



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Rochele de Quadros Rodrigues

**INATIVAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE FÓRMULA
LÁCTEA INFANTIL E LEITE HUMANO TRATADO VIA AQUECIMENTO
ÔHMICO**

Porto Alegre

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Rochele de Quadros Rodrigues

**INATIVAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE FÓRMULA
LÁCTEA INFANTIL E LEITE HUMANO TRATADO VIA AQUECIMENTO
ÔHMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Coorientadora: Profa. Dra. Giovana Domeneghini Mercali

Porto Alegre
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Rochele de Quadros
INATIVAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE
FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL E LEITE HUMANO TRATADO VIA
AQUECIMENTO ÔHMICO / Rochele de Quadros Rodrigues. --
2016.
132 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.
Coorientadora: Giovana Domeneghini Mercali.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Microbiologia de Alimentos . 2. Tecnologia de
Alimentos . 3. Nutrição . I. Tondo, Eduardo Cesar,
orient. II. Mercali, Giovana Domeneghini, coorient.
III. Título.

Dedico este trabalho ao meu esposo, Alisson, e ao meu filho, Rafael. Esta etapa da minha vida não teria sido finalizada, sem o apoio, a compreensão, a confiança e amor de vocês. Obrigada por serem meu refúgio, meu alicerce e por acreditarem em mim!

Agradecimentos

Aos meus orientadores Eduardo Cesar Tondo e Giovana Domeneghini Mercali pela oportunidade, pelo apoio, pela confiança, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo incentivo no final desta caminhada. Gratidão é a palavra.

Á minha querida bolsista de iniciação científica Michelle Dalmás, por todo apoio, companheirismo e carinho. Obrigada pela certeza de sempre poder contar com você.

Ás minhas queridas amigas Pati, Muri, Rita e Tati, pela força, companheirismo e incentivo de sempre. Muito obrigada vocês são muito importantes para mim.

Aos meus sobrinhos Franci, Lucas, Davi, Gabi, Manu, Lívia por todo carinho e paciência pela ausência da tia. E as minhas irmãs Isabel, Débora e Virginia, obrigada por todo apoio e carinho, amo vocês!

Em especial aos meus amores Alisson e Rafael por toda compreensão e paciência pela minha ausência. Meu filho, a mãe sente muito por não ter brincado contigo..., foi difícil, mas agora passou e minha dedicação e atenção será apenas para você! A mãe te ama!

O meu mais sincero OBRIGADA a todos que, de fato, contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

Rochele de Quadros Rodrigues

Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – PPGCTA/UFRGS

TESE DE DOUTORADO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Betina Soldateli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Sopena Casarin
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

RESUMO

A pasteurização é um reconhecido processo térmico, capaz de garantir a qualidade e segurança microbiológica dos alimentos. No entanto, pode resultar em perdas nutricionais, principalmente a degradação de compostos termossensíveis. O aquecimento ôhmico (OH) foi classificado como uma alternativa potencial à pasteurização, já que pode reduzir contagens microbianas em alimentos, minimizando as alterações nutricionais e organolépticas. Um dos objetivos do presente trabalho foi analisar os efeitos térmicos e não-térmicos da tecnologia OH através de um estudo de cinética de inativação microbiana de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em fórmula láctea infantil. A fórmula láctea infantil foi contaminada artificialmente com aproximadamente 10^8 UFC/ml de *S. aureus* ou 10^8 UFC/ml de *E. coli*. O tratamento térmico foi realizado em diferentes temperaturas (57,5, 60, 65 e 62,5 °C), utilizando o OH e o aquecimento convencional (CV). A cinética de inativação foi avaliada através de um modelo matemático desenvolvido por Geeraerd et al. (2000), o qual permitiu a definição da tolerância térmica de *S. aureus* e *E. coli* através dos valores K_{max} e D . A comparação dos tratamentos de OH e CV demonstrou que foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para os valores D e K_{max} na inativação de *S. aureus* em todas as temperaturas avaliadas. Ainda, foi observada uma maior eficiência do OH em relação ao tratamento CV, quando comparados os valores de D e K_{max} . Esses resultados indicam que, além dos efeitos térmicos, efeitos não-térmicos contribuíram para a inativação microbiana. Em relação à *E. coli*, foi encontrada diferença significativa nos valores de D e K_{max} apenas para a temperatura de 57,5 °C – sendo o aquecimento OH o tratamento mais eficaz, com menor valor D . Em temperaturas superiores, não foi possível observar os efeitos não-térmicos, provavelmente porque os efeitos térmicos foram muito pronunciados, impedindo a mensuração dos efeitos da eletricidade. Além disso, o menor valor D obtido, para ambas as espécies bacterianas, foi na temperatura de 65° C no tratamento por OH, demonstrando inativações bacterianas mais rápidas, o que sugere menores perdas nutricionais e mudanças organolépticas. Dessa forma, o tratamento com OH a 65° C foi identificado como a melhor condição para a pasteurização da fórmula láctea. A segunda etapa desse trabalho teve como objetivo analisar os efeitos dos tratamentos OH e CV na estabilidade da vitamina C, lipídeos totais e proteínas totais em fórmula láctea infantil, quando submetida a diferentes temperaturas (57,5, 60, 62,5 e 65 °C). Foram conduzidos ensaios cinéticos para a avaliação da estabilidade da vitamina C. Os resultados indicaram mecanismos semelhantes de degradação da vitamina C em fórmulas submetidas a ambos os tratamentos ($p > 0,05$). O teor de proteínas e lipídeos não foram afetados após os tratamentos por OH e CV, em todas as temperaturas avaliadas. Os resultados indicam que os efeitos não-térmicos do OH não afetam a estabilidade de vitamina C, proteínas e lipídeos. Com isso, na última etapa desse trabalho, foram conduzidos estudos com leite humano para avaliar os resultados obtidos com a fórmula láctea. Os resultados obtidos nesse terceiro estudo confirmaram os resultados microbiológicos obtidos com a fórmula láctea. Com relação à parte nutricional, o teor de vitamina C não foi afetado. Contudo, uma maior degradação de proteínas foi observada no leite humano, possivelmente pelo fato deste conter diversas proteínas bioativas termossensíveis, que não estão presentes na fórmula láctea. Em vista disso, pode-se concluir que a pasteurização por OH é efetiva na inativação microbiológica. Devido aos efeitos elétricos, uma maior taxa de inativação é alcançada, diminuindo o tempo de processamento. Com isso, tem-se uma maior preservação dos compostos nutricionais presente no alimento. Esses efeitos não-térmicos não afetam a degradação de compostos nutricionais, sendo estes degradados basicamente pelos efeitos térmicos associados com a aplicação de calor.

ABSTRACT

Pasteurization is a well-recognized thermal process that guarantees quality and microbiological safety of food. However, it can result in nutritional losses, mainly degradation of thermosensitive compounds. The ohmic heating (OH) was classified as a potential alternative to pasteurization, since it can reduce microbial counts in foods, minimizing nutritional and organoleptic changes. Therefore, one of the objectives of this work was to evaluate the thermal and non-thermal effects associated with the passage of electricity on microbial inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in infant formula. The infant formula was artificially contaminated with approximately 10^8 CFU / ml of *S. aureus* or *E. coli*. The heat treatment was performed at different temperatures (57.5, 60, 65 and 62.5 °C) using OH and conventional technology (CV), both applied with the same temperature profile. The inactivation kinetics were evaluated using a mathematical model developed by Geeraerd et al. (2000). This model allowed the definition of the thermal tolerance of *S. aureus* and *E. coli* through K_{max} and D values. For *S. aureus*, significant differences ($p < 0.05$) were observed between D and K_{max} values of the OH and CV treatment at all temperatures evaluated. These results indicated that in addition to thermal effects, non-thermal effects contributed to microbial inactivation. Regarding *E. coli*, a significant difference was found between D values only at 57.5 °C. OH heating showed to be the most efficient treatment, with a lower D values. At higher temperatures, it was not possible to observe the non-thermal effects, probably because the thermal effects were very pronounced and superior, preventing the measurement of the effects of electricity. In addition, the lowest D value obtained for both bacterial strains was at 65 °C, indicating that at this temperature the inactivation will be faster, which, in turn, results in lower nutritional losses and organoleptic changes. Thus, the use of ohmic heating technology at 65 °C was pointed out as the best option for human milk pasteurization. The second step of this work was to evaluate the effects of OH and CV treatment on the stability of vitamin C, lipids and total proteins in infant formula when submitted to different temperatures (57.5, 60, 62.5 and 65 °C). Kinetic assays were conducted with similar temperature profiles for both heating treatments. The results indicated similar mechanisms of vitamin C degradation in both treatments ($p > 0.05$). Protein and lipid contents were not affected after OH and CV treatments at all temperatures evaluated. These results suggest that the non-thermal effects did not influence the stability of the nutritional compounds. Thus, in the last stage of this work, studies with human milk were conducted to evaluate the results obtained with the milk formula. The results obtained in this third study confirmed the microbiological results obtained with the milk formula. Regarding the nutritional part, vitamin C content was not affected. However, greater degradation of proteins has been observed in human milk, possibly because it contains several bioactive proteins that are thermosensitive, which are not present in the infant formula. Overall, it is possible to conclude that OH pasteurization is effective for microbiological inactivation. Due to electrical effects, a higher inactivation rate is achieved, reducing time of exposure to heat. This non-thermal effects did not influence nutritional compounds degradation, which are mainly degraded by thermal effects associated with application of heat.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 LEITE HUMANO	12
3.1.1 Composição de macronutrientes	16
3.1.1.1 <i>Carboidratos</i>	16
3.1.1.2 <i>Lipídios</i>	16
3.1.1.3 <i>Proteínas</i>	17
3.1.2 Composição de micronutrientes	18
3.1.2.1 <i>Minerais</i>	18
3.1.2.2 <i>Vitaminas</i>	19
3.1.3 Banco de Leite Humano	20
3.1.4 Aspectos Microbiológicos do Leite Humano	21
3.1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.1.4.2 <i>Escherichia coli</i>	23
3.2 TRATAMENTO TÉRMICO.....	24
3.2.1 Pasteurização em banco de leite humano	256
3.2.2 Aquecimento ôhmico	29
3.2.3 Inativação microbiana por aquecimento ôhmico	30
3.2.4 Condutividade elétrica	31
3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	32
4 RESULTADOS	34
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1	35
4.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	56
4.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3	76
4.4 ARTIGO CIENTÍFICO 4.....	97
5 DISCUSSÃO GERAL	118
6 CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

O leite humano é considerado um alimento completo para a nutrição de um recém-nascido, pois sua composição é adequada às necessidades humanas para alimentar e proteger contra diversas doenças infecciosas e alérgicas. Contudo, para garantir o leite humano a recém-nascido cujas mães não podem amamentar, o leite de uma doadora é uma alternativa valiosa para garantir os benefícios deste alimento. Para isso, foram criados em todo o Brasil os Bancos de Leite Humano (BLH), os quais são centros especializados responsáveis por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz, seu processamento, controle de qualidade e distribuição. Neste contexto, é importante que o leite vindo de uma fonte fora do vínculo mãe-filho não apresente micro-organismos em quantidade ou qualidade capazes de representar risco à saúde do receptor. Desta forma, é preciso que se disponha de procedimentos capazes de assegurar a qualidade sanitária do leite humano ordenhado.

A pasteurização através do aquecimento convencional (CV) representa uma alternativa eficaz para a redução da carga microbiana, pois aplica calor ao leite humano com base na redução de um micro-organismo termorresistente e patogênico, chamado, *Coxiella burnetii*. Uma vez observado o binômio temperatura de inativação e tempo de exposição capaz de inativar esse micro-organismo, pode-se assegurar que demais patógenos não esporulados também serão termicamente inativados. Contudo, o processo de pasteurização, comumente utilizado nos BLHs, pode ocasionar perdas à qualidade nutricional do leite, devido à lenta transferência de calor. Tecnologias emergentes têm sido estudadas, a fim de identificar alternativas para a pasteurização convencional, as quais resultem em perda mínima nutricional e assegurem a qualidade microbiológica.

O aquecimento ôhmico (OH) é um avançado método de processamento térmico de alimentos capaz de inativar micro-organismos, permitindo a preservação das propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos. Este método consiste na passagem de corrente elétrica alternada através do alimento, transformando energia elétrica em térmica, promovendo assim um aumento de temperatura em seu interior. A energia elétrica é dissipada em calor, o que resulta em um aquecimento uniforme e rápido, promovendo um produto com alta qualidade nutricional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do aquecimento ôhmico na inativação microbiana e na degradação de compostos nutricionais do leite humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) analisar a inativação de duas bactérias indicadoras, uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e outra Gram-negativa (*Escherichia coli*), adicionadas artificialmente a fórmula láctea infantil, tratada por aquecimento térmico convencional e aquecimento ôhmico;
- b) avaliar o efeito não térmico associado com a passagem de corrente elétrica alternada na inativação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- c) analisar o efeito do tratamento térmico via aquecimento ôhmico e convencional na estabilidade da vitamina C, degradação de lipídeos e proteínas totais em fórmula láctea infantil;
- d) avaliar a inativação microbiológica e degradação de compostos nutricionais no processo de pasteurização do leite humano via aquecimento ôhmico;
- e) descrever os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esse capítulo apresenta, inicialmente, uma revisão sobre a importância nutricional do leite humano, analisando dados sobre a qualidade nutricional e microbiológica do mesmo. Ainda, são apresentados dados sobre a importância do leite humano doado e o papel do Banco de Leite Humano neste contexto. Na sequência, é apresentada uma revisão sobre o tratamento térmico de pasteurização convencional e ôhmico. Por fim, é apresentada uma revisão sobre modelos matemáticos para prever a inativação microbiana no leite humano, utilizados para garantir um tratamento seguro do ponto de vista microbiológico e nutricional.

3.1 LEITE HUMANO

O leite humano é a recomendação ouro para a alimentação de recém-nascidos a termo e prematuros, uma vez que fornece nutrientes adequados às necessidades nutricionais das crianças (BRASIL, 2009b; BRASIL, 2010). O leite humano é um fluido secretado pela mãe com o objetivo de atender às exigências nutricionais, defensivas e fisiológicas dos recém-nascidos, nos primeiros seis meses de vida; é uma solução aquosa composta por carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, água e fatores bioativos que ajudam na digestão e absorção de nutrientes. Esses compostos favorecem o desenvolvimento do sistema imune imaturo do recém-nascido, promovendo proteção contra agentes infecciosos (BRASIL, 2010; FOX, 2008).

Dessa forma, o leite humano é uma das maneiras mais eficientes de atender aos aspectos nutricionais, imunológicos e psicológicos da criança no primeiro ano de vida, pois contém todos os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento da criança. Outro aspecto relevante é que o leite humano apresenta melhor digestibilidade quando comparado com leites de outras espécies, fator este que melhora a biodisponibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, previne o desenvolvimento de doenças gastrintestinais (VITOLLO, 2014; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2012; BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

A literatura aponta que a composição do leite humano é surpreendentemente semelhante para todas as mulheres que amamentam no mundo, independentemente da alimentação materna, salvo apenas nos casos de desnutrição grave materna, quando a mulher pode ter o seu leite afetado na sua qualidade e quantidade (BALLARD; MORROW, 2013; BRASIL, 2009; PRATICÒ et al., 2013). Além disso, o leite de mãe de bebê prematuro também pode apresentar diferença na composição nutricional, apresentando altas

concentrações de proteínas, lipídeos e minerais e menores concentrações de lactose quando comparado com o leite de mães a termo (NARANG, 2006).

Um aspecto importante da lactação é que o leite humano varia conforme o período de lactação, a fim de suprir as demandas do recém-nascido. Essa variação é natural, e suas fases são denominadas colostro, leite de transição e leite maduro (VITOLLO, 2014; BALLARD; MORROW, 2013).

O período do colostro é variável, pois este pode ocorrer entre o 3º e 7º dia, após o nascimento do bebê. O colostro é um leite fluido, espesso e amarelado, devido à sua elevada concentração de carotenos. O volume excretado pela mãe varia de 2 a 20 ml/mamada e fornece aproximadamente 54 kcal/dl, contendo 2,9 g/dl de lipídios, 5,7 g/dl de lactose e 2,3 g/dl de proteína, o que o torna quase três vezes mais rico em proteínas se comparado ao leite maduro. Além disso, contém elevada concentração de imunoglobulinas, lactoferrina, linfócitos e macrófagos, os quais conferem ação protetora ao leite humano (BALLARD; MORROW, 2013). Ainda, apresenta alto teor de minerais, destacando-se o teor de sódio, potássio e cloretos e a elevada concentração de vitaminas lipossolúveis, com destaque para vitamina A e E e carotenoides (VALENTINE; WAGNER 2013; CURY, 2009).

O leite de transição é produzido geralmente entre o 5º e 15º dia de lactação. Nesta fase, o leite sofre modificações na sua concentração, composição e volume, até atingir os valores médios do leite maduro (BRASIL, 2008; BALLARD; MORROW, 2013). A composição e volume do leite maduro é estável e apresenta um volume médio de 700 a 900 ml/dia, nos primeiros seis meses de lactação. No segundo semestre, o volume é de aproximadamente 600 ml/dia, e de apenas 55 ml/dia no segundo ano de lactação, fornecendo em média 70 kcal/dl (CURY, 2009). A Tabela 1 apresenta a composição nutricional de acordo com as três fases de lactação.

Além de a composição nutricional do leite humano variar durante as fases de lactação, há variações nos diferentes estágios da amamentação. O leite do início da mamada, denominado “leite anterior”, apresenta maior teor de água e tem aspecto semelhante ao da água de coco, sendo importante fonte de anticorpos. O leite do meio da mamada tende a ter uma coloração branca opaca devido ao aumento da concentração de caseína. Já o leite do final da mamada, denominado “leite posterior”, apresenta maior conteúdo energético, que promove maior saciedade para a criança. Além disso, o leite posterior apresenta maior teor de β -caroteno, tão importante para o desenvolvimento da criança. Estas variações embasam a

importância do esvaziamento completo da mama durante a amamentação, visando suprir todas as necessidades nutricionais da criança (VITOLLO, 2014; BRASIL, 2009).

Tabela 1: Composição nutricional do leite humano em suas três fases de lactação.

Componentes	Colostro	Leite de transição	Leite maduro
Água (g/dL)	87,2	86,4	87,6
Energia (Kcal/dL)	58	74	71
Sólidos totais (g/dL)	12,8	13,6	12,4
Minerais	0,33	0,24	0,21
Gorduras	1,85-2,9	2,9 – 3,6	3,0-3,8
Lactose	5,3	6,6	7
Proteínas totais	2,7	1,6	1,2
Frações Proteicas (g/dl)			
Caseína	1,2	0,7	0,25
Lactoalbumina	-	0,8	0,3
Minerais			
Sódio (mEq/L)	21	13	7
Potássio (mEq/L)	19	16	14
Cloreto (mEq/L)	26	15	12
cálcio (mq/L)	31-32	29-34	28-33
Calcio (mEq/L)	15,5-16	14-17	14-16,5
Magnésio (mg/dL)	3-4	2,7-4	3-4
Magnésio (mEq/L)	2,5-3,3	2,2-3,3	2,5-3,3
Fósforo (mg/dL)	12-14	15-17	13-15
Sulfato (mg/dL)	22	20	14
Ferro (mg/dL)	0,09	0,04	0,15
Iodo (mg/dL)	0,012	0,002	0,007
Cobre (mg/dL)	0,05	0,05	0,04
Zinco (mg/dL)	0,50-0,96	0,32-0,46	0,25-0,37
Aminoácidos (mg/dL)			
Arginina	75	63	51
Cistina	-	-	29
Histidina	41	38	23
Isoleucina	101	97	86
Leucina	165	151	161
Lisina	117	112	79
Metionina	25	24	23
Fenilalanina	70	62	64
Tirosina	-	-	62
Treonina	85	78	62
Triptofano	32	28	22
Valina	117	105	90
Ácidos graxos (% do total)			
Total de saturados	47,7	-	48,2
Láurico	0,9	-	4,7-5,5
Mirístico	2,8	-	7,9-8,5
Palmítico	24,6	-	23,2-26,7
Esteárico	9,9	-	6,9-8,3
Total de insaturados	52,4	-	51,8
Palmitoléico	1,8	-	3,0-3,4
Oléico	36,0	-	36,5-37,5
Linoléico	7,5	-	10
Linolênico	0,3	-	0,4
Vitaminas			
Vitamina A (µg/dL)	161	88	53
Carotenóides (µg/dL)	137	38	27
Vitamina B1 (µg/dL)	1,9	5,9	16
Vitamina B2 (µg/dL)	30,2	36,9	43
Niacina (µg/dL)	-	-	172
Vitamina B6 (µg/dL)	1,7	3,5	11
Ácido fólico (µg/dL)	-	-	4-5
Vitamina B12 (µg/dL)	0,05	-	0,18
Vitamina C (mg/dL)	7,2	7,1	4,3
Vitamina D (UI/dL)	-	-	0,4-10,0
Vitamina E (mg/dL)	1,5	0,68	0,46
Vitamina K (µg/Dl)	-	-	1,5

Fonte: Adaptado de Calil, Leoni e Ramos, 1991.

