microbiology*, vol. 29. Elsevier Science, Amsterdam, 323-353.

*Citing and listing of web references.* As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

**Illustrations:** Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because

of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. *Preparation of electronic illustrations*

General point • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font. • Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Provide all illustrations as separate files. • Provide captions to illustrations separately. • Produce images near to the desired size of the printed version. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site. **Tables:** Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

### **Preparation of Supplementary Data**

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Proofs**

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be e-mailed to the Log-in Department at [proofcorrections@elsevier.com](mailto:proofcorrections@elsevier.com).

**Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints will incur a 50% surcharge.

**Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/locate/authorsrights>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)

**Author Enquiries** Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's <http://www.elsevier.com/authors>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://www.elsevier.com/authors>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

## ANEXO C – Normas para publicação do periódico Alimentos & Nutrição

### Informações gerais e escopo

A revista ALIMENTOS E NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION é um periódico trimestral, especializado e arbitrado, aberto à comunidade científica nacional e internacional, que publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão relativos às áreas de Alimentos (ciência e tecnologia) e Nutrição. Os manuscritos podem ser encaminhados em português, inglês ou espanhol e serão aceitos mediante aprovação de revisores. Os trabalhos de revisão devem representar uma análise crítica de assunto atual e relevante baseando-se, inclusive, em artigos do(s) próprio(s) autor(es) e estarão condicionados à disponibilidade de publicação considerando que em cada fascículo são publicados, no máximo, dois trabalhos dessa natureza.

É vedada a reprodução dos trabalhos em outras publicações ou sua tradução para outro idioma sem a autorização da Comissão Editorial. Os originais deverão ser acompanhados de documento de transferência de direitos autorais, contendo a assinatura do(s) autor(es) e, também, de documento contendo os dados completos dos autores (nome, endereço, telefone, e-mail, área de atuação, titulação atual, local de trabalho, cargo ocupado). Lembrando que, toda mudança de endereço deverá ser comunicada imediatamente à revista.

### Preparação dos originais

#### Apresentação.

Os trabalhos devem ser digitados em uma só face, fonte Times New Roman 12, em folha de papel branco, formato A4 (210x297mm), mantendo margens laterais de 3 cm e espaço duplo em todo o texto, empregando editor de texto MS Word versão 6.0 ou superior. Todas as páginas devem ser numeradas a partir da página de identificação. Cada trabalho deverá ser enviado, via correio, em **1 via impressa e uma em disquete ou CD**, ou em uma cópia eletrônica via e-mail.

#### Estrutura do trabalho.

Os trabalhos devem obedecer à seguinte seqüência: Título; Autor(es) (por extenso e apenas o sobrenome em maiúsculo); Filiação científica do(s) autor(es) (indicar em nota de rodapé: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade-sigla, CEP, Cidade, Estado, País); Resumo (escrito no idioma do artigo, com máximo de 200 palavras); Palavras-chave (com até 7 palavras retiradas de **Thesaurus da área**, quando houver); Texto (INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODO(S), RESULTADO(S), DISCUSSÃO, CONCLUSÃO); Agradecimentos; Abstract (precedido da Referência Bibliográfica do próprio artigo, sendo o título em inglês) e Keywords; Referências bibliográficas (trabalhos citados no texto). Obs. Trabalhos escritos em inglês deverão ser acompanhados de resumo e palavras-chave em português, também precedidos da referência bibliográfica do próprio artigo e com o título em português, apresentados após os agradecimentos.

#### Referências bibliográficas.

Devem ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e numeradas consecutivamente; seguir a **NBR 6023** (agosto 2002) da ABNT. **Os autores são responsáveis pela exatidão das referências bibliográficas.**

- Livros e outras monografias (até 3 autores colocar todos os nomes separados por “;”, quando tiver mais que 3 colocar o nome do 1º e usar et al.)  
CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A.; SILVA, A. S. **Metodologia científica**: para uso dos estudantes universitários. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. 144p.