3.1.1 Composição de macronutrientes

3.1.1.1 Carboidratos

O principal carboidrato presente no leite humano é a lactose. Seus níveis aumentam levemente durante os primeiros dias pós-parto e permanecem estáveis no leite maduro (7,0 g/dl) (BALLARD; MORROW, 2013; VITOLLO, 2014). A lactose é um dissacarídeo composto por dois monossacarídeos: galactose e glicose. Além da lactose, o leite humano apresenta polissacarídeos que, na presença de peptídeos, formarão o fator bífido. Este é responsável pelo crescimento da flora bacteriana específica, caracterizada pela presença de *Lactobacillus bifidus*, que atua como fator protetor para o lactente (CASTANYIS-MUÑOZ; MARTIN; VAZQUEZ, 2016; MARX et al., 2014; BERGSTRÖM et al., 2014; BODE, 2012).

A alta concentração de lactose no Leite humano é importante para o organismo do recém-nascido, pois seu produto metabólico, a galactose, entra na constituição dos galactolipídeos, integrantes do sistema nervoso central. Além disso, a lactose ainda exerce uma importante ação na biodisponibilidade do cálcio, fósforo e magnésio (VITOLLO, 2014).

3.1.1.2 Lipídios

Os lipídios do leite representam uma importante fonte de energia e atuam no transporte de micronutrientes, como vitaminas lipossolúveis, possuindo propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias e antimicrobianas (BALLARD; MORROW, 2013; CASADO; AFFOLTER; KUSSMANN, 2009). Eles constituem o componente energético mais importante do leite humano (3,5 g/dl), sendo formado por triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos livres, com os triacilgliceróis compondo a maior fração (97% do conteúdo lipídico presente no leite) (VITOLLO, 2014).

Em relação aos ácidos graxos do leite humano, destaca-se a presença dos ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:00), oleico (C 18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3), araquidônico (C20:4) e decosahexanoico (C22:6) (VITOLLO, 2014; BALLARD; MORROW, 2013). Um estudo recente apontou que o perfil de ácidos graxos do leite humano pode variar de acordo com a dieta materna, sendo os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa os mais afetados pela baixa ingestão materna (BALLARD; MORROW, 2013).

Além dessa variação, a composição lipídica do leite humano pode sofrer modificação na sua quantidade em função do período de lactação (colostró e maduro), do período da mamada (diurno ou noturno) e ao longo de cada mamada (leite do início e do fim), conforme

descrito anteriormente (BALLARD; MORROW, 2013; SAARELA; KOKKONEN; KOIVISTO, 2005; VITOLO, 2014).

3.1.1.3 Proteínas

As proteínas do leite humano são importantes fontes de aminoácidos para o recém-nascido, destacando-se a presença da caseína, alfa-lactoalbumina, lactoferrina, imunoglobulina IgA secretora, lisozima e albumina do soro, sendo a lactoalbumina a principal proteína do Leite humano (BALLARD; MORROW, 2013; LONNERDAL, 2004). Além disso, o Leite humano contém grandes concentrações de aminoácidos essenciais de alto valor biológico (cistina e taurina), que são fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso central do lactente, principalmente em prematuros que, por deficiência enzimática, não conseguem sintetizá-los a partir de outros aminoácidos (BALLARD; MORROW, 2013; SILVA et al., 2007).

A quantidade de proteínas no leite humano pode variar de 1,2 a 1,5 g/dl, estando esta variação associada à velocidade de crescimento do lactente. O teor de proteínas pode sofrer rápida redução durante o primeiro mês de lactação, mas após este período o processo ocorre de maneira mais lenta (VITOLO, 2014).

As proteínas presentes no leite humano são representadas por 60% de proteínas do soro (α -lactalbumina, soroalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas e enzimas) e 40% de caseínas (VITOLO, 2014; BALLARD; MORROW, 2013). A baixa concentração de caseínas no leite humano resulta em melhor digestibilidade, o que proporciona melhor desenvolvimento e maturação do intestino. Isso promove maior defesa contra agentes infecciosos, aprimorando, assim, a função imunológica do lactente (CASADO; AFFOLTER; KUSSMANN, 2009; VITOLO, 2014). Outro aspecto relevante é que a composição de aminoácidos no leite humano também varia durante o período de lactação (VITOLO, 2014; LONNERDAL, 2003).

As proteínas presentes no leite humano apresentam diversas funções importantes e essenciais para a saúde de um recém-nascido, estas funções são compreendidas em funções nutritivas e não nutritivas. Entre as funções nutritivas destaca-se o fornecimento de peptídeos, aminoácidos e nitrogênio essenciais para o crescimento do lactente; já as funções não nutritivas apresentam importantes ações no trato gastrointestinal, como enzimas, agentes anti-infecciosos, agentes imunomoduladores e agentes anti-inflamatórios (PEILA et al., 2016; BALLARD et al., 2013). Estas funções são essenciais para um bom desenvolvimento do

recém-nascido; contudo, o processamento térmico, que também é importante para assegurar a segurança microbiológica, reduz estas funções, e, por este motivo, medidas alternativas precisam ser estudadas para minimizar esses efeitos negativos da pasteurização convencional.

3.1.2 Composição de micronutrientes

3.1.2.1 Minerais

Os minerais são classificados em macroelementos (sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo), dos quais o organismo humano tem maior necessidade, e microelementos (cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco) (DONANGELO; TRUGO, 2003; CALIL; FALCÃO, 2003; SANTOS, 2009). Eles são importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde dos tecidos corporais do recém-nascido, e sua concentração no leite humano é muito variada, estando relacionada principalmente com a nutrição materna e o período de lactação (CHOI et al., 2016; VALENTINE; WAGNER 2013; BALLARD; MORROW, 2013). O período de lactação afeta o nível de todos os minerais do leite, com maiores mudanças nos primeiros dias após o parto devido à maior necessidade de micronutrientes para o recém-nascido, uma vez que este período é caracterizado por rápido crescimento corporal, atividade física e combate a infecções (CHOI et al., 2016; DONANGELO; TRUGO, 2003; SANTOS, 2009).

Dentre os minerais essenciais destaca-se o cálcio, relacionado à formação dos ossos do recém-nascido e necessário à integridade das membranas, à coagulação sanguínea e à contração muscular. O leite humano é a principal fonte de cálcio para o recém-nascido nos primeiros meses de vida, e sua absorção está relacionada a vários fatores, entre eles a relação cálcio/fosforo, que se encontra em quantidades e proporções ideais no leite humano (SOARES et al., 2015; RONA et al., 2008).

Outro importante mineral presente no Leite humano é o ferro, que apresenta alta biodisponibilidade, conferindo maior proteção contra infecções e anemia. A concentração de ferro no leite humano é maior nos primeiros dias após o parto, e esta quantidade diminui durante o primeiro mês de lactação e se mantém estável nos períodos seguintes (CHOI et al., 2016; FAO; WHO, 2009; VALENTINE; WAGNER, 2013).

O zinco é outro mineral de alta biodisponibilidade, essencial para os processos metabólicos, celular, neurológico e imunológico, além de desempenhar um papel fundamental

no crescimento e desenvolvimento da criança, sendo responsável pelo controle da expressão gênica (SHI; CHANCE, 2011). Na fase de lactação, pode ocorrer variação na concentração de zinco, sendo que nos primeiros dias após o parto a concentração diminui, sofrendo uma queda gradual durante as seis primeiras semanas e alcançando níveis estáveis no terceiro mês (CHOI et al., 2016; DONANGELO; TRUGO, 2003).

3.1.2.2 Vitaminas

Com exceção das vitaminas D e K, todas as vitaminas estão presentes no leite humano em quantidades suficientes para atender às necessidades do lactente. Porém, o teor de vitamina pode ser afetado por diversos motivos, dos quais o mais importante é o estado nutricional materno (CASTANYS-MUÑOZ; MARTIN; VAZQUEZ, 2016; ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2009; VITOLO, 2014).

As vitaminas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis. Os níveis lácteos das vitaminas hidrossolúveis são largamente influenciados pela dieta materna. Já as os teores das vitaminas lipossolúveis estão associados aos depósitos vitamínicos maternos relacionados aos padrões dietéticos anteriores e habitual da mãe (CALIL; FALCÃO 2003).

As vitaminas lipossolúveis são potentes antioxidantes e atuam na formação de ossos e dentes, na visão, na reprodução e manutenção da estrutura epitelial, e na coagulação sanguínea (VALENTINE; WAGNER, 2013). Elas estão presentes nas frações lipídicas, ligadas à membrana ou a proteínas. Neste grupo de vitaminas estão às vitaminas A e E, disponíveis no leite humano. No entanto, apesar de as vitaminas K e D pertencerem a este grupo, elas precisam ser suplementadas (HOYT; MEDICO; COMMINS, 2015; BALLARD; MORROW, 2013).

A vitamina K, devido à baixa produção pela flora intestinal infantil, é suplementada através de uma dose única no nascimento da criança, para prevenir a doença hemorrágica no recém-nascido. Já o teor de vitamina D do Leite humano pode ser aprimorado através da dieta materna e de exposição ao sol, mas ainda assim os níveis médios serão insuficientes para atender às recomendações diárias da criança, necessitando suplementação (HOYT; MEDICO; COMMINS, 2015; BALLARD; MORROW, 2013).

As vitaminas hidrossolúveis do leite humano são compostas por grupos diversificados de compostos orgânicos que atuam no metabolismo intermediário. Dentro deste grupo, tem-se a tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, pantoteno (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6), ácido fólico, biotina e vitamina B12 (cobalamina) e o ácido

ascórbico (vitamina C) (DONANGELO; TRUGO, 2003). Dentre as vitaminas presentes no leite humano, a vitamina C é considerado um dos principais antioxidantes para o recém-nascido, que, frequentemente, está sujeito ao estresse oxidativo (SOARES et al., 2015; GREER, 2000). Ainda, a vitamina C facilita a absorção do ferro, embora não haja recomendações específicas para a sua administração com este propósito (RAO; GEORGIEFF, 2009). Contudo, os processos de tratamento do leite humano reduzem o teor desta vitamina, uma vez que ela é relativamente instável, apresentando sensibilidade a luz, oxigênio e temperatura (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007). Essa elevada sensibilidade da vitamina C fez dela um bom indicador do grau de tratamento térmico, tendo sido proposta como um biomarcador de estresse oxidativo em amostras biológicas (ROMEU-NADAL et al., 2008; HOUSKA et al., 2006). Dentre os processos, o congelamento diminui cerca de um terço da vitamina C, e a pasteurização diminui aproximadamente 36% da mesma. Esta redução no teor da vitamina C é consistente com outros estudos que apresentaram reduções semelhantes no teor de vitamina C após o tratamento térmico (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; ROMEU-NADAL et al., 2008; PUIGMARTI et al., 2011). Por esses motivos, é sugerida a suplementação de 20 mg/dia de vitamina C para compensar a perda no leite proveniente de bancos de leite humano recém-nascidos em pré-termo (SOARES et al., 2015).

3.1.3 Banco de leite humano

Diversos estudos relatam que o leite humano doado é fundamental para os recém-nascidos prematuros, de baixo peso ou hospitalizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal, que não têm acesso ao leite da mãe. O consumo do leite humano doado melhora as taxas de sobrevivência, diminuindo assim sua permanência hospitalar (PERRIN et al., 2016; NEVES et al., 2011; PERRIN; FOGLEMAN; ALLEN, 2013; HEIMAN; SCHANLER, 2006; BRASIL, 2008). Tendo em vista os benefícios do Leite humano para o recém-nascido, foram criados em todo o mundo os Bancos de Leite Humano (BLHs), que visam a garantir a qualidade do leite humano destinado aos recém-nascidos.

No Brasil, a política de saúde pública voltada ao incentivo à amamentação tem, ao longo das últimas décadas, fortalecido a importância dos BLHs. Um BLH é um centro especializado e obrigatoriamente ligado a um hospital materno e/ou infantil onde se recebe, pasteuriza e distribui o leite para os bebês internados em unidades neonatais (BRASIL, 2008). O Brasil tem hoje a maior rede de BLHs do mundo: são 29 centros de referência nacional que

beneficiam mais de 160 mil crianças, tendo sido coletados mais de 140 mil litros de leite humano no ano de 2015 (BRASIL, 2015).

O BLH tem como objetivo garantir a captação de um número adequado de doadoras, de forma a atender à demanda dos receptores das unidades assistidas. São consideradas doadoras as nutrizes saudáveis que apresentam secreção láctea superior às exigências de seu filho e que se dispõem a doar o excedente por livre e espontânea vontade. São também doadoras as nutrizes que estão temporariamente impedidas de amamentar seus filhos diretamente no peito por razões ligadas à saúde deles, como os que estão internados em unidades neonatais ou outras unidades hospitalares, e que ordenham leite para estimular a produção ou para consumo exclusivo de seus filhos (BHARADVA et al., 2014; LEAF et al., 2009; BRASIL, 2008).

Para se habilitar como doadora é necessária uma triagem por profissional capacitado, mediante o preenchimento de um formulário de cadastro contendo dados pessoais, verificação de doenças e intercorrências, exames bioquímicos e dados antropométricos (BRASIL, 2008). Para realizar a ordenha do leite, a doadora/nutriz deverá ser conduzida a um ambiente que não traga risco à qualidade microbiológica do leite. O rigor higiênico-sanitário deve garantir a manutenção das características imunobiológicas e nutricionais do leite (BHARADVA et al., 2014; BRASIL, 2008).

Medidas e programas de incentivo à doação de leite humano são necessários para garantir que a quantidade de leite doado supra às demandas existentes (HEIMAN; SCHANLER, 2006; BRASIL, 2008). Porém, apesar de todo o incentivo à doação de leite humano em todo o mundo, a escassez é muito elevada, não suprimindo a necessidade dos BHL (PERRIN et al., 2016; PERRIN; FOGLEMAN; ALLEN, 2013; NEVES et al., 2011; HEIMAN; SCHANLER, 2006).

3.1.4 Aspectos microbiológicos do leite humano

Na fonte, o leite humano é livre de contaminantes e deve permanecer desta forma até o consumo do recém-nascido. No entanto, práticas higiênico-sanitárias deficientes no momento da coleta (ordenha) podem contaminá-lo com micro-organismos patogênicos advindos das mãos da doadora ou do ambiente que a circunda (LANARI et al., 2012; ACETI; CORVAGLIA; FALDELLA, 2014; WINDYGA et al., 2015).

A ordenha pode ser feita de forma manual ou mecânica. A ordenha manual consiste na retirada do leite pela doadora que manipula a mama (auto-ordenha), pressionando-a cuidadosamente para a retirada do leite; contudo, este processo também pode ser feito por um profissional de saúde ou por outra pessoa de sua escolha (BRASIL, 2008; OLIVEIRA et al., 2006). Essa é uma forma eficiente, econômica, menos traumática e menos dolorosa, sendo referida como um método que reduz a contaminação do leite. Já a ordenha mecânica consiste na retirada do leite através do uso de bombas elétricas ou manuais; entretanto, este processo pode gerar desconforto na mama e tem representado um elevado risco de contaminação, por ser de difícil higienização (BRASIL 2008; OLIVEIRA et al., 2006).

Sob este aspecto, a qualidade microbiológica do leite humano ordenhado e distribuído por BLHs é um assunto de interesse para a saúde pública, pois os bebês que consumirão este produto têm baixa resistência a infecções neonatais, e o consumo de leite humano contaminado pode causar doenças. Portanto, o problema mais importante dos BLHs é o controle bacteriológico do leite doado (WINDYGA et al., 2015; ACETI; CORVAGLIA; FALDELLA, 2014; KAYIRAN et al., 2014; KEIM et al., 2013; SILVEIRA et al., 2012). Este controle depende da eficiência da pasteurização, que pode ser comprometida por uma carga microbiana inicial elevada, sendo as bactérias do grupo de coliformes e *S. aureus* as principais responsáveis pela contaminação secundária do leite.

No leite humano também estão presentes diversos micro-organismos de defesa, destacando-se o *Staphylococcus epidermidis*, que é uma das bactérias predominantes e age como agente antimicrobiano, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ALTUNTAS, 2015; COGEN et al., 2010; MARTÍN et al., 2012; HEIKKILA; SARIS, 2003).

3.1.4.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tem recebido destaque na contaminação do leite, uma vez que faz parte da microbiota humana. Sua presença no leite humano pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele, mamilos, mãos e fossas nasais da doadora, ou ainda por condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados na ordenha e manipulação do leite (HO; BOOST; O'DONOGHUE, 2014; CIVARDI et al., 2013; BRASIL, 2008; OLIVEIRA et al., 2006). Estima-se que de 20% a 60% dos humanos possam ser portadores assintomáticos dessa bactéria (HO; BOOST; O'DONOGHUE, 2014),

acarretando risco de contaminação, principalmente se a mama da mãe estiver com alguma lesão ou fissura (CIVARDI et al., 2013).

O *S. aureus* pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas e possui formato esférico, agrupado como em cachos de uva (HO; BOOST; O'DONOGHUE, 2014; FORSYTHE, 2013). O *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos associados à intoxicação alimentar, causada pela ingestão da enterotoxina produzida no alimento por algumas cepas deste micro-organismo (FORSYTHE, 2013; FETSCH et al., 2014). A maior preocupação quanto à sua presença é atribuída a propriedade de termoresistência das enterotoxinas, as quais resistem à pasteurização (KAYIRAN et al., 2014; KEIM et al., 2013).

Os sintomas de intoxicação por *S. aureus* aparecem com rapidez, de 1 a 6 horas, após a ingestão, e incluem náuseas, vômitos e cólicas abdominais geralmente sem diarreia. Essas manifestações podem variar de intensidade, dependendo da sensibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento ingerido, da quantidade de toxina ingerida e da saúde geral do indivíduo. Nos casos mais graves, podem ocorrer dores de cabeça, câibras musculares e mudanças rápidas na pressão arterial, bem como na taxa de pulsação (FORSYTHE, 2013; TONDO; BARTZ, 2014).

Ao longo dos anos, foi publicada uma variedade de estudos que apontaram que o *S. aureus* está relacionado com as principais infecções hospitalares e tem possível envolvimento com a síndrome da morte súbita infantil (SIDS), que é a causa predominante de morte entre 1 semana e 1 ano de vida (CHARLIER et al., 2009; HEIKKILÄ; SARIS, 2003; ZORGANI et al., 1999; FARR et al., 2001; BLACKWELL; WEIR, 1999). Ainda, o *S. aureus* é também o principal agente causador de mastite infecciosa, que afeta 20-30% das mulheres lactantes, o que pode acarretar em contaminação do leite ordenhado (JONSSON; PULKKINEN 1994; SEMBA et al., 1999). Windyga et al. (2015) destacam que o *S. aureus* é um importante marcador de qualidade da pasteurização do leite humano, uma vez que esta bactéria apresenta alta resistência a processos físicos e oferece sérios riscos à saúde dos recém-nascidos.

3.1.4.2 *Escherichia coli*

No Brasil, de acordo com a legislação, o leite humano não deve apresentar contaminação por coliformes totais, o que o tornaria impróprio para o consumo (RDC-ANVISA, 2006). Serafini et al. (2003) destacam a importância da determinação do grupo coliforme no controle da qualidade microbiológica do leite humano, pois sua presença pode indicar contaminação, mesmo que indireta, de origem fecal. Dentre o grupo de coliformes,

destaca-se a preocupação com a *Escherichia coli* (*E. coli*), que é considerada um indicador de contaminação fecal. Trata-se de um micro-organismo em forma de bastonete, Gram-negativo, que pode estar isolado ou em pares, e anaeróbio facultativo (LAMBRESCHTS et al., 2014; MADAPPA, 2014).

A *E. coli* é a principal espécie do grupo dos coliformes fecais. Esta é uma bactéria não formadora de esporos, encontrada normalmente nos intestinos dos animais e do homem. Ela representa 80% da microbiota intestinal aeróbia, sendo eliminado nas fezes, o que propicia a contaminação do solo e das águas (FORSYTHE, 2013; LAMBRESCHTS et al., 2014).

O estudo de Nakamura et al. (2016) investigou um surto causado pela contaminação do leite humano em uma UTI neonatal no Japão. Neste surto, o agente causador identificado foi a *E. coli*, que apresentou resistência a diversos antibióticos, representando um grave problema, pois diversos recém-nascidos foram contaminados e um óbito foi constatado. Os pesquisadores indicaram que a contaminação ocorreu em um leite doado que não sofreu o processo de pasteurização, o que resultou na contaminação por este agente patogênico. Os mesmos autores ressaltaram que embora a pasteurização seja recomendada mundialmente como tratamento térmico de leites humanos, ela não era obrigatória no local que ocorreu a contaminação, porém, após este incidente, a pasteurização se tornou obrigatória em todos os bancos de leite daquela região do surto (NAKAMURA et al., 2016; MENON; WILLIAMS, 2013).

3.2 TRATAMENTO TÉRMICO

Tratamentos térmicos são métodos desenvolvidos para a preservação e prolongamento da vida útil dos alimentos. Estes métodos consistem na aplicação de calor no alimento por um período de tempo e a uma temperatura que sejam capazes de destruir micro-organismos patogênicos e deteriorantes, estando entre as principais tecnologias de conservação de alimentos (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

A eficácia do processamento térmico é dependente de diversos fatores, sendo necessário ter ampla compreensão do método de processamento, comportamento do aquecimento no alimento e impacto sobre os micro-organismos alvo. Os fatores determinantes durante o processamento térmico de um alimento são: características físicas do alimento, incluindo propriedades térmicas, forma e tamanho; resistência térmica dos micro-organismos

alvo; pH e atividade de água; teor de sal do alimento (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; FELLOWS, P. J. 2009; FORSYTHE, 2013; TONDO; BARTZ, 2014).

Um processo térmico é estabelecido com base na resistência do micro-organismo ao calor e na taxa de aquecimento do alimento. Diversos estudos utilizam modelos matemáticos para avaliar experimentalmente a resistência térmica dos micro-organismos em determinados alimentos, servindo como base para a compreensão do impacto do pH, temperatura, tempo, atividade de água, teor de sal e características físicas do alimento sobre os agentes patogênicos (FELLOWS, P. J. 2009; FORSYTHE, 2013; TONDO; BARTZ, 2014).

A cinética de inativação térmica de micro-organismos é obtida através de uma curva de sobrevivência, que é demonstrada em um gráfico logarítmico do número de micro-organismos sobreviventes em uma dada temperatura em relação ao tempo de exposição ao aquecimento, pressupondo que a destruição microbiana geralmente segue uma cinética de primeira ordem (Equação 1).

$$N = N_0 \exp(-k \cdot t) \quad (1)$$

onde, o t é o tempo (min), k é a constante de velocidade de reação (min^{-1}), N_0 e N são os números de células viáveis no tempo zero e final. A constante de velocidade de reação (k) é obtida da curva de sobrevivência em função do tempo.

A partir das curvas de sobrevivência e de resistência térmica, obtém-se o valor D . O valor D é o tempo de redução decimal de uma população bacteriana exposta a uma temperatura constante (ou seja, é o tempo de aquecimento que resulta em 90% ou 1 log de redução da população microbiana mantida em uma temperatura constante), sendo calculado a partir da seguinte fórmula matemática (Equação 2):

$$D = t_1 - t_0 / \log(N_0) - \log(N_1) \quad (2)$$

onde N_0 e N_1 representam o número de sobreviventes após o aquecimento nos tempos t_0 e t_1 , respectivamente.

Dentre os tratamentos térmicos, a pasteurização é um método que consiste na redução do número de bactérias até níveis seguros, geralmente objetivando reduções de contagens da

ordem de 5 unidades logarítmicas. Esse processo não destrói todas as formas bacterianas, uma vez que bactérias esporuladas continuam viáveis. Por este motivo, os alimentos pasteurizados, se não consumidos imediatamente, devem ser mantidos sob refrigeração (abaixo de 5°C) (TONDO; BARTZ, 2014).

3.2.1 Pasteurização em banco de leite humano

O leite humano destinado ao consumo de recém-nascidos, não deve apresentar micro-organismos em quantidade ou qualidade capazes de representar agravos à saúde. Para isto, a pasteurização é um tratamento térmico obrigatório que tem como objetivo assegurar a qualidade sanitária do leite humano doado (NAKAMURA et al., 2016; BHARADVA et al., 2014; BRASIL, 2008).

Nos BHLs, utiliza-se a pasteurização LTLT (*low-temperature, long-time*, ou seja, temperatura baixa, tempo longo). O leite é aquecido a uma temperatura de 62,5 °C, por 30 minutos (tempo de letalidade térmica), contados após o tempo de pré-aquecimento (NAKAMURA et al., 2016; BHARADVA et al., 2014). O tempo de pré-aquecimento é o tempo necessário para que o leite atinja a temperatura de 62,5 °C, e esta temperatura deve ser monitorada a cada 5 minutos, com registro em planilha específica (BRASIL, 2008). Para a pasteurização do leite ordenhado, o ambiente deve ser limpo e desinfetado imediatamente antes do início de cada turno, a fim de evitar a contaminação do leite humano.

A Figura 1 apresenta as etapas, desde higiene pessoal até a distribuição do leite humano nos BHLs. Os detalhamentos da técnica da curva de penetração de calor, do método de pasteurização, do monitoramento do processo, utilizado pelos BHLs no Brasil segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) são detalhados a seguir:

- Curva de penetração de calor: para cada tipo de frasco e volume de leite é elaborado uma curva de penetração de calor. A curva de penetração é calculada de acordo com o tempo de pré-aquecimento, que é dado pelo tempo necessário para elevar a temperatura do leite de aproximadamente 5 °C para 62,5 °C. A temperatura da água para a elevação e manutenção da temperatura do leite em 62,5 °C é sempre superior a este valor – média de 2 a 3 °C a mais. A curva de penetração de calor deve ser refeita a cada 30 ciclos e estar registrada em planilha de controle.

- Método de pasteurização: 1) Regular o banho-maria à temperatura de operação (suficiente para atingir 62,5 °C no ponto frio) e esperar que o mesmo se estabilize. 2) Carregar o banho-

maria com os frascos contendo o leite a ser pasteurizado. 3) O nível de leite no interior da embalagem deve ficar abaixo do nível da água do banho-maria. 4) Em função do desprendimento de ar dissolvido no leite humano durante o processo de aquecimento, recomenda-se que o rosqueamento das tampas esteja com folga de $\frac{1}{4}$ de volta (embalagem semifechada). 5) Iniciar a marcação do tempo de letalidade térmica (30 minutos) a partir do momento em que a temperatura do leite humano atingir a marca de 62,5 °C (tempo de pré-aquecimento). 6) Caso o banho-maria não disponha de agitador automático, o funcionário responsável pela pasteurização deverá agitar manualmente cada frasco de cinco em cinco minutos, sem retirá-lo do banho-maria. 7) Transcorridos os 30 minutos relativos à letalidade térmica, ocorre o resfriamento dos frascos até que o leite humano atinja uma temperatura igual ou inferior a 5 °C. 8) O resfriamento dos frascos é obtido com o uso de resfriadores automáticos ou pela imersão dos recipientes em um banho contendo água e gelo.

- **Monitoramento do processo:** a pasteurização do leite humano deve ser monitorada a cada cinco minutos, com registro da temperatura em planilha específica no momento da averiguação utilizando termômetro de mercúrio.

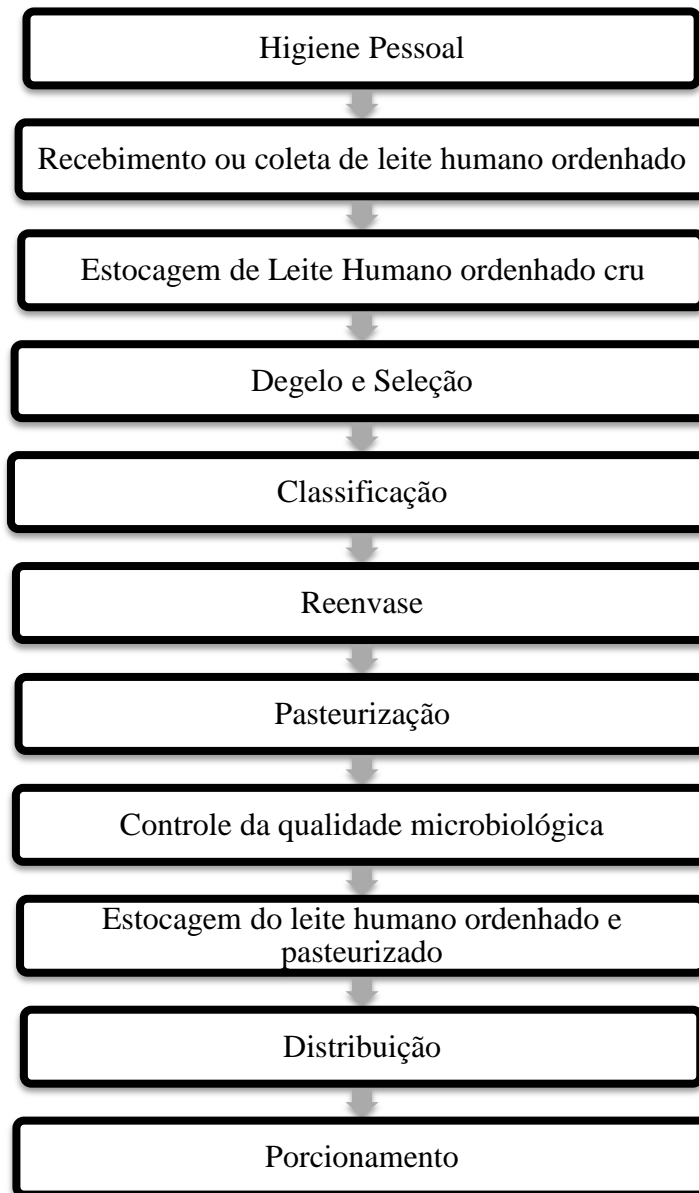


Figura 1: Fluxograma de trabalho do Banco de Leite Humano.

Embora elimine patógenos, a pasteurização LTLT resulta em significativas perdas à qualidade nutricional do produto, devido à condução lenta da transferência de calor (MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; MORO; ARSLANOGLU, 2012). Além disso, a pasteurização reduz significativamente as concentrações de bactérias benéficas que constituem a microbiota do leite humano. Além de afetar a quantidade e a atividade dos principais componentes bioativos do leite humano (IgA, lactoferrina e lisozima), ela ocasiona diminuição da atividade da lipase e diminuição na concentração de alguns hormônios, tais como adiponectina e insulina. Estes efeitos negativos da pasteurização são alvos de inúmeras pesquisas (O'CONNOR; EWASCHUK; UNGER, 2015; BRAGA; PALHARES, 2007;

MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; MORO; ARSLANOGLU, 2012; COSCIA et al., 2015).

Dados preliminares mostram que a pasteurização HTST (*high-temperature, short-time*, alta temperatura e tempo curto), utilizando 72-75 °C durante 15-16 segundos, preserva melhor a atividade biológica e algumas proteínas do leite. Outros métodos de pasteurização têm sido amplamente avaliados para a pasteurização do leite humano, tais como irradiação ultravioleta (UV), processamento de alta pressão (HPP), combinação de calor e ultrassom, e aquecimento ôhmico. Estas tecnologias estão sob investigação por apresentarem menor perda de propriedades nutricionais e imunológicas, além do efeito de inativação de bactérias patogênicas (O'CONNOR; EWASCHUK; UNGER, 2015; BRAGA; PALHARES, 2007; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; MORO; ARSLANOGLU, 2012; COSCIA et al., 2015).

Apesar das limitações, a pasteurização convencional é necessária, constituindo o método-ouro utilizado pelos BHLs no mundo inteiro. Ainda são necessários mais estudos sobre os métodos de pasteurização emergentes antes de implantá-los nos BHLs. Deve-se pesquisar ativamente métodos alternativos de pasteurização que sejam capazes de reter as propriedades nutricionais do leite humano com maior nível de segurança microbiológica (O'CONNOR; EWASCHUK; UNGER, 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; MORO; ARSLANOGLU, 2012; COSCIA et al., 2015).

3.2.2 Aquecimento ôhmico

Diversas são as tecnologias alternativas para a pasteurização do leite humano que visam reduzir a perda nutricional, eliminando bactérias patogênicas (BRAGA; PALHARES, 2007; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; MORO; ARSLANOGLU, 2012; COSCIA et al., 2015; CHRISTEN et al., 2013). Dentre essas tecnologias, destaca-se o OH (MESIAS et al., 2016; MORO; ARSLANOGLU, 2012; ICIER, 2012).

O OH é uma tecnologia sob investigação para o tratamento térmico do leite humano, sendo um avançado método de processamento térmico que consiste na passagem de corrente elétrica alternada através de um alimento, transformando energia elétrica em térmica. A passagem da corrente alternada cria movimentos oscilatórios de íons, o que gera a dissipação de calor e a geração interna de energia (CHEN; ABDELRAHIM; BECKERICH, 2010; KNIRSCH et al., 2010).

Uma importante vantagem da tecnologia OH é a sua capacidade de promover um aumento rápido e uniforme de temperatura no interior do alimento, resultando em menor dano térmico para o alimento em comparação aos métodos tradicionais de aquecimento. Outra importante vantagem desta tecnologia está relacionada à sustentabilidade, uma vez que este processo apresenta uma eficiência energética superior a 95% e não utiliza vapor ou água aquecida, contribuindo para a preservação do ambiente (MESIAS et al., 2016; MORO; ARSLANOGLU, 2012; ICIER, 2012; CHEN; ABDELRAHIM; BECKERICH, 2010; KNIRSCH et al., 2010).

A aplicação do OH ocorre basicamente em alimentos líquidos, sendo particularmente interessante para produtos viscosos e que contêm partículas, tais como sucos de frutas, leite, soro de leite, ovos, sopas, ensopados, frutas em calda e leite de soja. A aplicação dessa tecnologia na indústria de alimentos é muito ampla, incluindo processos de branqueamento, pasteurização, esterilização, evaporação e fermentação (MESIAS et al., 2016; MORO; ARSLANOGLU, 2012; ZHU et al., 2010; SARANG; SASTRY; KNIPE, 2008). Ainda há diversas outras vantagens desta tecnologia em relação aos métodos convencionais de pasteurização, destacando-se a manutenção da cor, preservação do valor nutricional e curto tempo de processamento (MORO; ARSLANOGLU, 2012; ICIER, 2012).

Além disso, o OH tem se mostrado eficiente para o controle microbiano, uma vez que estudos demonstraram a existência de efeitos não-térmicos, além dos térmicos, na inativação de micro-organismos, associados a presença de um campo elétrico alternante (NASCIMENTO; REIS; REBELLO, 2014; KNIRSCH et al., 2010; PALANIAPPAN; SASTRY, 1991; POTHAKAMURY et al., 1995; ZHANG et al., 1995; PEREIRA et al., 2007; AN; KING, 2007).

3.2.3 Inativação microbiana por aquecimento ôhmico

No OH, o principal mecanismo de inativação microbiana é de natureza térmica. Contudo, diversos estudos apontam que o OH promove danos celulares não-térmicos, devido à presença do campo elétrico alternado (KNIRSCH et al., 2010; SUN et al., 2008; PEREIRA et al., 2007; AN; KING, 2007). Este efeito adicional se dá basicamente pela baixa frequência elétrica do campo que é geralmente aplicado (50 e 60 Hz), o que permite que as paredes celulares fiquem carregadas eletricamente e poros sejam formados (AN; KING, 2007). Este efeito é denominado eletroporação celular e consiste na formação de poros na membrana

celular, ocasionando, como consequência, um aumento de permeabilidade da membrana e difusão do material interno. Esta difusão ocorre por eletro-osmose, contribuindo assim para a morte celular (AN; KING, 2007; SENSOY; SASTRY, 2004).

Kyu e Kang (2013) avaliaram o efeito do OH e CV em suco de maçã e constataram que o campo elétrico promoveu a inativação microbiológica, devido ao aumento da permeabilidade da membrana, causando a morte celular pelo efeito da eletroporação. Contudo, para mensurar os efeitos não-térmicos, é necessário assegurar a mesma história de temperaturas, a fim de descartar a influência do efeito térmico na inativação (AN; KING, 2007; IMAI et al., 2007; WANG et al., 2013; SENSOY; SASTRY, 2004).

3.2.4 Condutividade elétrica

Muitos fatores podem afetar a taxa de aquecimento em um sistema de aquecimento ôhmico, tais como: propriedades elétricas, calor específico, tipo de partículas, tamanho, concentração, forma e orientação do campo elétrico, e a temperatura do processo (ZHU et al., 2010; KNIRSCHA et al., 2010). Em geral, a condutividade elétrica é o fator mais importante para controlar a taxa de aquecimento do alimento. Essa variável é determinada a partir da resistência da amostra e da geometria da célula, como demonstrado na Equação 3:

$$\sigma = 1 \frac{L \cdot I}{r_e \cdot A \cdot TE} \quad (3)$$

onde r_e é a resistividade do material ($\Omega \text{ m}$), I é a intensidade da corrente elétrica (A), TE é a tensão elétrica através da amostra (V), L é o espaço entre os eletrodos ou comprimento da amostra (m), e A é a área da seção transversal da amostra (m^2).

A condutividade elétrica depende da concentração de íons no alimento, da dissociação iônica, da estrutura celular, da temperatura e da presença de componentes não condutores, tais como lipídeos, açúcares e gases. A condutividade de alimentos líquidos e fluidos é, geralmente, maior do que a condutividade de alimentos sólidos (KNIRSCHA et al., 2010). Com base nisso, pode-se considerar que o leite humano apresenta excelente condutividade elétrica, o que favorece a aplicação desta tecnologia.

3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva permite prever a resposta da multiplicação e inativação do micro-organismo frente a variações de fatores, como temperatura, condições de armazenamento, umidade e pH. Ela é considerada um elemento importante para o estudo da microbiologia com vistas à qualidade e à segurança dos alimentos, permitindo assim analisar os riscos, avaliar a vida útil do alimento, e desenvolver novos produtos e processos (OLIVEIRA et al., 2006). Ainda, esta é também uma ferramenta importante para a avaliação quantitativa dos riscos microbianos, pois permite entender o comportamento dos micro-organismos em função de vários fatores na cadeia alimentar (McMEEKIN et al., 2008).

Através da microbiologia preditiva, a inativação, multiplicação e sobrevivência dos micro-organismos em dada condição ambiental, como temperatura ou pressão, pode ser descrito por modelos matemáticos e da predição dos parâmetros cinéticos (HABERBECK, 2011). Estes modelos matemáticos preditivos são classificados em modelos primários e modelos secundários (WHITING; BUCHANAN, 1993). Os modelos primários correspondem a modelos matemáticos que descrevem a multiplicação ou respostas microbianas em função do tempo sob determinadas condições ambientais. Este modelo utiliza os seguintes parâmetros: número inicial de células, velocidade de multiplicação, fase de adaptação (*lag*) e aumento logarítmico da população. Já os modelos secundários descrevem como os parâmetros obtidos a partir dos modelos primários variam com as mudanças ambientais (McMEEKIN et al., 2008; KAJAK; KRAJEWSKA, 2006).

Existem *softwares* que combinam o uso de modelos primários e secundários. Esses programas podem calcular respostas microbianas em diferentes condições, comparar o efeito destas variações ou ainda comparar o comportamento de vários micro-organismos. Esses programas facilitam a modelagem das curvas de multiplicação e inativação microbiana, sob diferentes condições (WHITING, 1995; McDONALD; SUN, 1999; McMEEKIN et al., 2008; KAJAK; KRAJEWSKA, 2006). Dentre esses *softwares*, os seguintes programas se destacam por serem de livre acesso e de fácil utilização: *Pathogen Modeling Program*, *ComBase Predictive Models* e *GInaFit* (ROSS; McMEEKIN, 2002; GEERAERD, 2000).

O *GInaFit* é um programa bastante utilizado para avaliar a inativação de micro-organismos, tendo como objetivo desenvolver modelos de predição, através de ferramentas avançadas de regressão não linear (GEERAERD, 2000). Esta ferramenta, útil para testar diferentes tipos de modelos de inativação microbiana, é gratuita e funciona como

complemento do Microsoft® Excel. Ela serve para testar nove diferentes tipos de modelos de inativação microbiana: Regressão Log-Linear; Modelo Log-Linear + Ombro; Modelo Log-Linear + Cauda; Modelo Log-Linear + Ombro + Cauda; Modelo de Weibull; Modelo de Weibull corrigindo parâmetro p; Modelo de Weibull + Cauda; Modelo Bifásico; Modelo Bifásico + Ombro.

A qualidade do modelo gerado pelo *software* GInaFit é avaliada através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2 , Equação 4), o qual é uma medida geral da predição calculada pelo modelo desenvolvido, e através da raiz do erro quadrático médio (RMSE, Equação 5), utilizada para oferecer uma medida padrão da adequação de um modelo aos dados utilizados para produzi-lo (WANG et al., 2013).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{\tilde{N}} (\gamma_i - \hat{\gamma}_i)}{\sum_{i=1}^{\tilde{N}} \gamma_i^2} \quad (4)$$

onde, \tilde{N} é o número de pontos no conjunto de dados; γ_i é o valor observado; $\hat{\gamma}_i$ é o valor predito.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\mu - \hat{\mu})^2}{n}} \quad (5)$$

onde, n é o número de observações; μ é o valor observado; $\hat{\mu}$ é o valor predito.

Esses modelos matemáticos simulam situações determinadas pela pesquisa desenvolvida pelo usuário. Dessa forma, essas simulações podem ser utilizadas para comparação dos resultados entre esses estudos. Sua estrutura compreende um total de nove diferentes modelos matemáticos, que são escolhidos pelo usuário de acordo com os dados experimentais da pesquisa. O presente estudo utilizou modelos matemáticos para prever a inativação microbiana, conforme é descrito nos artigos a seguir.

4 RESULTADOS

Este capítulo aborda os materiais, métodos, resultados e discussões obtidos na presente Tese. Tais informações são apresentadas na forma de artigos científicos submetidos à publicação em periódicos especializados, com exceção do artigo 3, que será submetido após o aceite dos artigos 1 e 2. Cada subtítulo desse capítulo corresponde a um destes artigos.