- Capítulos de livros  
BENAVIDES, H. et al. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: LASSUS, P. et al. (Ed.) **Harmful marine algal blooms**. 2<sup>nd</sup> ed. Paris: Lavoisier tercept, 1995. p.113-119.

- Entidades  
ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. **Official metohods of analysis**: method 959.08 paralytic shellfish poison – biological method. Washington, DC, 2000. cap. 49, p.49-51.

- Meio eletrônico  
CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A.; SILVA, A. S. **Metodologia científica**: para uso dos estudantes universitários. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. Disponível em: <http://www.cerbrasil.com.br>. Acesso em: 22 ago. 2007.

- Dissertações e teses  
VEIGA NETO, E. R. **Aspectos anatômicos da glândula lacrimal e de sua inervação no macaco-prego (*Cebus apella*), (Linnaeus, 1758)**. 1988. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1988.

- Artigos de periódicos

#### **Abreviaturas.**

Os títulos de periódicos deverão ser abreviados conforme o Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Index Medicus, Current Contents. DELGADO, M.C. Potassium in hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v.6, p.31-35, 2004.

- Trabalho de congresso ou similar (publicado)  
TRAINA JÚNIOR, C. GEO: um sistema de gerenciamento de base de dados orientado a objeto: estado atual de desenvolvimento e implementação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCOS DE DADOS, 6, 1991, Manaus. **Anais...** Manaus: Imprensa Universitária da FUA, 1991. p.193-207.

- Legislação  
BRASIL. Medida provisória nº 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. Estabelece multa em operações de importação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Secção 1, p. 29514.

#### **Citação no texto.**

Utilizar sistema numérico. A citação de um autor no texto (quando necessária) deverá ser pelo sobrenome e o número da referência sobrescrito. Ex: ...entendido por Silva.<sup>3</sup> No caso de dois autores, os sobrenomes devem ser separados por &. Ex: ... entendido por Silva & Rocha.<sup>3</sup> Mais de dois autores, indicar apenas o sobrenome do primeiro seguido de et al. Ex: ...entendido por Silva et al.,<sup>3</sup> ou ainda, apenas pelo número de referência sobrescrito. Ex: ...entendido pelos autores.<sup>2,3,4</sup>

**Notas**

Devem ser reduzidas ao mínimo e colocadas no pé de página. As remissões para o rodapé devem ser feitas por asteriscos, na entrelinha superior.

**Anexos e/ou Apêndices**

Serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

**Tabelas**

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo título.

**Figuras**

Desenhos, gráficos, mapas, esquemas, fórmulas, modelos (em papel vegetal e tinta nanquim, ou computador); fotografias (em papel brilhante); radiografias e cromos (em forma de fotografia). As figuras e suas legendas devem ser claramente legíveis após sua redução no texto impresso de 10x17 cm. Devem-se indicar, a lápis, no verso: autor, título abreviado e sentido da figura. Legenda das ilustrações nos locais em que aparecerão as figuras, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e iniciadas pelo termo FIGURA.

**Unidades de medida e símbolos**

Devem restringir-se apenas àqueles usados convencionalmente ou sancionados pelo uso. Unidades não-usuais devem ser claramente definidas no texto. Nomes comerciais de drogas citados entre parênteses, utilizando-se no texto o nome genérico das mesmas. Fórmulas e equações escritas em linha, por exemplo,

$$\frac{a}{b}, \text{ escreva } a/b, \sqrt{ex}, \text{ escreva } ex/2.$$

Os dados e conceitos emitidos nos trabalhos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade dos autores. Os trabalhos que não se enquadrarem nessas normas serão devolvidos aos autores, ou serão solicitadas adaptações, indicadas em carta pessoal.

## ANEXO D – Normas para publicação no periódico *International Dairy Journal*

### Guide for Authors

**Functional Dairy Foods 2009** will be held in Melbourne, Australia from 24-25 February 2009. For further information and registration, visit the website <http://www.diaa.asn.au>.