Na seção 4.1 é apresentado o estudo que investigou os efeitos não-térmicos da eletricidade na cinética de inativação microbiana de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* durante o aquecimento ôhmico (OH) em fórmula láctea infantil. Já na seção 4.2 é apresentado o estudo sobre os efeitos do OH e aquecimento convencional no teor de vitamina C, lipídeos e proteínas totais em fórmula láctea infantil. Na seção 4.3 é apresentado o estudo que avaliou o impacto do OH na inativação microbiana e degradação de compostos nutricionais no leite humano. Por fim, na seção 4.4 é apresentada uma revisão de literatura sobre os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano.

A parte experimental foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Química e nos Laboratórios de Química de Alimentos e Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA/UFRGS.

4.1 ARTIGO 1

Evaluation of non-thermal effects of electricity on inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during ohmic heating of infant formula

Artigo científico aceito à revista *Journal of Food Safety*

Abstract

This study investigated the non-thermal effects of electricity on microbial inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during ohmic heating (OH) of infant formula. For this, temperature profiles during OH and conventional heating (CV) processes were matched, and the kinetic parameters were compared at temperatures ranging from 57.5 to 65.0 °C. The inactivation kinetics were analyzed using the Geeraerd et al. (2000) inactivation model, which allowed the definition of the thermal tolerance from k_{max} and D -values. For *S. aureus*, significant differences ($p < 0.05$) between D and k_{max} values were observed when OH and CV treatment were compared in all temperatures. The results demonstrated a higher efficiency of OH over CV, indicating that microbial inactivation may have been caused by electroporation in addition to thermal effects. For *E. coli*, a significant difference ($p < 0.05$) between D -values was observed only at 57.5 °C. Moreover, D -values for both heating technologies were lower at 65 °C, which suggests a faster inactivation and, therefore, a lower degradation of nutritional compounds. Taking into consideration both microbial species, the best treatment for human milk pasteurization is OH at 65 °C.

Practical applications

The low-temperature long-time (LTLT) pasteurization (62.5 °C for 30 minutes) is the currently recommended method for heat treatment of human milk in Human Milk Banks (HMB) because it is simple to be applied and guarantees microbiological safety. However, it can promote significant losses of nutritional and organoleptic quality due to the slow conduction of heat transfer. Therefore, alternative technologies for human milk pasteurization need to be explored. OH is a faster heating technology, appropriate for heat-sensitive products. Although already established in the food industry, the OH advantages have not been considered for human milk pasteurization. The objective is to provide an alternative technology to the HMB that ensure safety and lower-impact on nutritional compounds. This study contributes for the correct understanding of the non-thermal effects associated with

passage of electricity through foodstuff on microorganism's inactivation. Moreover, it has significant economic consequences to industry, supporting modeling and optimization to produce safe products with higher nutritional and sensory characteristics.

Keywords: moderate electric field; electroporation; electricity; microbial inactivation.

4.1.1 Introduction

Microbiological quality of human milk distributed in Human Milk Banks (HMB) is a matter of interest to public health, especially because newborns have low resistance to neonatal infections (Hakansson, 2015; Serafini et al., 2003). The donated milk is often contaminated with pathogenic microorganisms, such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, which are related to neonatal sepsis, meningitis, necrotizing enterocolitis and diarrheal diseases (Charlier et al., 2009; Zaidi et al., 2009); wherefore, studies about microbiological contamination of human milk are increasing (Civardi et al., 2013; Fernández et al., 2013; Ikonen et al., 1982; Keim et al., 2013; Perrin et al., 2016). Nakamura et al. (2016) investigated an outbreak caused by contamination of human milk in a neonatal intensive care unit and identified that the causative agent was an *E. coli* resistant to several antibiotics. This outbreak had a serious impact because many newborns were infected and one death occurred. The researchers reported that this pathogen was identified in the unpasteurized donated milk, reinforcing that pasteurization is a necessary process in the neonatal intensive care units (Menon and Williams, 2013; Nakamura et al., 2016; O'Connor et al., 2015).

The development of effective treatments and procedures to guarantee microbiological safety of the human milk, maintaining nutritional and organoleptic quality, is indispensable. Pasteurization using thermal treatments has been traditionally considered the gold-standard-method used in HMB to inactivate pathogenic microorganisms (Christen et al., 2013; Keim et al., 2013; Nakamura et al., 2016; Windyga et al., 2015). However, this thermal treatment can negatively affect milk nutritional quality. Due to this adverse effect, emerging technologies have been researched to replace the traditional thermal processing (Christen et al., 2013; Mesías et al., 2016; Vieira et al., 2011).

Among alternative methods of pasteurization, ohmic heating (OH) stands out because it promotes rapid and uniform heating, resulting in less thermal damage to heat-sensitive compounds (Kim and Kang, 2015b; Lee et al., 2012; Mesías et al., 2016; Moro and Arslanoglu, 2012). This technology consists of passing an alternating electric current (a moderate electric field, MEF) through a food with the main purpose of warming it by internal power generation. The temperature rise inside the food promotes inactivation of microorganisms and enzymes in short periods, similar to high-temperature short-time (HTST) treatments (Lee et al., 2012; Mesías et al., 2016).

In the past, it was presumed that the effects of OH were purely thermal and electric field application had no influence on microorganisms. Nevertheless, recent studies have shown that the non-thermal effects are important within the range of OH electric field strength

(Loghavi et al., 2008; Loghavi et al., 2009). They suggest that mild electroporation, for example, can contribute to cellular inactivation (FDA, 2000; Imai et al., 1995; Knirsch et al., 2010; Sun et al., 2008). The use of low frequencies (50 – 60 Hz) is reported to contribute for the additional effect of OH treatment, allowing cell walls to build up charges and form pores (FDA, 2000; Knirsch et al., 2010). Although OH is a promising technology, there is little information about its effects on microbial inactivation in human milk. This may be, in part, because human milk is a very scarce resource, being highly demanded in the HMB. Due to the lack of supply in HMB, the present study was conducted using an infant formula, which is the food alternative to maternal milk administered to babies in absence of human milk. Thereby, the present study aimed to evaluate the non-thermal effects of electricity on microbial inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during OH of infant formula. The kinetics of microbial inactivation was compared with the conventional pasteurization (CV), low-temperature long-time (LTLT) process, normally used in the HMB.

4.1.2 Materials and methods

Sample

An industrialized infant formula was chosen to run the experiments due to high amount of milk necessary for the study and lack of human milk in HMB. The infant formula was prepared according to instructions on nutritional labeling: 90 ml of autoclaved distilled water mixed with 38 g of powder.

Bacterial species

The infant formula was artificially contaminated with bacterial pools of *S. aureus* or *E. coli*, separately. The first pool was composed by the following strains: *S. aureus* 4668/03, *S. aureus* S6, *S. aureus* S8, *S. aureus* ATCC 2998 and *S. aureus* ATCC 25923. The second bacterial pool was composed by *E. coli* CQ, *E. coli* ECHC, *E. coli* DH5- α , *E. coli* ATCC 8739 and *E. coli* ATCC 25972. All strains mentioned came from the Culture Collection of the Microbiological and Food Safety Laboratory of the Institute of Food Science and Technology (ICTA), located in Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

Microbial inoculation

Bacterial pools of *S. aureus* and *E. coli*, were cultivated separately in Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37 °C, for approximately 18 h. Then, 10 mL of each culture were centrifuged for 10 minutes at 5000 g; the pellet was washed twice with 10 mL of sterile salt

solution (0.85%). Final cell concentration was of, approximately, 10^8 UFC/ml of *E. coli* or *S. aureus*. After this procedure, 10 mL of the pool were added to 90 mL of infant formula, obtaining 100 mL of artificially contaminated infant formula. The experiments were conducted separately for each researched type of bacteria (*E. coli* and *S. aureus*).

Ohmic and conventional treatments

Thermal treatments were carried out using OH and CV heating at four temperatures: 57.5, 60.0, 62.5 and 65.0 °C. During isothermal phase, 10 samples were collected at time intervals pre-determined by the ComBase *Software*. Table 1 shows all conditions evaluated during the kinetic experiments.

Table 1: Temperature and time of the ohmic and conventional kinetic experiments.

	Temperature (°C)			
	57.5	60.0	62.5	65.0
	0	0	0	0
	5	1	0.5	0.5
	7	2	1	1
	10	3	1.5	1.5
Time	15	4	2	2
(min)	20	5.5	2.5	2.5
	25	7	3	3
	30	8.5	3.5	3.5
	34	10	4	4
	38	11	4.5	4.5

OH processing was conducted using the experimental setup described by Mercali et al. (2012), which is composed by a variable transformer (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo Varivolt, São Paulo, SP, Brasil), a stabilizer (Forceline, modelo EV 1000 T / 2-2, São Paulo, SP, Brasil), a data acquisition system, a computer, a magnetic stirrer plate (IKA C-MAG, Model HS 10, Brazil), an ohmic cell and titanium electrodes. The ohmic cell consists of a glass-jacketed recipient with 300 mL of capacity.

When an electric field is applied to a conductive medium, OH inherently happens and rises the temperature of the medium. To maintain the temperature constant, it is necessary

either to simultaneously cool the sample or to regulate the electric field at low (but variable) levels. The first option was chosen by using two thermostatic baths and hose and bypass system connected to the jacket of the ohmic cell. This system was used to match the temperature profiles of both heating technologies (OH and CV). Similar temperature-time histories allowed the evaluation of the non-thermal effects associated with the electric current passage through the sample. For all treatments, the temperature during come-up period increased by passing hot water (98°C) through the jacket. For OH experiments, the electric field was turned on at time zero, the time at which the sample reached the working temperature. The temperature of the isothermal phase was kept constant by applying 30 V (60 Hz of frequency) through the electrodes and by passing water through the jacket, simultaneously. Other frequencies were not evaluated due to equipment limitations. The CV experiments were conducted with the same equipment without the application of electric field. The temperature was maintained constant during the isothermal phase by passing water through the jacket.

During heating, samples were agitated with a magnetic stirring plate. Samples were withdrawn at various heating times (described in Table 1), immediately refrigerated in ice bath and subsequently analyzed (the microbiological analyses were performed immediately after the thermal experiments).

Microbiological analyses

Aliquots of 1 mL were taken from the thermal treated milk, and then serial decimal dilutions were carried out in 0.1% peptone water. For *S. aureus*, 0.1 mL of the sample or dilutions were seeded using spread plate technique on Baird-Parker Agar (Merck) selective medium and on Plate Count Agar (PCA; Merck) non-selective medium. For *E. coli*, 0.1 mL of the sample or dilution was seeded on VRBA (Oxoid) and PCA (PCA; Merck) medium. Plates were incubated at 37 °C for 18-24 h, and the colony number was counted. All bacterial counts were repeated for at least two times, and results were expressed as Colony-Forming Units/mL (CFU/mL).

Data analyses

The kinetic experiments were performed in duplicate, and the analyses were carried out in triplicate. The inactivation kinetics were analyzed using GinaFiT software (Geeraerd et al., 2000), which is a freeware add-in for Microsoft Excel freeware that allows the assessment of non-log-linear microbial survivor curves. The Geeraerd et al. (2000) model, which is based on

a non-linear inactivation model with tail, was used to fit experimental data. In this model, represented by Equation 1, data of cell density were plotted as a function of time:

$$N_t = (N_0 - N_{res}) \cdot \exp(-K_{max} \cdot t) + N_{res} \quad (1)$$

where, N_t and N_0 [cfu/mL] are the cell population at time t and zero, respectively; N_{res} [cfu/mL] is the stress resistant subpopulation; and K_{max} [min^{-1}] is the maximum specific inactivation rate.

The quality of the model adjustment was evaluated using the determination coefficient (R^2) and the *Root Mean Squared Error (RMSE)*. The K_{max} value was obtained from the first phase of the non-linear inactivation model and was, then, used to calculate D -value, according to Equation 2:

$$D = 2.303/K_{max} \quad (2)$$

where, D [min] is the time for decimal reduction. This parameter represents the first log reduction, i.e., the time necessary to inactivate 90% of viable cells.

The thermal death time (TDT) or F -value is the time required to obtain a certain reduction of the microbial population at a given constant temperature T , thus representing the total time-temperature combination received by the food. At a constant temperature, it can be defined as:

$$F_\theta = - \frac{\ln \left(\frac{N_t - N_{res}}{N_0 - N_{res}} \right)}{k_{max}} \quad (3)$$

the k_{max} and N_{res} values, obtained from Equation 1, were used to estimate the time-temperature combination necessary to achieve a 12 logarithmic cycle reduction of each microorganism evaluated.

Statistical interpretations of k_{max} and D -values and comparison between different treatments were performed using Microsoft Excel software. Statistical significance was determined by Student's t-test (95% of confidence level).

4.1.3 Results and discussion

Survival curves during ohmic heating and conventional heating

Thermal histories of OH and CV technologies, for experiments conducted at 57.5 and 65.0 °C, are shown in Figure 1. The time–temperature histories at 60 and 62.5 °C showed a similar plot behavior. Data from Figure 1 show that sample temperatures were properly controlled at each set temperature. It is important to have a coincidence of the heating phases of both processes because the objective is to evaluate the non-thermal effects of OH. Therefore, eliminating thermal differences between both heating technologies, any difference in the results can be associated with the electrical effects.

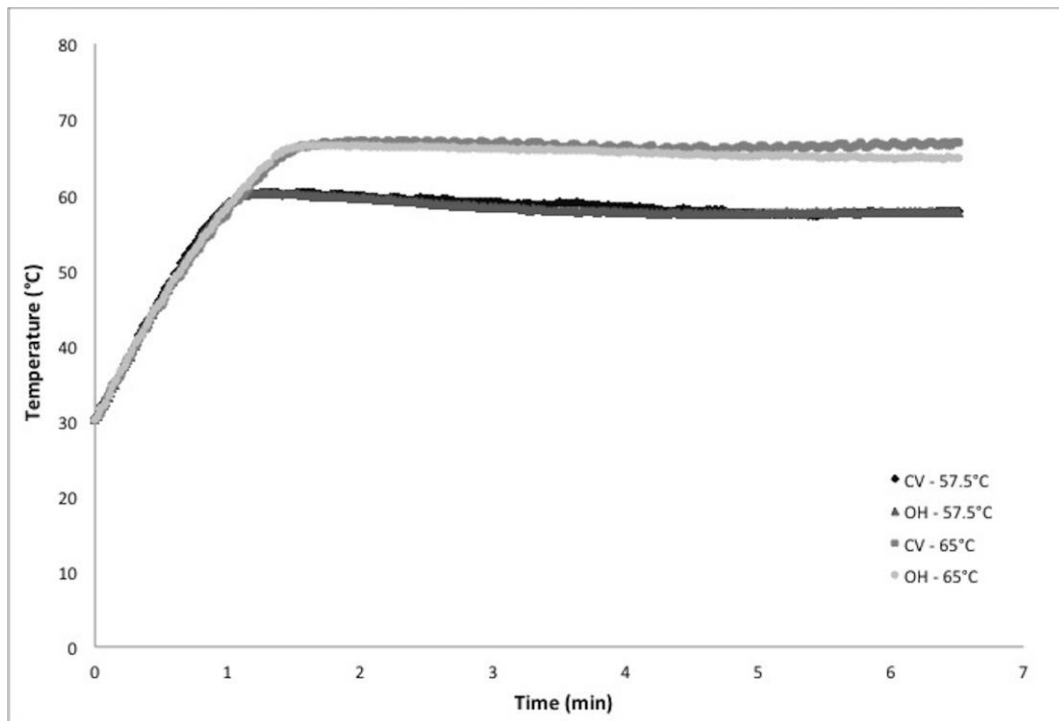


Figure 1: Temperature profiles (the first 6 minutes of heating) for ohmic (OH) and conventional (CV) heating experiments conducted at 57.5 and 65.0 °C.

The initial counting of *E. coli* and *S. aureus* on samples before heating treatments were, approximately, 10^8 UFC/ml. The microbiological counts in both culture medias (selective and non-selective) were similar; for this reason, only the results found in with selective medium will be presented for both microorganisms.

Figure 2 shows survival curves over time for both microorganisms at 62.5 °C. The other temperatures showed a similar plot behavior. In this figure, points are joined by lines simply for better visualization; in the horizontal axis, ‘Initial’ indicates the beginning of heating (time

necessary to achieve the holding temperature) and '0' is the time point when the temperature reached the target temperature of the study (isothermal phase). Two thermostatic baths connected to the jacket of the ohmic cell by hoses with a bypass system were used to rapidly increase the temperature up to the target value (to decrease the come-up phase). Beside this approach, as can be seen in Figure 2, it was not possible to avoid a partial inactivation during the come-up period. This is one of the fundamental difficulties in determining the electric fields non-thermal effects on microorganism and enzymes.

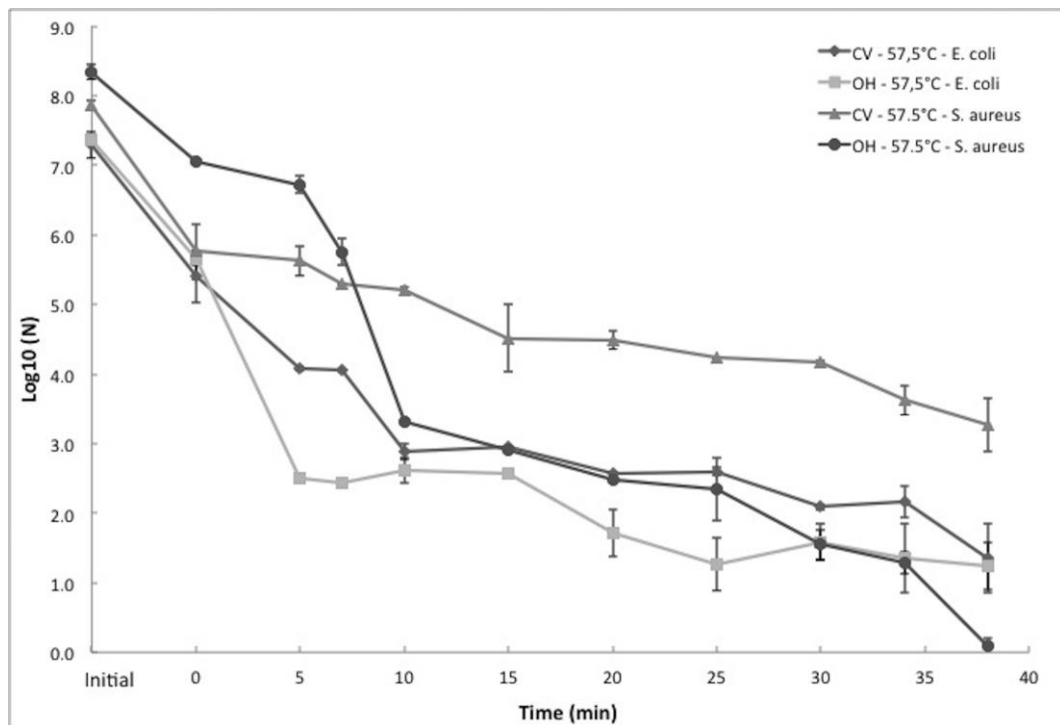


Figure 2: Inactivation of *S. aureus* and *E. coli* under ohmic (OH) and conventional (CV) heating treatments at 57.5 °C.

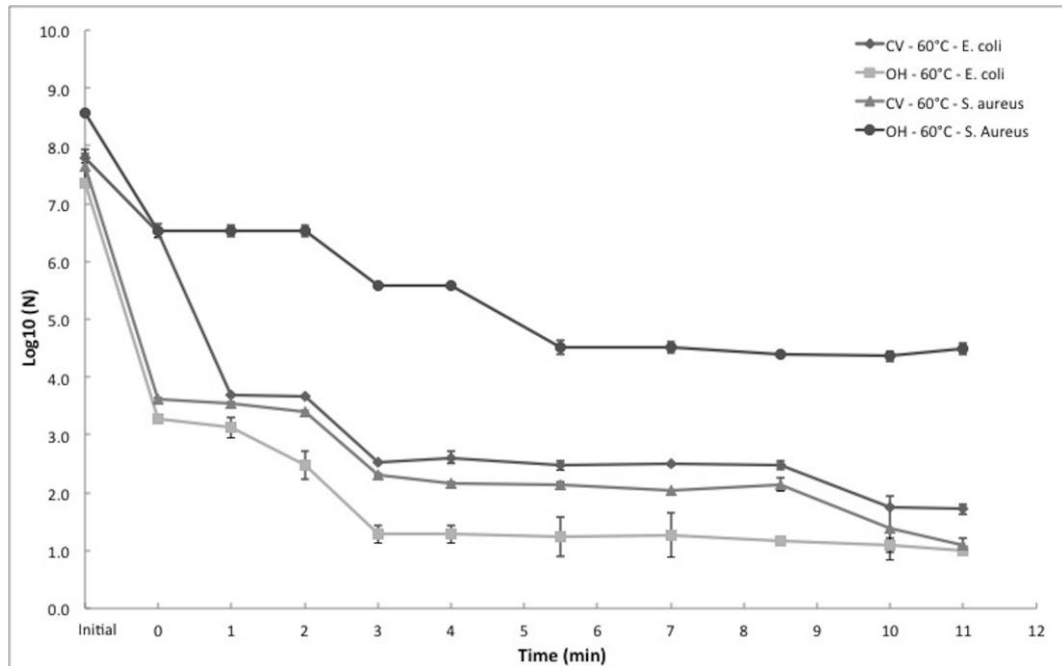


Figure 3: Inactivation of *S. aureus* and *E. coli* under ohmic (OH) and conventional (CV) heating treatments at 60.0 °C.

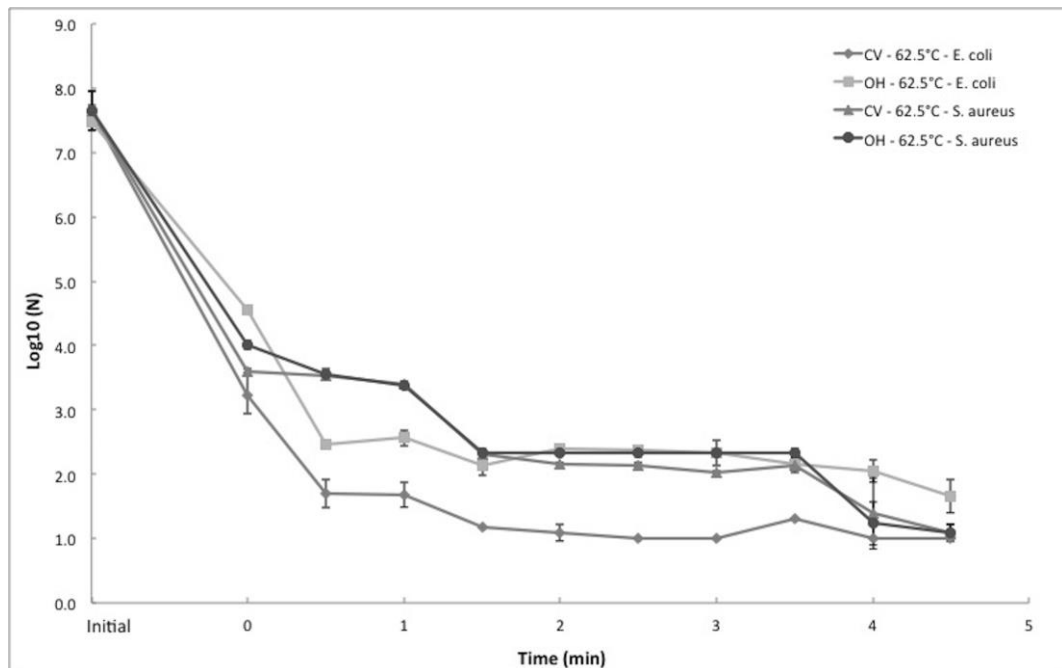


Figure 4: Inactivation of *S. aureus* and *E. coli* under ohmic (OH) and conventional (CV) heating treatments at 62.5 °C.

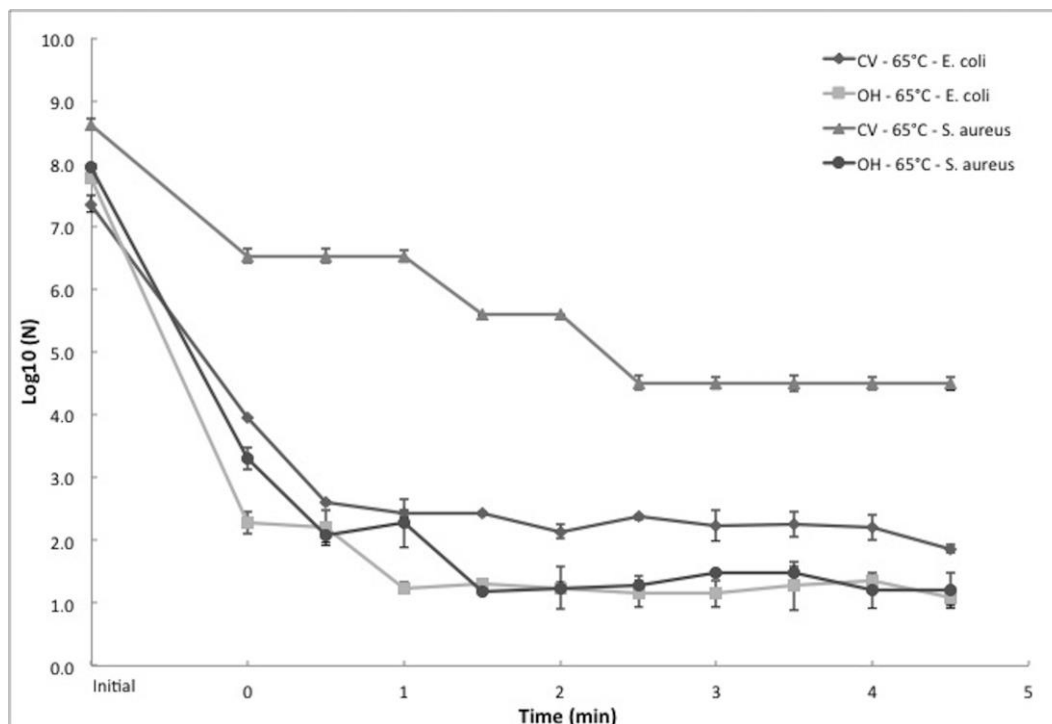


Figure 5: Inactivation of *S. aureus* and *E. coli* under ohmic (OH) and conventional (CV) heating treatments at 65°C.

For *E. coli*, this partial reduction reached average values of 1.77, 4.03, 4.27 and 3.4 log UFC/mL for temperatures of 57.5, 60, 62.5 and 65 °C, respectively. For *S. aureus*, this partial inactivation reached values of 1.28, 3.85, 3.38 and 2.08 log UFC/mL for temperatures of 57.5, 60, 62.5 and 65 °C, respectively. This indicates that the less heat resistant fraction of the bacteria was thermally inactivated before reaching the isothermal phase of the experiment. Therefore, the kinetic modeling was performed with the most heat resistant fraction of the microorganism. Sun et al. (2008) also showed the same difficulty when conducting microbiology experiments with OH, observing a microbial reduction of viable aerobes in milk of approximately 1.7 and 3 log UFC/mL in the first minutes of heating at 57°C and 60°C, respectively (when the temperature was increasing up to the experiment target temperature).

In the end of the experiments, it was observed a resistance thermal behavior: some bacterial strains remained viable, suggesting a resistant population to thermal stress. This was observed for both bacterial species and for all temperatures, except for the experiment conducted with *S. aureus*, using OH at 57.5 °C. Figures 2 shows the inactivating curve with a sigmoidal pattern, highlighting the presence of tail (Geeraerd et al., 2000). Velliou et al. (2011), evaluating the inactivation kinetics of *E. coli* in Brain Heart Infusion broth, also reported an inactivation curve with the presence of tail, suggesting the presence of a resistant

population to thermal stress. Moreover, Smelt and Brul (2014) observed that the heating rate has an effect on microbial survival. They reported that in slow heating vegetative cells can adapt to stress conditions, resulting in a lower inactivation rate. According to these authors, changes in food composition due to heating can also cause changes in the microorganism thermal resistance.

Comparing both microorganisms, *E. coli* specie had lower number of viable cells in the end of the experiment than *S. aureus*. The latter is a Gram-positive organism type, which is more resistant to inactivation by physical agents, such as heat and electricity. Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, have their peptidoglycan layer much thinner and sandwiched between an inner cell membrane and a bacterial outer membrane. These characteristics make them more sensitive to thermal treatment (Forsythe, 2007). This behavior was observed for *E. coli* cells in both, OH and CV, treatments.

For a proper comparison between the two heating technologies, results of inactivation were fitted to kinetic equations, and the kinetic parameters were compared. The next section approaches this assessment.

Kinetic parameters of microbial inactivation

Among the linear and non-linear inactivation models included in the GInaFiT software, the Geeraerd et al. (2000) non-linear inactivation model with tail provided the best fit to data, showing high determination coefficient values and relatively low *RMSE* values for both bacterial species investigated. Table 2 shows the statistical parameters used to evaluate the quality of the adjustment. k_{max} values of each thermal treatment were obtained from the first linear phase of the survival curve, using the GInaFiT software. *D*-values were obtained from k_{max} values. All these parameters are listed in Table 2.

Table 2: Kinetic parameters of the Geeraerd et al. (2000) model with tail (Geeraerd et al. 2000) for *S. aureus* and *E. coli* inactivation during ohmic and conventional heating.

Bacterial specie	Treatment ^c	T (°C)	R ²	RMSE	k_{max} (min ⁻¹) d, e	N _{res} (LOG ₁₀)	D (min) ^{d, e}	z (°C)
<i>S. aureus</i>	OH	57.5	0.93	0.75 ± 0.09	0.68 ± 0.09 ^a	1.32 ± 0.41	3.41 ± 0.44 ^a	9.49
	OH	60.0	0.97	0.21 ± 0.01	1.58 ± 0.09 ^A	4.42 ± 0.03	1.46 ± 0.08 ^A	
	OH	62.5	0.90	0.29 ± 0.06	2.41 ± 0.22 ^a	2.14 ± 0.17	0.96 ± 0.09 ^a	
	OH	65.0	0.92	0.24 ± 0.09	4.74 ± 0.92 ^ā	1.25 ± 0.06	0.53 ± 0.21 ^ā	
	CV	57.5	0.95	0.24 ± 0.14	0.15 ± 0.01 ^b	3.30 ± 0.01	15.06 ± 1.02 ^b	7.91
	CV	60.0	0.88	0.03 ± 0.04	1.15 ± 0.08 ^B	3.52 ± 0.01	2.01 ± 0.14 ^B	
	CV	62.5	0.88	0.37 ± 0.11	1.40 ± 0.11 ^β	3.80 ± 1.00	1.65 ± 0.13 ^β	
	CV	65.0	0.97	0.20 ± 0.00	1.62 ± 0.03 ^b	4.47 ± 0.11	1.42 ± 0.02 ^b	
<i>E. coli</i>	OH	57.5	0.97	0.33 ± 0.04	1.23 ± 0.12 ^a	1.46 ± 0.39	1.88 ± 0.18 ^a	10.13
	OH	60.0	0.96	0.24 ± 0.04	3.32 ± 0.26 ^A	1.09 ± 0.15	0.70 ± 0.05 ^A	
	OH	62.5	0.95	0.30 ± 0.12	5.57 ± 0.22 ^a	2.13 ± 0.00	0.41 ± 0.02 ^a	
	OH	65.0	0.95	0.21 ± 0.05	6.88 ± 0.15 ^ā	2.20 ± 0.10	0.33 ± 0.01 ^ā	
	CV	57.5	0.95	0.35 ± 0.01	0.16 ± 0.01 ^b	1.78 ± 0.42	14.46 ± 0.50 ^b	4.88
	CV	60.0	0.90	0.61 ± 0.04	3.19 ± 0.10 ^A	2.15 ± 0.01	0.72 ± 0.02 ^A	
	CV	62.5	0.99	0.07 ± 0.01	5.14 ± 0.72 ^a	1.03 ± 0.01	0.45 ± 0.06 ^a	
	CV	65.0	0.93	0.20 ± 0.02	7.04 ± 0.21 ^ā	2.23 ± 0.10	0.33 ± 0.01 ^ā	

^c OH: ohmic heating; CV: conventional heating; ^d results are average values of two independent experiments (mean of two replications ± standard error); ^e OH and CV treatments were compared at the same temperature by Student-t test; means with equal letters are significantly similar ($p > 0.05$).

Staphylococcus aureus

The kinetic study conducted with *S. aureus* provided k_{max} values ranging from 0.68 to 4.74 min⁻¹ for OH, and from 0.15 to 1.62 min⁻¹ for CV. When compared at the same temperature, k_{max} values for OH were significantly different ($p < 0.05$) from those of CV treatment. As can be seen in Table 2, OH treatment was more efficient than CV since k_{max}

values of OH were higher than those of CV (compared at the same temperature). Thereby, microbial death may have been suffered action from moderate electric field (MEF) beyond thermal effects. Park and Kang (2013) found a similar effect of MEF on microbial inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and apple juice. The authors reported that electric field-induced OH led to additional bacterial inactivation at temperatures of 55°C, 58°C, and 60°C.

The principal mechanism of microbial inactivation during OH is thermal by nature; however, there is evidence of non-thermal effects of the OH technology on inactivation of various microorganisms. This non-thermal mechanism is called electroporation, which is associated with pore formation in cell membranes due to the presence of an electric field. The electroporation can be reversible or irreversible, the latter leading to bacterial cell death (An and King, 2007; Knirsch et al., 2010). Several studies have shown that OH treatments are more effective than the CV in microbial inactivation due to the non-thermal effects of the electricity (Knirsch et al., 2010; Lee et al., 2012; Park and Kang, 2013; Pereira et al., 2007; Sun et al., 2008; Velliou et al., 2011). Sun et al. (2011) reported that larger amounts of adenosine triphosphate and lactate dehydrogenase were exuded when cells of *Streptococcus thermophilus* were subjected to sublethal-ohmic heating, comparing to sublethal-hot-water heating treatment. They concluded that the electric current of sublethal-ohmic heating treatment increased the permeability of the cell membrane, resulting in nonthermal injury to *S. thermophilus* cell membrane.

D-values for *S. aureus* decreased with increasing temperature, with values ranging from 0.5 to 3.4 min for OH, and from 1.4 to 15 min for CV. As shown in Table 2, there were significant differences between *D*-values of the OH and CV experiments (compared at the same temperature). *D*-values of OH treatment were relatively lower than those of CV treatment, suggesting that, in addition to heat, electric field may also have influenced *S. aureus* inactivation. This result corroborates other observations in the literature that suggest that electroporation may be associated with microbial inactivation during electrical treatments (FDA, 2000; Imai et al., 1995; Sun et al., 2008). Sun et al. (2008) compared the inactivation effects of OH and CV on viable aerobes and *Streptococcus thermophilus* 2646 in milk under identical temperature history conditions and found that *D*-values resulting from OH were significantly lower than those resulting from CV.

The value of *D* using OH was 4.4 times higher than that of the CV treatment at 57.5°C. This difference was lower for higher temperatures: 2.7 times higher for OH treatment

at 65°C. This may indicate that at lower temperatures the non-thermal effects are better observed. As temperature increases, the greater is the effect of heat on the inactivation, and it is more difficult to observe the non-thermal effects. At high temperatures, the non-thermal effects may be masked by the effect of heat.

Another factor that may influence the inactivation of microorganisms is the fat content of the milk. Kim and Kang (2015b) observed that the milk fat content influences the electric conductivity of the product and, as consequence, affects microbial inactivation when OH is applied. Lee et al. (2012) also highlighted that the successful application of OH for microorganism inactivation depends on the electric field applied and electrical conductivity of the sample. As fat content of the human milk can vary depending on the period that it is milked, this variable is difficult to be controlled in HMB.

Table 2 shows z -values for both heating technologies. This parameter is a measure of the change in death rate with a change in temperature. As can be seen, the z -value of the OH (9.49 °C) was higher than the one of the CV (7.91°C). This result shows that the CV process is more temperature dependent because smaller z -values indicate highly temperature dependence. The higher z -value of OH technology indicates that this process requires larger changes in temperature to reduce the time.

Escherichia coli

The kinetic study conducted with *E. coli* specie provided k_{max} values ranging from 1.23 to 6.88 min⁻¹ for OH, and from 0.16 to 7.04 min⁻¹ for CV. Only at 57.5 °C significant differences ($p < 0.05$) were observed between treatments. Moreover, OH showed a D -value 7.7 times smaller than that of the CV at 57.5 °C, which highlights the difference between treatments. On the other hand, this difference was not observed for the other temperatures evaluated. At lower temperatures, when the heat effect is not so pronounced, it is possible to observe and estimate the non-thermal effects of the electricity. However, at higher temperatures the non-thermal effects are hidden by the intense thermal effect on inactivation kinetics. This behavior is more evident for *E. coli* because this bacterium is more sensitive to heat treatment (Forsythe, 2007); however, this line of reasoning can also be applied to *S. aureus* (the lower the temperature, the higher the difference between D -values of OH and CV).

As observed in Table 2, D -values decreased as temperature increases for both heating technologies. This means that at higher temperatures, faster is the inactivation and, as consequence, lower is the degradation of nutritional compounds. Several studies have

reported similar results when comparing the effects of heating on microbial inactivation, with D -values decreasing as temperature increases (Lahou et al., 2015; Palaniappan et al., 1992). Pereira et al. (2007) found lower D -values for *E. coli* inactivation by OH compared to CV and concluded that the kinetic of microbial death was faster in OH treatment, which results in a less aggressive treatment when compared to CV. On the other hand, Palaniappan et al. (1992) reported slightly lower D -values for *E. coli* inactivation when OH was applied at temperatures lower than 56 °C but, when statistical analysis were conducted, no significant differences between treatments were observed. Kim and Kang (2015a) also did not observed additional effects of OH on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice. Table 2 also shows z -values for *E. coli* obtained for OH and CV. OH showed a higher z -value (10.13°C) compared to CV (4.88°C), indicating that the OH technology exhibited a smaller sensitivity to increasing heat. Pereira et al. (2007) found a z -value of 8.4°C when evaluating the influence of OH on the death kinetic parameters of *E. coli* in goat milk.

Comparing the results of both bacterial species, *S. aureus* showed greater D -values than those found for *E. coli*, which is consistent with previous studies that show that Gram-positive bacteria are more heat resistance than most of the non-spore forming Gram-negative pathogens (Lahou et al., 2015). Regarding the non-thermal effects, they were better perceived at the lower temperature for both species of bacteria because the thermal effect happened to a lesser extend, not hiding the effect of the MEF. Comparing both bacterial species at 57.5°C, it is possible to observe that the non-thermal effects were more effective against *E. coli*, (D -value for OH 7.7 times higher than for CV, while for *S. aureus* this difference was 4.4), which is a Gram-negative organism type.

The thermal death time (TDT) or F-value

The thermal death time (TDT), or F -value, is used as a basis for comparing heat treatments. It is the time required to achieve a specified reduction in microbial numbers at a given temperature and it thus represents the total time–temperature combination received by a food (Fellows, 2009). The models obtained in the present study were used to calculate the time–temperature combination necessary to achieve a 12 logarithmic cycle reduction in numbers of *E. coli* and *S. aureus*. Table 3 shows the F -values (F_{θ}) for all temperatures evaluated. In all cases, F -value was lower for the OH treatment (except for *E. coli* 65 °C). For milk pasteurization, the process conditions are based on 12 logarithmic cycle reduction in numbers of *Coxiela burnetii*, which is the most heat-resistant pathogen in milk. Considering

the D_{65} and z -values of *C. burnetii* (0.6 min and 4.34 °C, respectively), the F -values at 62.5 and 65 °C are 27.1 and 7.2 min, respectively. This comparison is important because the extent of the heat treatment required to stabilize a food is determined by the D -value of the most heat-resistant microorganism. As can be seen in Table 3, the F -values of *C. burnetii* are higher than those of *E. coli* and *S. aureus* (at 62.5 and 65 °C), highlighting its high thermal resistance.

When possible the process conditions should be optimized for retention of nutritional and sensory quality by the use of HTST conditions. For milk processing, the lower-temperature longer-time process operating at 63° C for 30 min causes greater changes to flavor and a slightly greater loss of vitamins than HTST processing at 71.8° C for 15 s (Fellows, 2009). Taking into consideration the experimental conditions and both microbial species evaluated in the present work and thinking about the nutritional and sensory quality of the product, the best treatment for human milk pasteurization is OH at 65 °C.

Table 3 - Time–temperature combination necessary for a 12 logarithmic cycle reduction in numbers of *E. coli* and *S. aureus*.

Treatment	<i>T</i> (°C)	<i>F</i> _θ (min)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
OH	57.5	22.49	40.63
	60.0	8.33	17.68
	62.5	4.99	11.47
	65.0	4.04	5.83
CV	57.5	173.08	184.34
	60.0	8.71	24.06
	62.5	5.38	19.78
	65.0	3.95	17.27

4.1.4. Conclusion

The present study evaluated the non-thermal effects of OH on *E. coli* and *S. aureus* inactivation. For *S. aureus*, the non-thermal effects of electricity were observed in all temperatures evaluated, indicating that electroporation may have occurred. For *E. coli*, only at 57.5°C was possible to notice the non-thermal effects of the electrical technology; at higher temperatures, the non-thermal effects may be hidden by the intense thermal effect on inactivation kinetics. Moreover, the parameter *D* for both heating technologies showed lower values at 65 °C, which suggests a faster inactivation and, therefore, a lower degradation of nutritional compounds. Taking into consideration both microbial species, the best treatment for pasteurization of human milk is OH at 65°C. However, it is important to point out that studies with human milk are necessary to evaluate the results obtained in the present study and to better understand the influence of this technology on microbial inactivation and on degradation of nutritional compounds.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support (grant number 443133/2014-0) received from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- AN, H.J. and KING, J.M. 2007. Thermal Characteristics of Ohmically Heated Rice Starch and Rice Flours. *Journal of Food Science*. 72, C084-C088.
- CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S. and LE LOIR, Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*. 131, 30-39.
- CHRISTEN, L., LAI, C.T., HARTMANN, B., HARTMANN, P.E. and GEDDES, D.T. 2013. Ultraviolet-C Irradiation: A Novel Pasteurization Method for Donor Human Milk. *PLoS ONE*. 8, e68120.
- CIVARDI, E., GAROFOLI, F., TZIALLA, C., PAOLILLO, P., BOLLANI, L. and STRONATI, M. 2013. Microorganisms in human milk: lights and shadows. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 26, 30-34.
- FDA. 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: Ohmic and inductive heating. Vol. 2010, Department of Health and Human Services.
- FELLOWS, P.J. 2009. Pasteurization. In: *Food Processing Technology* pp. 11-95, Woodhead Publishing.
- FERNÁNDEZ, L., LANGA, S., MARTÍN, V., MALDONADO, A., JIMÉNEZ, E., MARTÍN, R. and RODRÍGUEZ, J.M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*. 69, 1-10.
- FORSYTHE, S.J. 2007. *The Microbiology of Safe Food*. Blackwell Science Ltd.
- GEERAERD, A.H., HERREMANS, C.H. and VAN IMPE, J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 59, 185-209.
- HAKANSSON, A.P. 2015. Protective effects of human milk antimicrobial peptides against bacterial infection. *Jornal de Pediatria*. 91, 4-5.
- IKONEN, R.S., MIETTINEN, A. and GRÖNROOS, P. 1982. Bacteriological Quality Control in a Human Milk Bank*. *Klin Padiatr*. 194, 295-297.
- IMAI, T., UEMURA, K., ISHIDA, N., YOSHIKAWA, S. and NOGUCHI, A. 1995. Ohmic heating of Japanese white radish *Rhaphanus sativus* L. *International Journal of Food Science & Technology*. 30, 461-472.
- KEIM, S.A., HOGAN, J.S., MCNAMARA, K.A., GUDIMETLA, V., DILLON, C.E., KWIEK, J.J. and GERAGHTY, S.R. 2013. Microbial Contamination of Human Milk Purchased Via the Internet. *Pediatrics*.
- KIM, S.-S. and KANG, D.-H. 2015a. Comparison of pH effects on ohmic heating and conventional heating for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice. *LWT - Food Science and Technology*. 64, 860-866.
- KIM, S.S. and KANG, D.H. 2015b. Effect of milk fat content on the performance of ohmic heating for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 119, 475-486.