#### Aims and Scope

*International Dairy Journal* publishes original, refereed research papers and critical reviews that advance scientific knowledge of all aspects of dairy science and technology. Within this scope, the journal pays particular attention to applied research and to the interface of the dairy and food industries. The journal provides a platform for the communication of research in dairy science that is of broad relevance to the international community, including the research and development of dairy and allied products from milk of bovine and non-bovine species.

The journal's coverage includes: • Biosynthesis, chemistry and physico-chemical properties of milk constituent • Microbiology, enzymology, biotechnology and bioengineering • Dairy engineering and new developments in processing • Relevant emulsion science, food structure and texture • Raw material quality and effect on relevant products • Flavour and off-flavour development • Product development and usage of dairy ingredients in other foods • Relevant sensory science/consumer studies • Analytical, health and environmental aspects. *International Dairy Journal* does not publish papers related to milk production, feeding, cow health and other aspects of on-farm milk production, unless there is a clear relationship to dairy technology, human health or final product quality.

#### Submission of Papers

As of 19 September 2007, submission of all types of manuscripts to *International Dairy Journal* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal (<http://ees.elsevier.com/inda>) you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail generated by EES and via the author's homepage on EES, removing the need for a hard copy paper trail. Authors must submit revisions via EES. All manuscripts must be addressed to the submissions office, c/o the Editor-in-Chief. Any manuscript sent as an email attachment to the Editor-in-Chief will not be processed. The Editor-in-Chief reviews all manuscripts and, after prescreening, makes a decision whether to assign them to handling Editors to initiate peer review. The authors may be contacted by the Editor-in-Chief or the handling Editor for any required changes before a manuscript is sent to reviewers. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status or journal procedures to [support@elsevier.com](mailto:support@elsevier.com).

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Editor-in-Chief: International Dairy Journal c/o Professor P. Jelen, Editor-in-Chief University of Alberta Alberta, Canada E-mail: [idx.jelen@interbaun.com](mailto:idx.jelen@interbaun.com)

Authors are also requested to provide the names and e-mail addresses of at least three potential referees who are expert in the field. It is the journal's policy to keep the peer review



process anonymous. The name of a reviewer will only be revealed with the approval of the reviewer. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper. It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a colleague with fluency in technical writing in English prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the language of their paper (before submission). Please contact [support@elsevier.com](mailto:support@elsevier.com) for further information. **Authors are strongly advised that papers not conforming to the required standards will be rejected without review. Plagiarism and Ethical Concerns** Submission of a paper implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. By submitting this manuscript, the authors agree that text, equations, or figures from previously published articles or books have been clearly identified in full and their origin clearly explained in the adjacent text, with appropriate references given at the end of the paper. Duplication of text is rarely justified, even with diligent referencing. Exceptions may be made for descriptions of standard experimental techniques, or other standard methods used by the author in the investigation; but an appropriate citation is preferable. Authors who duplicate material from their own published work in a new article, without clearly identifying the repeated material and its source as outlined above, are self-plagiarising.

**Submission of Revised Papers** Revised papers received more than three months after reviewers' comments were sent may be treated as new submissions, at the discretion of the Editor. If the author has not replied to reminders/enquiries about revisions within 6 months, the paper will be considered to have lapsed, and any subsequent submission will be treated as a new submission and must be submitted to the journal using the above process, addressed to the Editor-in-Chief, with an explanation that it had previously been submitted to the journal.

### **Submission Checklist**

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to submitting it to the journal for review. Please consult these Instructions for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding author, with E-mail address, full postal address, telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- All figure captions (on a separate page)
- All tables (including title, description, footnotes)
- Manuscript has been "spellchecked" and units and abbreviations checked
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print (charges will apply) or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print.
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please contact the Author Support Department at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)

**Types of Contribution** *Original full-length research papers* should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000-8000 words (text and references) or about 25 manuscript pages.