- KNIRSCH, M.C., ALVES DOS SANTOS, C., MARTINS DE OLIVEIRA SOARES VICENTE, A.A. and VESSONI PENNA, T.C. 2010. Ohmic heating – a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21, 436-441.
- LAHOU, E., WANG, X., DE BOECK, E., VERGULDT, E., GEERAERD, A., DEVLIEGHERE, F. and UYTENDAELE, M. 2015. Effectiveness of inactivation of foodborne pathogens during simulated home pan frying of steak, hamburger or meat strips. *International Journal of Food Microbiology*. 206, 118-129.
- LEE, S.Y., SAGONG, H.G., RYU, S. and KANG, D.H. 2012. Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *Journal of Applied Microbiology*. 112, 723-731.
- LOGHAVI, L., SASTRY, S.K. and YOUSEF, A.E. 2008. Effect of Moderate Electric Field Frequency on Growth Kinetics and Metabolic Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*. 24, 148-153.
- LOGHAVI, L., SASTRY, S.K. and YOUSEF, A.E. 2009. Effect of moderate electric field frequency and growth stage on the cell membrane permeability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*. 25, 85-94.
- MENON, G. and WILLIAMS, T.C. 2013. Human milk for preterm infants: why, what, when and how? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 98, F559-F562.
- MERCALI, G.D., JAESCHKE, D.P., TESSARO, I.C. and MARCZAK, L.D.F. 2012. Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*. 47, 91-95.
- MESÍAS, M., WAGNER, M., GEORGE, S. and MORALES, F.J. 2016. Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 34, 24-28.
- MORO, G.E. and ARSLANOGLU, S. 2012. Heat Treatment of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 54, 165-166.
- NAKAMURA, K., KANEKO, M., ABE, Y., YAMAMOTO, N., MORI, H., YOSHIDA, A., OHASHI, K., MIURA, S., YANG, T.T., MOMOI, N. and KANEMITSU, K. 2016. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* transmitted through breast milk sharing in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. 92, 42-46.
- O'CONNOR, D.L., EWASCHUK, J.B. and UNGER, S. 2015. Human milk pasteurization: benefits and risks. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 18, 269-275.
- PALANIAPPAN, S., SASTRY, S.K. and RICHTER, E.R. 1992. Effects of electroconductive heat treatment and electrical pretreatment on thermal death kinetics of selected microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 39, 225-232.
- PARK, I.-K. and KANG, D.-H. 2013. Effect of Electroporation by Ohmic Heating for Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Buffered Peptone Water and Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 7122-7129.

- PEREIRA, R., MARTINS, J., MATEUS, C., TEIXEIRA, J.A. and VICENTE, A.A. 2007. Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. *Chemical Papers*. 61, 121-126.
- PERRIN, M.T., FOGLEMAN, A.D., NEWBURG, D.S. and ALLEN, J.C. 2016. A longitudinal study of human milk composition in the second year postpartum: implications for human milk banking. *Maternal & Child Nutrition*. n/a-n/a.
- SERAFINI, Á.B., ANDRÉ, M.C.D., RODRIGUES, M.A., KIPNIS, A., CARVALHO, C.O., CAMPOS, M.R.H. and JUBÉ, T.F. 2003. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. *Revista de Saúde Pública*. 37, 775-779.
- SMELT, J.P.P.M. and BRUL, S. 2014. Thermal Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54, 1371-1385.
- SUN, H., KAWAMURA, S., HIMOTO, J.-I., ITOH, K., WADA, A. and KIMURA, T. 2008. Effects of Ohmic Heating on Microbial Counts and Denaturation of Proteins in Milk. *Food Science Technology Research*. 14, 117-123.
- SUN, H., MASUDA, F., KAWAMURA, S., HIMOTO, J.-I., ASANO, K. and KIMURA, T. 2011. Effect of electric current of ohmic heating on nonthermal injury to *Streptococcus thermophilus* in milk. *Journal of Food Process Engineering*. 34, 878-892.
- VELLIU, E.G., VAN DERLINDEN, E., CAPPUYNS, A.M., NIKOLAIDOU, E., GEERAERD, A.H., DEVLIEGHERE, F. and VAN IMPE, J.F. 2011. Towards the quantification of the effect of acid treatment on the heat tolerance of *Escherichia coli* K12 at lethal temperatures. *Food Microbiology*. 28, 702-711.
- VIEIRA, A.A., SOARES, F.V.M., PIMENTA, H.P., ABRANCHES, A.D. and MOREIRA, M.E.L. 2011. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*. 87, 577-580.
- WINDYGA, B., RUTKOWSKA, M., SOKOŁOWSKA, B., SKĄPSKA, S., WESOŁOWSKA, A., WILIŃSKA, M., FONBERG-BROCZEK, M. and RZOSKA, S.J. 2015. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and native microflora in human milk by high pressure processing. *High Pressure Research*. 35, 181-188.
- ZAIDI, A.K.M., THAYER, D., ALI, S.A. and KHAN, T.A. 2009. Pathogens Associated With Sepsis in Newborns and Young Infants in Developing Countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 28, S10-S18.

4.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2:

Impact of Ohmic and Conventional Heating on the Amount of Ascorbic Acid, Lipids and Proteins in Infant Formula

Artigo científico submetido à revista *Journal of Food Science and Technology*

Abstract

Ohmic heating has been reported as a potential alternative to pasteurization because it can reduce microbial counts in foods with low nutritional changes. The aim of this study was to compare the effects of ohmic and conventional heating on ascorbic acid, lipid and protein contents in infant formula. Kinetic experiments were conducted at temperatures of 57.5, 60, 62.5, and 65°C. Regarding ascorbic acid degradation, k values ranged from 0.018 to 0.030 min^{-1} for ohmic heating, and from 0.016 to 0.029 min^{-1} for conventional heating treatment. No significant differences were observed between k -values of the ohmic heating and conventional heating processes at all temperatures evaluated ($p > 0.05$). The amounts of lipids and proteins were not affected by both heating treatments. Overall, the effects of ohmic heating and conventional heating on the amount of ascorbic acid, lipids and proteins in infant formula were similar, indicating that ohmic heating is a potential technology for milk pasteurization.

Keywords moderate electric field; thermal treatment; dairy products.

4.2.1 Introduction

Pasteurization is the process worldly used for thermal treatment of human milk in human milk banks because it inactivates pathogenic and spoilage microorganisms, ensuring its microbiological quality and safety (Bertino et al., 2009; Biasini et al., 2013).

Pasteurization of human milk may be accomplish by the application of low temperatures during long periods, known as LTLT pasteurization (62.5°C for 30 min), or by using high temperatures and short times, called HTST pasteurization (72 °C for approximately 15 s) (BRASIL et al., 2006; Moltó-Puigmartí et al., 2011; Updegrave, 2005). Although both pasteurization techniques assure microbiological safety, they may affect the sensory and nutritional properties of the milk to some extent. For viscous and particulate products, the quality may be compromised due to overheating and low heat transfer rates, which depends on heat transfer coefficients and thermal conductivities (Chang et al., 2013; Lopes et al., 2016; Moltó-Puigmartí et al., 2011; Sousa et al., 2014; Vieira et al., 2011).

Ohmic heating technology (OH) is an advanced method of food thermal processing that inactivates microorganisms and minimizes nutritional losses. It consists in the application of an alternated electric current through food, which transforms electrical into thermal energy. OH promotes a rapidly temperature increase from the inside out, providing a stable and uniform heating that result in a better nutritional quality product (Castro et al., 2004; Knirsch et al., 2010; Moro and Arslanoglu, 2012). Considering the benefits of the OH technology, it has become a potential alternative for milk pasteurization in human milk banks. However, studies about the effects of OH on nutritional compounds of human milk are scarce. Therefore, the present study aimed to compare the effects of OH and conventional heating (CV) on the amount of ascorbic acid, fatty acids and proteins in infant formula at different temperatures. Human milk was not used to run the experiments because of its high demand and lack of supply in human milk banks. Moreover, a large volume of milk was necessary to

conduct the study, so an industrialized formula with a similar nutritional content to that of the human milk was chosen to run the experiments.

4.2.2. Materials and methods

Sample

OH and CV heating experiments were carried out using 200 mL of infant formula, which was prepared according to instructions on nutritional labeling: 200 mL of autoclaved distilled water mixed with 30 g of powder.

Ohmic and conventional heating processes

The OH process was carried out using the experimental apparatus described by Mercali et al. (2012). It comprises a variable transformer (Paulista Technical Society LTDA, model Varivolt, São Paulo, SP, Brazil); a stabilizer (Forceline, model EV 1000 T/2-2, São Paulo, SP, Brazil); a data acquisition system; a computer; two titanium electrodes; and ohmic cell, which consists of a glass jacketed recipient with 300 mL of capacity. The frequency of the electric field was 60 Hz.

The kinetic experiments were conducted at 57.5, 60.0, 62.5 and 65.0°C. During the isothermal phase, samples were collected at time intervals (described in Table 1) pre-determined by the ComBase Software. The time intervals were chosen by this software because a prior work evaluating the microbial inactivation was conducted. Samples were collected and immediately refrigerated (5°C) until further analyses.

Table 1 - Temperature and time of the ohmic and conventional kinetic experiments.

Temperature (°C)					
		57.5	60.0	62.5	65.0
Time	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min
	5 min	1 min	30 s	30 s	30 s
	7 min	2 min	1 min	1 min	1 min
	10 min	3 min	1 min e 30 s	1 min e 30 s	1 min e 30 s
	15 min	4 min	2 min	2 min	2 min
	20 min	5 min e 30 s	2 min e 30s	2 min e 30s	2 min e 30s
	25 min	7 min	3 min	3 min	3 min
	30 min	8 min e 30 s	3 min e 30 s	3 min e 30 s	3 min e 30 s
	34 min	10 min	4 min	4 min	4 min
	38 min	11 min	4 min e 30 s	4 min e 30 s	4 min e 30 s

In order to evaluate the existence of additional non-thermal effects of the OH technology, it was necessary to match the temperature profiles of the OH and CV. This procedure eliminated the effect of the heating as a variable during the experiments and allowed a fair comparison between methods (OH and CV) during the isothermal phase. For all treatments, the temperature during come-up period increased by passing hot water (98°C) through the jacket. For OH experiments, the temperature of the isothermal phase was kept constant by applying 30 V through the electrodes and by passing controlled-temperature cooling water through the jacket, simultaneously. The CV experiments were conducted with the same equipment without the application of electric field. The temperature was maintained constant during the isothermal phase by passing water at the temperature of the experiment through the jacket. The temperature profiles of the OH and CV experiments at 57.5, 60.0, 62.5 and 65.0°C are shown in Figure 1.

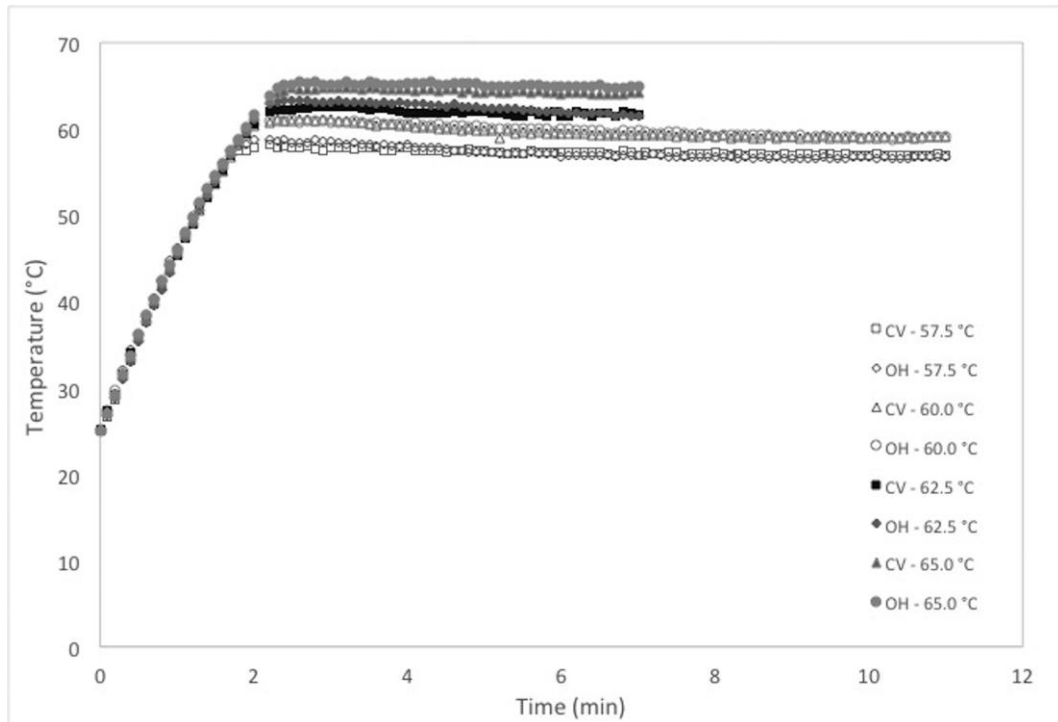


Figure 1 - Thermal histories of infant formula during ohmic (OH) and conventional (CV) heating treatments.

During OH and CV heating experiments, samples were stirred using a magnetic stirring plate (IKA C-MAG, Model HS 10, Brazil). The temperature was measured in two points inside the cell with temperature sensors. Two replicates for each experiment (temperature and type of heating technology) were performed.

Nutritional analyses

Ascorbic acid, protein and lipid contents of the infant formula were analyzed before and after the OH and CV thermal treatments.

Determination of vitamin C

Concentration of ascorbic acid was measured following the method developed by Romeu-Nadal et al. (2006) with some modifications. Aliquots of 1.5 mL of infant formula were mixed with 9 mL of metaphosphoric acid (0.56% w/v) to precipitate proteins and stabilize ascorbic acid. The mixture was homogenized for 30 s and then centrifuged for

10 min. The supernatants were diluted and filtered through a 0.45 μm cellulose acetate membrane. Samples were protected from light during all procedures. Ascorbic acid was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC - Waters, Alliance e2695 Separations Module, USA) with *reversed*-phase C18 column, using a mobile phase of Milli-Q water with acetic acid (0.1% v/v) and methanol (in a relative proportion of 95:5, v/v). The compound was detected at 254 nm of wavelength. Ascorbic acid analysis was carried out in duplicate for each sample evaluated.

Determination of lipids

The lipid content of the samples (fresh and treated by OH and CV for 5 min) was determined Bligh & Dyer methodology (Bligh and Dyer, 1959). The analysis was carried out in duplicate. After OH and CV thermal treatments, aliquots of 20 g of sample was added to 20 mL of ethanol and 10 mL of chloroform and mixed during 30 min using a magnetic stirring plate (*IKA C-MAG*, Model HS 7, Germany); next, 10 mL of chloroform and 15 mL of a 10 % Na_2SO_4 solution were added to the samples. The chloroform phase was separated and filtered in the presence of Na_2SO_4 . The lipid content was determined by gravimetric difference.

Determination of proteins

The total protein content of the samples was determined using the Biuret method (Riegler, 1914). After OH and CV thermal treatments, aliquots of 1 g of infant formula were diluted in 50 mL of distilled water. Then, 400 μL of the diluted sample were mixed with 2 mL of Biuret reagent. The mixture was kept at room temperature for 10 min and its absorbance was measured in a spectrophotometer (Bioespectro, model SP220, Brazil) at 540 nm. The analysis was carried out in triplicate for each sample evaluated.

Determination of the kinetic parameters

Data of ascorbic acid content versus time were adjusted to the first-order kinetic model, according to the following equation:

$$C = C_0 \exp(-k \cdot t) \quad (1)$$

where t is time (min); C_0 and C are the ascorbic acid content (mg/100 g) at time zero and time t , respectively; and k is the first-order rate constant (min^{-1}).

The decimal reduction time (D -value) is the time needed for a tenfold reduction of the initial concentration at a given temperature. It is related to k -value according to Equation 2:

$$\frac{D = \ln(10)}{k} \quad (2)$$

The half-life ($t_{1/2}$) value of degradation is given by Equation 3:

$$\frac{t_{1/2} = \ln(2)}{k} \quad (3)$$

Data analyses

Two independent experiments were carried out for each temperature and type of heating technology. Results the ascorbic acid content were fitted to the first-order model by nonlinear regression using Microsoft Excel® (MapInfo, Troy, NY, USA) and the kinetic parameters were compared using ANOVA and Tukey's test with a confidence level of 95% (Statistica, version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK). Data of protein and lipid content were compared using ANOVA and Tukey's test with 95% of confidence level.

4.2.3 Results and discussion

Effects of conventional and ohmic heating on vitamin C content

Thermal histories of the infant formula during OH and CV heating treatments are shown in Figure 1. It is important to have a coincidence of the heating phases of both processes to evaluate the non-thermal effects of OH on ascorbic acid and protein stability.

This ensures that any difference on degradation kinetics may be attributed to an electric field effect.

The amount of ascorbic acid of the sample before heating was of $9.5 \pm 0,9$ mg / 100 g of infant formula standard diluted. Figures 2 and 3 show ascorbic acid and protein degradation over time for temperatures of 57.5 and 65°C, respectively. The other temperatures showed a similar plot behavior. As can be seen in these figures, ascorbic acid degradation showed a similar behavior for both types of treatments. After OH treatment, ascorbic acid degradation was approximately 48% at 57.5°C (38 min of heating), 20% at 60°C (11 min of heating) and 11% at 62.5°C and 65°C (4.5 min of heating). For CV treatment, ascorbic acid degradation was around 45% at 57.5°C (38 min of heating), 14% at 60°C (11 min of heating), 13% at 62.5°C (4.5 min of heating) and 10.3% at 65°C (4.5 min of heating).

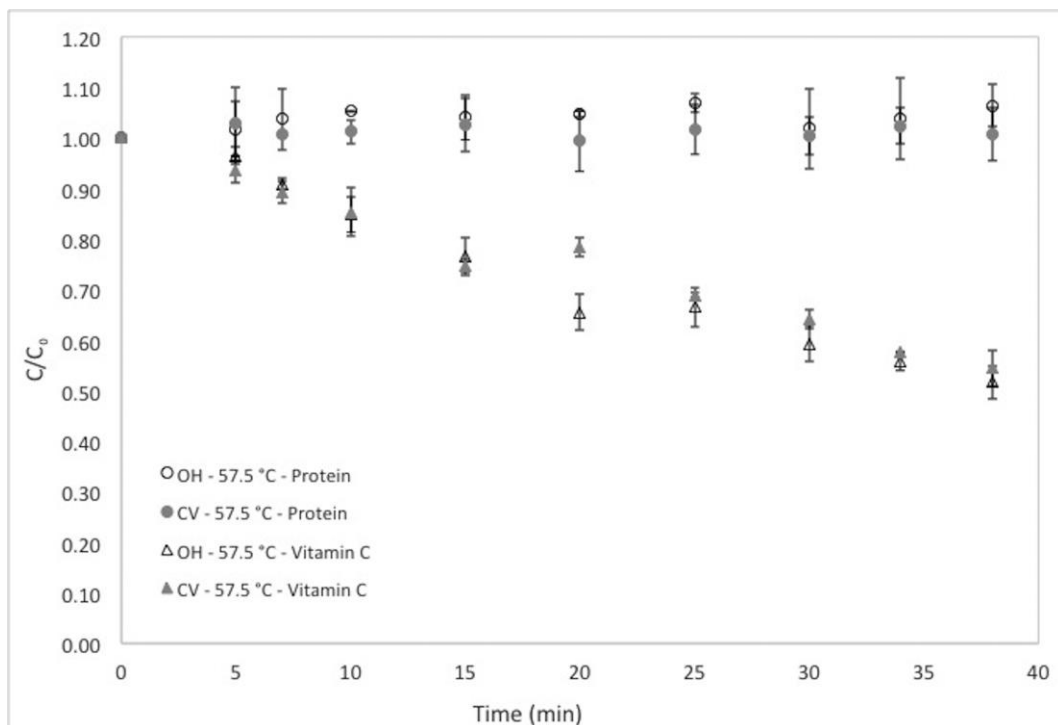


Figure 2 - Degradation of ascorbic acid and proteins during ohmic (OH) and conventional (CV) heating at 57.5°C.

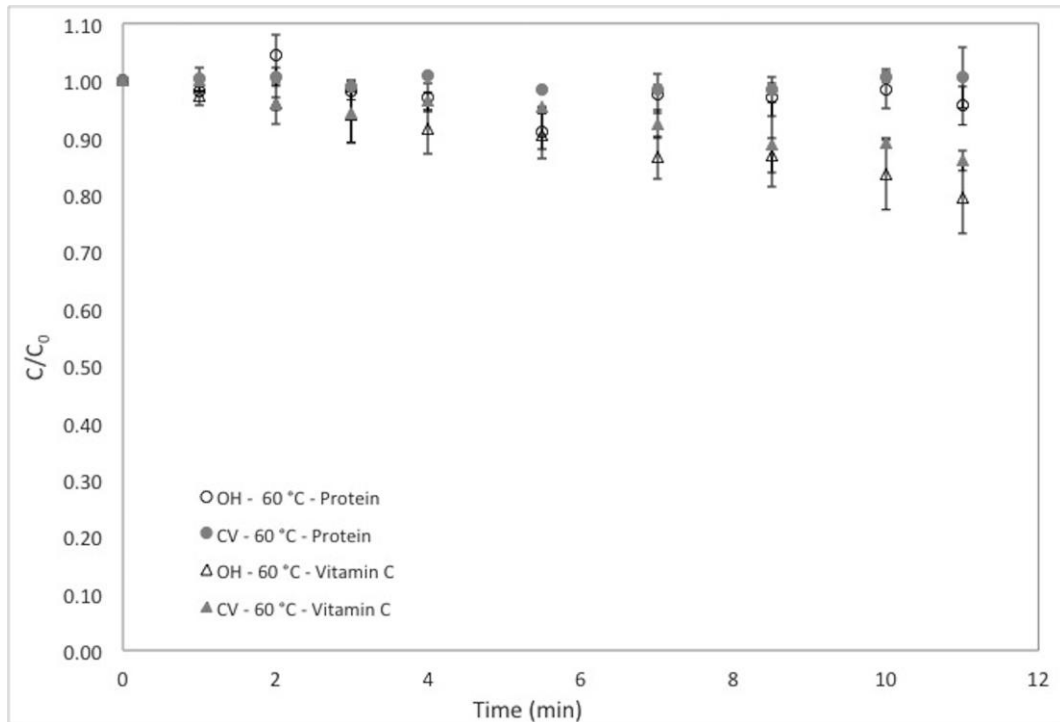


Figure 3: Degradation of ascorbic acid and proteins during ohmic (OH) and conventional (CV) heating at 60.0 °C.

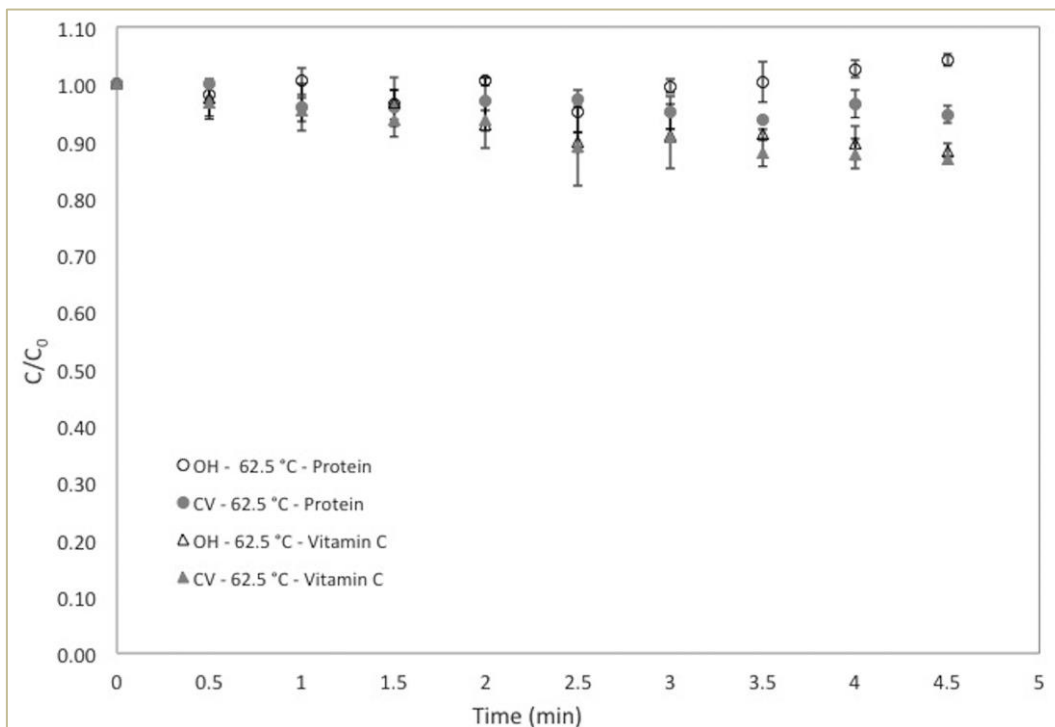


Figure 4: Degradation of ascorbic acid and proteins during ohmic (OH) and conventional (CV) heating at 62.5 °C.

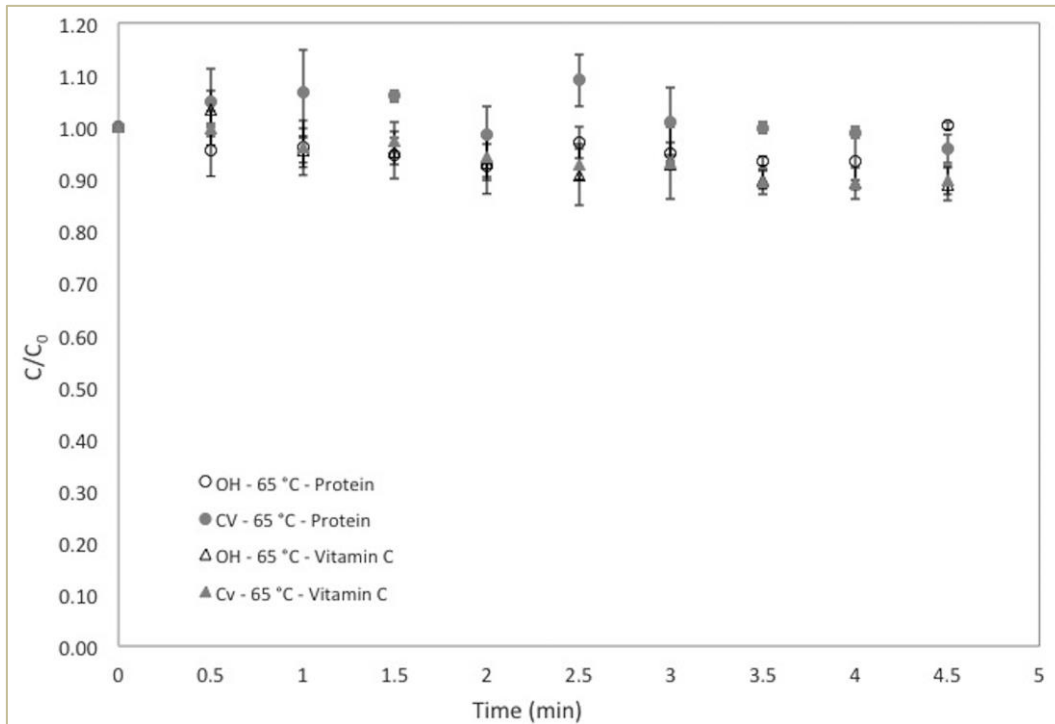


Figure 5: Degradation of ascorbic acid and proteins during ohmic (OH) and conventional (CV) heating at 65.0 °C.

It is difficult to compare the degradation between different temperatures because distinct combinations of time and temperature were used. Overall, ascorbic acid degradation was lower at 62.5 and 65°C (4.5 min of heating) for both heating treatments due to the reduced time of exposure to heat. This result is in agreement with the literature, which states that ascorbic acid is better preserved when high temperatures and short periods of time (HTST processes) are used. Mercali et al. (2012) evaluated ascorbic acid degradation in acerola pulp during thermal treatment by OH and reported values between 3.1 and 10.6% for a thermal treatment at 85°C for 3 min. Romeu-Nadal et al. (2008) studied the effect of LTLT pasteurization (62.5°C, 30 min) on ascorbic acid of milk and found an average degradation of 19.9%. These results demonstrate that time and temperature seem to determine the degradation degree of ascorbic acid in thermal treated foods. Therefore, ascorbic acid measurement is a good indicator of the heat treatment degree and has been proposed as a

biomarker of oxidative stress in biological samples (Lykkesfeldt et al., 1995; Romeu-Nadal et al., 2008; Houška et al., 2006).

Data of ascorbic acid content against time were adjusted to the first-order kinetic equation, and the results are presented in Table 2. The determination coefficients (R^2) were higher than 0.82 for all treatments. The precision of the first-order model was confirmed by the small deviation between estimated and experimental values. This result suggests the first-order model is adequate to predict ascorbic acid degradation in infant formula during CV and OH treatments in temperatures ranging from 57.7 to 65°C.

Table 2 - Parameters of the first-order model for vitamin C degradation during ohmic (OH) and conventional (CV) heating.

Treatment	T (°C)	k (min ⁻¹)*, +	R^2	D (min)*, +	$t_{1/2}$ (min)*, +
OH	57.5	0.018 ± 0.001 ^a	0.97	129 ± 10 ^a	38 ± 3 ^a
OH	60.0	0.019 ± 0.005 ^A	0.98	126 ± 33 ^A	38 ± 10 ^A
OH	62.5	0.027 ± 0.001 ^a	0.89	87 ± 5 ^a	26 ± 1 ^a
OH	65.0	0.030 ± 0.008 ^ā	0.82	79 ± 22 ^ā	24 ± 7 ^ā
CV	57.5	0.016 ± 0.001 ^a	0.97	147 ± 7 ^a	44 ± 2 ^a
CV	60.0	0.013 ± 0.003 ^A	0.91	186 ± 44 ^A	56 ± 13 ^A
CV	62.5	0.030 ± 0.001 ^a	0.94	76 ± 3 ^a	23 ± 1 ^a
CV	65.0	0.029 ± 0.003 ^ā	0.93	80 ± 8 ^ā	24 ± 2 ^ā

* The results are average values of two independent experiments (mean of two replications ± standard error); + means with equals letters are significantly similar ($p > 0.05$).

Table 2 describes the rate constants (values of k) obtained for each temperature and thermal treatment. K -values ranged from 0.018 to 0.030 min⁻¹ for OH, and from 0.016 to 0.029 min⁻¹ for CV treatment. Castro et al. (2004) found higher values of rate constants (0.14 and 0.15 min⁻¹) for ascorbic acid degradation in strawberry products heated at 60-97°C. Mercali et al. (2014) evaluated ascorbic acid degradation in acerola pulp during OH at 85°C and reported lower rate constants: values ranging from 0.0011 to 0.0016 min⁻¹. Studies have shown that the kinetics of ascorbic acid degradation varies depending on the intrinsic

properties of the product and the process characteristics (Esteve et al., 1999; Louarme and Billaud, 2012; Odriozola-Serrano et al., 2008; Serpen and Gökmen, 2007; Vikram and Prapulla, 2005). The degradation is influenced by factors such as pH, acidity, metal ions, light, humidity, water activity, temperature, presence of amino acids, carbohydrates, lipids and enzymes, among others (Gregory, 1996).

In order to evaluate the non-thermal effects associated with the electric field applied, the kinetic parameters of the experiments carried out with the same temperature and distinct type of heating technology were compared. As can be seen in Table 2, no statistical differences were observed between OH and CV heating. This result suggests that the presence of electric field did not affect ascorbic acid degradation in infant formula. Jaeschke et al. (2016) reported that the polarization process, stimulated by the electric field, did not affect the rates of ascorbic acid degradation during OH. Mercali et al. (2015) observed that the oscillating electric field did not affect the degradation rates of anthocyanins during OH. Moreover, Mercali et al. (2014) reported that high electric field frequencies (103 – 105 Hz) did not affect the degradation kinetics of ascorbic acid and pigment compounds, indicating that the molecule predisposition for hydrogen donation in redox reactions was not affected by the rapidly varying electric field; on the other hand, the use of low electric field frequency (10 Hz) led to greater ascorbic acid degradation and higher color changes in acerola pulp probably due to the occurrence of electrochemical reactions. In the present study, even using a low frequency (60 Hz), electrochemical reactions were not observed since similar rates of degradation were observed between OH and CV heating.

It is important to point out that little is known about the effect of the electric field on ascorbic acid degradation in infant formulas and human milk. Some studies evaluated the effect of OH on ascorbic acid degradation in strawberries (Castro et al., 2004), and fruit juices

(Lima et al., 1999). These studies concluded that the presence of electric field did not affect ascorbic acid degradation, corroborating the findings reported in the present study.

Table 2 also shows the decimal reduction values (D-values) and the half-time values ($t_{1/2}$ -values) for each experiment. Both parameters decreased as temperature of the process increases. D-values ranged from 79 to 129 min for OH, and from 80 to 147 min for CV; $t_{1/2}$ -values were between 24 and 38 min for OH, and between 23 and 56 for CV. OH and CV heating showed similar D and $t_{1/2}$ values ($p > 0.05$) in all temperatures evaluated.

Effects of ohmic and conventional heating on lipid content

The supply of fatty acids through human milk is extremely important to ensure the ideal development of a newborn. Among the long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), arachidonic acid and docosahexaenoic acid (DHA) stand out because they are largely accumulated in brain and retina, especially during the first months of life. The conjugated linoleic acid (CLA) is another fatty acid that play important roles due to its immunomodulatory and anti-inflammatory properties (Moltó-Puigmartí et al., 2011; Decsi and Koletzko, 1994; Fidler et al., 1998; Turpeinen et al., 2002). These fatty acids are unstable in the presence of free radicals, oxygen and heat, and are easily oxidized during the heat treatment through which the milk is subjected in the Human Milk Banks (Moltó-Puigmartí et al., 2011; Fidler et al., 1998).

The present study compared the effects of CV and OH on lipid content. The lipid content of the fresh sample was $3,57 \pm 0,09$ g/100 g. Table 3 shows the lipid content (%) after 5 minutes of heating for temperatures ranging from 57.5 to 65°C. As can be observed, the lipid content did not changed after 5 minutes of heating either by OH or by CV treatment ($p > 0.05$). This indicates that both heating technologies influence on lipid stability in the same way and, therefore, the presence of electric field is not promoting additional degradation of lipids in infant formula. This result is in agreement with those found by other studies, which

reported no changes of the lipid content after conventional pasteurization (Fidler et al., 1998; Henderson et al., 1998; Romeu-Nadal et al., 2008). Moreover, Pereira et al. (2008) also did not observe non-thermal effects of electricity on the total fatty acid content after OH treatment.

Table 3 – Lipid and protein contents* of the fresh and treated samples.

Temperature	Treatment	Lipid content (g/100g)**	Protein content (g/100g)***
Fresh	-	3.58 ± 0.09 ^a	1.13 ± 0.06 ^a
57.5 °C	OH	3.5 ± 0.2 ^a	1.11 ± 0.12 ^a
57.5 °C	CV	3.4 ± 0.2 ^a	1.23 ± 0.05 ^a
60.0 °C	OH	3.62 ± 0.03 ^a	1.13 ± 0.03 ^a
60.0 °C	CV	3.6 ± 0.3 ^a	1.27 ± 0.03 ^a
62.5 °C	OH	3.45 ± 0.01 ^a	1.27 ± 0.08 ^a
62.5 °C	CV	3.4 ± 0.3 ^a	1.18 ± 0.02 ^a
65.0 °C	OH	3.44 ± 0.03 ^a	1.26 ± 0.01 ^a
65.0 °C	CV	3.5 ± 0.2 ^a	1.11 ± 0.05 ^a

* The results are average values of two independent experiments (mean of two replications ± standard error); means in the same column with equals letters are significantly similar ($p > 0.05$). ** Samples treated for 5 min. *** Samples in the end of the kinetic experiments.

Effects of ohmic and conventional heating on protein content

Protein content of the samples was determined during CV and OH and the relation between protein concentration and time is shown in Figures 2 and 3. Protein concentration of the infant formula before heating was of 1.13 ± 0.06 g/100 g. As can be seen in these figures, protein concentration was not altered during OH and CV treatment. Table 3 shows protein content in the end of the heating treatment for all treatments. A statistical comparison showed no difference between values of the untreated and treated samples ($p > 0.05$), demonstrating that protein content was not altered by OH and CV.

It is important to point out that it is not possible to evaluate protein denaturation during OH and CV heating because the Biuret method it is not a good method to infer protein denaturation. This methodology only quantitatively determines total protein concentration. In preliminary experiments, the Biuret method was successfully used to infer about loss of thermosensitive bioactive proteins and peptides of the human milk that stimulate intestinal development, actively protect the infant from pathogenic infection, and facilitate the establishment of the microbiota (Lönnerdal, 2016). However, these compounds are not found in the infant formula due to the existence of compositional and functional gaps between human milk and infant formula. In the Biuret method, peptides containing three or more amino acid residues will form a colored chelate complex with cupric ions in the presence of an alkaline cupric sulfate solution. So, single amino acids or dipeptides do not give the biuret reaction, but tripeptides and larger polypeptides or proteins will react to produce the light-blue to violet complex that absorbs light at 540 nm (Kamizake et al., 2003; Krohn, 2001). From the results shown in Table 3, differences between protein content of the untreated and treated samples would be mainly due to Maillard reaction. Maillard reaction is influenced by temperature and is pointed out as the primarily cause for the loss in nutritional value of food proteins during heating (Sohn and Ho, 1995). Roux et al. (2016) reported that OH was effective to preserve the nutritional quality of the infant formula but the presence of Maillard reaction products in treated samples were observed.

The results of the present study suggest that the presence of electric field did not promote additional protein degradation in infant formula. Similar results were reported by Mesías et al. (2016) with infant food samples. They verified that the total protein amount was not altered after CV and OH treatments. However, they observed a significant reduction of essential amino acids for the CV treatment, leading to a reduction of the protein quality; this reduction was not observed for the OH treatment (Mesías et al., 2016). Yeung et al. (2006)

observed a similar behavior when evaluating the amino acids profile of infant formulas during CV heating, with losses of free amino acids around 22.6%.

Nutrient losses in infant food submitted to thermal treatments must be avoided, aiming to guarantee nutritional quality and to ensure a normal child growth and development (Hernández Rodríguez, 2001). The composition of amino acids in infant food can be used as a measure of nutritional value, as it determines protein quality (Mesías et al., 2016; Levesque et al., 2012). The present study did not assess the amount of amino acids after treatment; however, the results are encouraging since the amount of total proteins was not altered after both CV and OH treatments.

4.2.4 Conclusion

The present study evaluated the effect of OH and CV heating on ascorbic acid, lipid and protein content of infant formula. Results demonstrated no statistical differences between both heating treatments regarding ascorbic acid, lipids and proteins stability, which indicates similar mechanisms of degradation during both heating processes. These results are encouraging, however further studies considering the effect of OH treatment on other milk components, as well as on microorganisms, are necessary before the use of this technique to pasteurize human milk. Moreover, studies using human milk should be performed in order to validate the results obtained with infant formula.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

- Bertino, E, Giuliani F, et al. (2009) Benefits of donor human milk for preterm infants: Current evidence. *Early Human Development* 85: S9-S10.
- Biasini A, Stella M, Malaigia L, et al. (2013) Establishment, operation and development of a donor human milk bank. *Early Human Development* 89: S7-S9
- Bligh EG and Dyer WJ. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917. .
- BRASIL, Saúde Md and ANVISA ANdVS-. (2006) Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano: RDC-ANVISA nº. DE 171, de 04 de setembro de 2006. Brasília.
- Castro I, Teixeira JA, Salengke S, et al. (2004) Ohmic heating of strawberry products: electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 27-36.
- Chang J-C, Chen C-H, Fang L-J, et al. (2013) Influence of Prolonged Storage Process, Pasteurization, and Heat Treatment on Biologically-active Human Milk Proteins. *Pediatrics & Neonatology* 54: 360-366.
- Decsi T and Koletzko B. (1994) Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Acta Pædiatrica Acta Pædiatrica* 83: 31-37.
- Esteve M, Frígola A, Martorell L, et al. (1999) Kinetics of green asparagus ascorbic acid heated in a high-temperature thermoresistometer. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208: 144-147
- Fidler N, Sauerwald T, Koletzko B, et al. (1998) Effects of Human Milk Pasteurization and Sterilization on Available Fat Content and Fatty Acid Composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 27: 317-322.
- Gregory J. (1996) Vitamins. In: Fennema OS, D and Parkin K (eds) *Food Chemistry*. 4th ed. New York: CRC Press, 1144.
- Henderson TR, Fay TN and Hamosh M. (1998) Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *The Journal of Pediatrics* 132: 876-878.
- Hernández Rodríguez M. (2001) *Alimentación infantil*, Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Houška M, Strohalm J, Kocurová K, et al. (2006) High pressure and foods—fruit/vegetable juices. *Journal of Food Engineering* 77: 386-398.