*Review papers* will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years.

*Short Communications* are research papers constituting a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 2,000 words or about 8 manuscript pages, including figures, tables and references. They will be reviewed in the same way as research papers.

*Letters to the Editor* are published from time to time on subjects of topical interest.

*Book reviews* are commissioned by the Editors as warranted. Unsolicited book reviews are generally not considered.

**Manuscript Preparation General:** Manuscripts must be typewritten with a font size of 12 pt, with wide margins and double-spaced throughout, i.e. including the abstract, footnotes and references. Lines should be numbered consecutively throughout the manuscript. Authors should consult a recent issue of the journal for style. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Manuscripts can be written in either British or American English, but language and spellings must be consistent. Authors should retain a copy of their manuscript for their records. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. must be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Each line must also be numbered. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. The usage of italics should be limited to microbiological terms. Use the computer automatic return at the end of lines; use double returns after the end of paragraphs only. Manuscripts in general should be organized in the following order: • Title (should be clear, concise, and should unambiguously reflect the paper's contents) • Name(s) of author(s) • Complete postal address(es) of affiliations

• Full telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author • Present address(es) of author(s) if applicable • Complete correspondence address to which the proofs should be sent • Abstract - each paper must be submitted with an Abstract **not exceeding 150 words**, reporting concisely on the major findings. Many abstracting services use abstracts without modification, so this section should be comprehensible in its own right. References should not be cited. Abbreviations should be avoided; if absolutely necessary they must be defined.

• Introduction - briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation being reported. • Materials and methods - description of methods, equipment and techniques (including statistical treatments used in the research) • Results • Discussion (may be combined with the results section) • Conclusions (must not reiterate any discussion or introductory comments, they must be genuine conclusions drawn from the results of the study). • Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc. •

Appendix (e.g. list of abbreviations used) • References • Tables • Figure captions • Illustrations/figures.

**Note: Keywords are no longer required for submissions to *International Dairy Journal***

Following the *Introduction*, authors are free to structure papers as appropriate. However, for the sake of clarity and uniformity, the above or similar section headings are recommended. If necessary, each section may be divided into further subsections, but do not use more than two levels for subtitles.

The *Materials and Methods* section must provide enough detail that a competent worker can repeat the experiments. However, detailed descriptions of well-known methods should be avoided in the experimental section. References to the relevant literature are sufficient. The *Results* section should present clearly and succinctly the most important research results including statistical significance of the data being reported. The *Discussion* should not be a compilation of current literature, but a consideration of the significance and consequences of the authors' present findings. Each paper should contain a paragraph of *Conclusions* summarising the main aspects of the research being reported.

**Units and Abbreviations** System International (SI) units must be used. You may wish to consult the website of the Bureau International des Poids et Mesures for guidance, ☞ <http://www1.bipm.org/en/si>.

Abbreviations for units should follow British Standards Institute standard *SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units* (BS ISO 1000:1992, supersedes BS 5555). Further information is available on the BSI website ☞ <http://www.bsi-global.com>. The unit 'litre' must be abbreviated as 'L' (also mL,  $\mu$ L, etc.). Use the negative index system for all combinations of unit abbreviations (e.g.  $\text{g mL}^{-1}$ , not g/mL). However, the solidus can be used in cases of % w/w or % w/v. The unit billion ( $10^9$  in America,  $10^{12}$  in Europe) must not be used as it is ambiguous. In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. Enzyme nomenclature should follow the IUBMB Enzyme Commission recommendations (<http://www.chem.qmul.ac.uk/enzyme/>) (relevant EC numbers should be given). Standard abbreviations of units of measurement should be used to identify the data. Please ensure that all figures have axes labelled properly, and the quantities on the axes specify the units used (use the negative index system, e.g.  $\text{g mL}^{-1}$ , not g/mL). Tables should not duplicate results presented in the manuscript as a different form (e.g. in graphs). Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

**Tables** Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Each table should be typed on a separate sheet. **Do not include the Figures or Tables in the body of the manuscript.** Tables and their footnotes should be typed using a readable uniform font of the same size as that used in the text. Do not use bold letters, or italics (except for microbiological terms or gene nomenclature). Each table should have a brief and self-explanatory title. The text should include reference to all tables. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used; leave extra space between the columns instead. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory.

**Formulae and Equations** • Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae. • Subscripts and superscripts should be clear. • All symbols used in the formulae should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l. • Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. • For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line. • All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. • The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp. • Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ . • In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{CO}_3^{--}$ . • Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ . • The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### Footnotes

Footnotes should be avoided unless absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### References

**Please note: Requirements for citations in text and listing of authors names in references have been changed, and will take effect for all papers submitted after 1 September 2007.**

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list at the end of the manuscript (and vice versa). All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication.

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

The list of references must be arranged alphabetically on authors' names, and should be as full as possible, **listing all authors**, the full title of articles and full title of journals, publisher and year.

Titles of periodicals mentioned in the list of references must be spelled out in full. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. References concerning unpublished data and "personal communications" must not be cited in the reference list but may be mentioned in the text, giving the full details (name and affiliation of the contact). References included in the reference list as "in press" should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication data with "in press". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. In the final publication, material referenced as "submitted" is not acceptable - if it cannot be referenced as "in press" then the text needs to be revised to state "unpublished results" and the reference deleted from the reference list.

*Citing and listing of web references.* As a minimum, the full website address (URL) should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Use of web references should be minimised and limited to verifiable, credible sources only. The following are examples of reference layouts. Please use a hanging indent (second and subsequent lines indented).

**Reference to a chapter in a monograph:**

Maubois, J.-L., & Olivier, G. (1992). Milk protein fractionation. In *New applications of membrane processing* (pp. 112-120). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

**Reference to a chapter in a book**

De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Vol. 1: Proteins* (3rd ed) (pp.233-276). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

**Reference to an article in a journal:**

Lane, C. N., & Fox, P. F. (1997). Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 7, 55-63.

**Note: If necessary, cite issue number if page numbering is not continuous.**

**Reference to a book:**

Marsh, D. (1990). *CRC handbook of lipid bilayers*. Boston, MA, USA: CRC Press.

**Reference to a published standard:**

IDF (1982). *Cheese and processed cheese-determination of total solids content*. IDF Standard 4a. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

**Reference to a paper in published conference proceedings:**

Maubois, J. L. (1998). Fractionation of milk proteins. In *Proceedings of the 25th International Dairy Congress* (Vol. II, pp. 74-86). Dairy Science and Technology: Aarhus, Denmark.

#### **Reference to a thesis:**

Alting, A. C. (2003). Cold gelation of globular proteins. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

**Note: The thesis should be publicly available.**

#### **Reference to an article in an internet-only source:**

Bryant, P. (1999). *Biodiversity and Conservation*. Retrieved October 4, 1999, from [darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlepage.htm](http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlepage.htm)

#### **Illustrations**

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

*Preparation of electronic illustrations* General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site.

#### **Preparation of Supplementary Data**

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

## Copyright

All authors must sign the 'Transfer of Copyright' agreement before the article can be published. (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/locate/authorsrights>). This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. It includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including the reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that copyright is not being infringed. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce and figures for which copyright exists. Although in general an author may quote from other published works, permission from the holder of the copyright should be obtained if substantial extracts are taken or tables, plates, or other illustrations are reproduced. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made. Elsevier has preprinted forms for use by Authors: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com). Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

## Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

## Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover

sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

### **Author Enquiries**

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature [⇒http://www.elsevier.com/trackarticle](http://www.elsevier.com/trackarticle). Other questions or queries will also be dealt with via the website [⇒http://authors.elsevier.com](http://authors.elsevier.com). Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.