- Jaeschke DP, Marczak LDF and Mercali GD. (2016) Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. *Food Chemistry* 199: 128-134.
- Kamizake NKK, Gonçalves MM, Zaia CTBV, et al. (2003) Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 507-516.
- Knirsch MC, Alves dos Santos C, Vicente MOS, et al. (2010) Ohmic heating : A review. *Trends in Food Science & Technology* Trends in Food Science & Technology 2121: 436-441.
- Krohn R. (2001) The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc B1.1.1-B1.1 :28.
- Levesque C, Elango R and Ball R. (2012) Metabolic availability of amino acids in food proteins: New methodology In: Felix D'Mello J (ed) *Amino acids in human nutrition and health*. London: CAB International, 256-266.
- Lima M, Heskitt B, Burianek L, et al. (1999) Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. *J Food Process Preserv* 23: 421-443.
- Lönnerdal B. (2016) Human Milk: Bioactive Proteins/Peptides and Functional Properties. In: J B, R S and Y V (eds) *Protein in Neonatal and Infant Nutrition: Recent Updates* Basel: Karger Publishers, 97-107
- Lopes R, Mota M, Delgadillo I, et al. (2016) Pasteurization: Effect on Sensory Quality and Nutrient Composition *Encyclopedia of Food and Health* Encyclopedia of Food and Health. Oxford Academic Press 246-263.
- Louarme L and Billaud C. (2012) Evaluation of ascorbic acid and sugar degradation products during fruit dessert processing under conventional or ohmic heating treatment. *LWT - Food Science and Technology* 49: 184-187
- Lykkesfeldt J, Loft S and Poulsen HE. (1995) Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection - Are They Reliable Biomarkers of Oxidative Stress? *Analytical Biochemistry* 229: 329-335.
- Mercali G, Schwartz S, Marczak L, et al. (2014) Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *J Food Eng* 123: 1-7.

- Mercali GD, Gurak, PD, et al. (2015) Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation during ohmic heating of jaboticaba. *Food Chem* 171: 200-205.
- Mercali GD, Jaeschke DP, Tessaro IC, et al. (2012) Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* 47: 91-95.
- Mesías M, Wagner M, George S, et al. (2016) Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34: 24-28.
- Moltó-Puigmartí C, Permanyer M, Castellote A, et al. (2011) Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry* *Food Chem* 124: 697-702.
- Moro GE and Arslanoglu S. (2012) Heat Treatment of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54: 165-166.
- Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Gimeno-Añó V, et al. (2008) Kinetic Study of Anthocyanins, Vitamin C, and Antioxidant Capacity in Strawberry Juices Treated by High-Intensity Pulsed Electric Fields. *J Agric Food Chem* 56: 8387-8393.
- Pereira R, Martins R and Vicente A. (2008) Goat Milk Free Fatty Acid Characterization During Conventional and Ohmic Heating Pasteurization. *J Dairy Sci* 91: 2925-2937.
- Riegler E. (1914) Eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Eiweisses. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 53: 242-254.
- Romeu-Nadal M, Castellote A, Gayà A, et al. (2008) Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem* 107: 434-438.
- Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, et al. (2006) Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *Journal of Chromatography B* 830: 41-46.
- Roux S, Courel M, Birlouez-Aragon I, et al. (2016) Comparative thermal impact of two UHT technologies, continuous ohmic heating and direct steam injection, on the nutritional properties of liquid infant formula. *Journal of Food Engineering* 179: 36-43.
- Serpen A and Gökmen V. (2007) Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chem* 104.

- Sohn M and Ho C-T. (1995) Ammonia Generation during Thermal Degradation of Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 3001-3003.
- Sousa SG, Delgadillo I and Saraiva JA. (2014) Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chemistry* 151: 79-85.
- Turpeinen AM, Mutanen M, Aro A, et al. (2002) Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 504-510.
- Updegrave K. (2005) Human Milk Banking in the United States. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 5: 27-33.
- Vieira AA, Soares FVM, Pimenta HP, et al. (2011) Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *87: 577-580.*
- Vikram VR, MN and Prapulla S. (2005) Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *J Food Eng* 69: 39-40.
- Yeung C, Lee H, Lin S, et al. (2006) Negative effect of heat sterilization on the free amino acid concentrations in infant formula. *European journal of clinical nutrition* 60: 136-141.

4.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

Impact of ohmic heating on microbial inactivation and degradation of nutritional compounds in human milk

Artigo científico será submetido à revista *Food Control*

Abstract

Pasteurization is a well-recognized thermal process that guarantees quality and microbiological safety of food. However, it may result in loss of nutritional value especially due to degradation of thermosensitive compounds. The ohmic heating (OH) technology has been reported as a potential alternative to conventional pasteurization since it can reduce microbial counts in foods, with lower changes of the nutritional and organoleptic properties. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of OH on microbial inactivation and on nutritional compounds degradation in human milk. This study was conducted aiming to evaluate kinetic results previously obtained for infant formula treated by OH. The results revealed that the OH technology was effective for *S. aureus* and *E. coli* inactivation. Regarding vitamin C content, the thermal treatment did not alter the initial content (100% retention); on the other hand, total protein content was significantly reduced by 35% at the end of OH treatment ($p < 0.05$). Overall, the OH treatment was effective to eliminate *S. aureus* and *E. coli* from the human milk but a significant reduction of the protein content was observed.

Keywords: ohmic heating; microbial counts, nutritional compounds, electricity.

4.3.1. Introduction

Human milk is considered a complete food for the nutrition of a newborn because its nutritional composition is suited to the human infant needs, moreover, human milk present non-nutritive bioactive factors that promote protection against various infectious and allergic diseases and healthy development (Matos, Ribeiro, & Guerra, 2015; World Health Organization, 2015).

To ensure the benefits of the human milk to babies whose mothers cannot breastfeed (situations when mother's own milk is not available or is limited), a human donor milk is a valuable alternative (Brasil, 2015). For this, Human Milk Banks were created throughout the country, which are specialized centers responsible for breastfeeding promotion, protection and support. These centers are also responsible for activities such as human donor milk collection, processing, quality control and distribution (Brasil, 2008).

In this context, the safety and quality of a milk from a source other than the baby's mother is a priority. It can not present risk to the newborn health. Thus, it is necessary to take precautions and follow procedures for the proper handling of donor milk, from its collection to use, ensuring its health standards (Kayıran, Can, Kayıran, Ergonul, & Gürakan, 2014; Windyga, et al., 2015b).

Pasteurization is a relatively mild heat treatment and an effective alternative to reduce and eliminate pathogenic microorganisms and to extend the shelf life of foods. It is applied to human donor milk based on 12 logarithmic cycle reduction of the heat-resistant microorganism called *Coxiella burnetii* (P. J. Fellows, 2009). In Human Milk Banks, pasteurization is accomplish by applying lower-temperature longer-time process with temperature-time binomial of operating at 62.5° C for 30 min (Nakamura, et al., 2016; O'Connor, et al., 2015). However, this thermal treatment can negatively affect milk nutritional quality because the heat transfer by conduction is slow (Moltó-Puigmartí, Permanyer, Castellote, & López-Sabater, 2011; Moro & Arslanoglu, 2012a; Vieira, et al., 2011). Due to this adverse effect, emerging technologies, such as ohmic heating, microwave and infrared heating have been studied in order to be used as an alternative for thermal processing with the advantage of rapid heating up to the desire holding temperature. As a result, there is a reduction of the treatment time, which is critical to avoid excessive thermal damage of labile substances (Baro, Arslanoglu, Giuffrida, Dellavalle, Conti, & Moro, 2011; Icier, 2012; Mesías, Wagner, George, & Morales, 2016a).

Ohmic heating (OH) is an advanced method for food thermal processing which consists of passing an alternating electric current through the food, transforming electrical energy into heat, thus promoting an increase of the temperature inside the foodstuff. The electrical energy is dissipated into heat, resulting in a uniform and rapid heating and, consequently, products maintain higher nutritional quality (Chen, Abdelrahim, & Beckerich, 2010; Knirsch, Alves dos Santos, Vicente, Augusto, & Vessoni Penna, 2010). In a previous study, Quadros et al. (2016a, b - manuscripts presented in sections 4.1 and 4.2, respectively) have investigated the non-thermal effects of electricity on microbial inactivation kinetics and on nutritional of degradation during OH applied to infant formula. This prior work has shown the efficacy of the OH technology to inactivate microorganisms without compromising the nutritional quality of the product. Thus, the objective of present study was to evaluate the results previously obtained (microbial inactivation and degradation of nutritional) by applying the OH technology for pasteurization of human donor milk. The pasteurization experiments were designed and conducted using the kinetic parameters reported in these previous works (Quadros et al., 2016a,b).

4.3.2 Materials and methods

As aforementioned, this study was performed to evaluate two previous works conducted with infant formula (Quadros et al., 2016a,b - manuscripts presented in sections 4.1 and 4.2, respectively). In these prior studies, *D* values for *S. aureus* and *E. coli* inactivation were obtained from kinetic experiments at temperatures of 57.5, 60.0, 62.5 and 65.0°C. In the present work, these values were used to calculate the time–temperature combination (thermal death time or F-value) necessary to achieve an 8 logarithmic cycle reduction in numbers of *E. coli* and *S. aureus*. Then, the thermal death time was used to optimize the pasteurization process by OH using high-temperature short-time (HTST) conditions.

Human milk sample

The human milk samples were obtained from a donation made by the Bank of Human Children's located in Porto Alegre, Brazil. The donated samples belonged to healthy donors who had a surplus production. Samples were frozen (-20 °C) in sterilized glass containers until further usage.

Samples were thawed under refrigeration, homogenized and divided into 9 portions of 250 ml to perform the microbiological and nutritional experiments.

Human milk contamination

The human milk was artificially contaminated with bacterial pools of *S. aureus* and *E. coli*, separately. The first pool was composed by the following strains: *S. aureus* 4668/03, *S. aureus* S6, *S. aureus* S8, *S. aureus* ATCC 2998 and *S. aureus* ATCC 25923. The second bacterial pool was composed by *E. coli* CQ, *E. coli* ECHC, *E. coli* DH5- α , *E. coli* ATCC 8739 and *E. coli* ATCC 25972. All strains mentioned came from the Culture Collection of the Microbiological and Food Safety Laboratory of the Institute of Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Bacterial pools of *S. aureus* and *E. coli* were cultivated separately in BHI broth at 37°C, for approximately 18 h. Then, 10 mL of each culture were centrifuged; the pellet was washed twice with 10 mL of a sterile salt solution (0.85%). After this procedure, 28 mL of the pool were added to 222 mL of human milk, obtaining 250 mL of artificially contaminated human milk. The final cell concentration was of, approximately, 10^8 CFU/mL of *S. aureus* or *E. coli*. The experiments were conducted separately for each studied bacterial specie (*S. aureus* and *E. coli*).

Ohmic pasteurization

The pasteurization process was applied taken into account the thermal F -value calculated from Equation 1. The k_{max} and N_{res} values at 65°C were obtained from kinetic experiments conducted by Quadros et al. (2016a). F -value was based on 8 logarithmic cycle reduction in numbers of *E. coli* or *S. aureus*. Table 1 shows k_{max} , N_{res} , D -values and F -values (F_θ) used to design the pasteurization experiments by OH.

$$F_\theta = - \frac{\log \left(\frac{N_t - N_{res}}{N_0 - N_{res}} \right)}{k_{max}} \quad (1)$$

where, N_t and N_0 [cfu/mL] are the cell population at time t and zero, respectively; N_{res} [cfu/mL] is the stress resistant subpopulation; and K_{max} [min^{-1}] is the maximum specific inactivation rate.

Table 1 - Kinetic parameters of Geeraerd et al. (2000) model with tail (Geeraerd et al 2000) and F -values for *S. aureus* and *E. coli* inactivation during ohmic heating.

Bacterial specie	T (°C)	k (min ⁻¹)	N_{res} (LOG ₁₀)	D (min)	F_{θ} (min)*	F_p (min)**
<i>S. aureus</i>	65.0	$4.74 \pm 1.92^{\bar{a}}$	1.25 ± 0.06	$0.53 \pm 0.21^{\bar{a}}$	3.90	4.12 ± 0.2
<i>E. coli</i>	65.0	$6.88 \pm 0.15^{\bar{a}}$	2.20 ± 0.10	$0.33 \pm 0.01^{\bar{a}}$	2.70	2.81 ± 0.1

* F_{θ} is the theoretical value obtained from Eq 1. ** F_p is the value obtained from curves presented in Figure 1.

Figure 1 shows the temperature profile during the pasteurization process applied to inactivate *S. aureus* and *E. coli* and to evaluate nutritional degradation. As can be seen in this figure, the pasteurization experiments comprised a come-up period, a holding phase and cooling period. The time-temperature history was applied taken into account the F_{θ} (8 logarithmic cycle reduction) of each microorganism.

The F_p value, described in Table 1, is the cumulative total lethality applied to samples. These values were calculated from curves presented in Figure 1, using the graphical methodology and the lethality concept, which is the integrated effect of temperature and time on microorganisms.

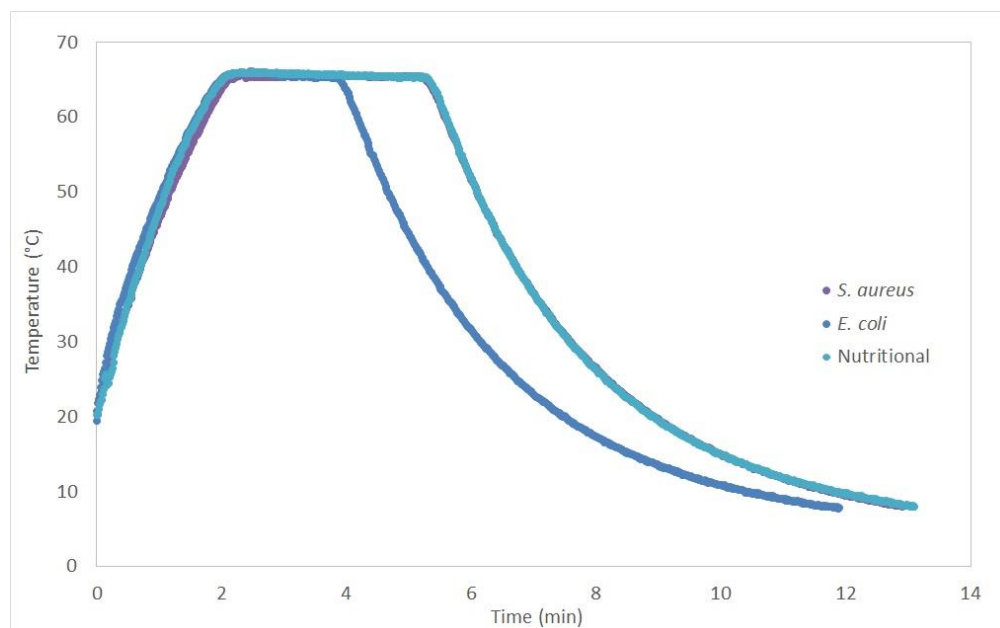


Figure 1 - Thermal histories during pasteurization of human milk by ohmic heating (OH). The time-temperature history was applied taken into account the F_{θ} (8 logarithmic cycle reduction) of each microorganism.

The experiment was performed using the experimental setup described by Mercali, Jaeschke, Tessaro, and Marczak (2012b), which consists of a variable transformer (Technical Society Paulista LTDA, Varivolt model, São Paulo, SP, Brazil), a stabilizer (Forceline model EV 1000 T / 2-2, São Paulo, SP, Brazil), a data acquisition system, a computer, a magnetic stirrer plate (IKA C-MAG, model HS 10, Brazil), an ohmic cell and platinum electrodes. The ohmic cell consists of a 300 ml coated glass container.

During the experiment, the temperature was kept constant at 65°C by applying 30 V (60 Hz of frequency) through the electrodes and water through the jacket at the same time. During heating, samples were stirred with a magnetic stirring plate. After the holding phase, samples were cooled by passing cold water through the ohmic jacket. Samples were withdrawn in three different times for microbiological analyses: before heating, after the come-up phase and in the end of the treatment. For nutritional analyses, samples were collected before and after the treatment and immediately cooled in an ice bath. Microbiological and nutritional analyses were conducted immediately after the thermal treatment.

Microbiological analyses

Serial decimal dilutions were carried out in 0.1% peptone water with aliquots of 1 mL of sample. For *S. aureus*, 0.1 mL of the dilution was seeded using spread plate technique on Baird-Parker Agar (Merck) selective medium and non-selective medium Plate Count Agar (PCA; Merck). For *E. coli*, 0.1 mL of each dilution was seeded using spread plate technique on VRBA (Oxoid) and PCA (PCA; Merck). Plates were incubated at 37 °C for 18-24 h, and the colony number was counted. The analyses were performed in triplicate. All bacterial counts were repeated for at least two times. As results were similar in both, non-selective and selective medium, values obtained in the selective medium for each microorganism, expressed as CFU/mL, were used and presented in the present study.

Nutritional compound analyses

Vitamin C and protein contents of the human milk before and after the OH treatment were analyzed.

Determination of vitamin C

The concentration of vitamin C was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC - Waters, Alliance 2695 Separations Module, USA), following the

method developed by Romeu-Nadal, Morera-Pons, Castellote, and López-Sabater (2006) and as described by Quadros et al., 2016b. The analysis was performed in duplicate for each evaluated sample.

Determination of proteins

The total protein content of the samples was determined using the Biuret method as described by Quadros et al. (2016b). Analyses were performed in triplicate for each evaluated sample.

Data analyses

Three independent experiments were carried out for each bacterial specie and also for nutritional compounds. Descriptive analysis of the nutritional and microbiological profile of the samples was performed. Samples before and after treatment were compared by Student's *t*-test with 95% of confidence level using Excel software (MapInfo, Troy, NY, USA).

4.3.3. Results and Discussion

Microbial inactivation

The objective of the pasteurization experiment was an 8 logarithmic cycle reduction of each microorganism using the kinetic parameters (k_{max} , N_{res} , *D-values* and F_{θ}) obtained for infant formula in a previous work (Quadros et al., 2016a). The experiments were designed aiming to achieve the minimum cumulative total lethality (F_{θ}) by applying a thermal treatment via OH. Table 1 describes values F_{θ} for each microorganism evaluated. This table also describes the time–temperature combination (F_p) experimentally applied to samples. F_p values were obtained from heating curves shown in Figure 1 applying the graphical methodology. As can be seen, F_{θ} and F_p were close, which guarantees the quality of the thermal treatment applied.

Figure 2 shows the number of viable cells on a logarithmic scale for samples analyzed before heating (prior to thermal treatment), after the come-up period and after cooling. As abovementioned, fresh samples were artificially contaminated with initial counts higher than 10^8 CFU/ ml, and this was the number of viable cells before heating. As can be observed in Figure 2, a reduction of microbial count was observed during the come-up period. As the temperature of a food increases during processing, the rate of microbial destruction increased.

The initial heating until the isothermal phase is approached (come-up period) contributes little towards total lethality. Most of the accumulated lethality takes place during the isothermal phase, before cooling begins. For *S. aureus*, this initial reduction (during the come-up period) was of approximately 1.7 log cycles, while for *E. coli*, this partial reduction was higher, around 6.2 log cycles. The difference between reductions can be explained because *S. aureus* species is a Gram-positive organism type, more resistant to inactivation by physical agents, such as heat and electricity. On the other hand, *E. coli* is a Gram-negative bacteria, more sensitive to thermal treatment due to its peptidoglycan layer much thinner and sandwiched between an inner cell membrane and a bacterial outer membrane (Forsythe, 2007).

Figure 2 shows that in the end of the thermal treatment (i.e, after the cooling phase), both bacterial species were totally inactivated. These results evaluate the previous work in which infant formula was used to evaluate *S. aureus* and *E. coli* inactivation kinetics (Quadros et al., 2016a). This prior study was performed with infant formula because there is a high demand and lack of supply of human donor milk in Human Milk Banks. It indicated that an additional non-thermal effect contributed for the inactivation of vegetative cells of *S. aureus* and *E. coli*. Other studies evaluating OH technology for microbial inactivation in milk and other foods also indicate the OH treatment efficiency (FDA, 2000a; Imai, et al., 1995; Jaeger, et al., 2016; Kim, et al., 2015; Knirsch, Alves dos Santos, Vicente, et al., 2010; Lee, et al., 2012; I. K. Park & D. H. Kang, 2013; R. Pereira, J. Martins, C. Mateus, J. Teixeira, & A. Vicente, 2007; H. Sun, S. Kawamura, J.-i. Himoto, K. Itoh, T. Wada, & T. Kimura, 2008; Velliou, et al., 2011). The results obtained in the present study confirm and evaluate the kinetic parameters found for *S. aureus* and *E. coli* inactivation in infant formula.

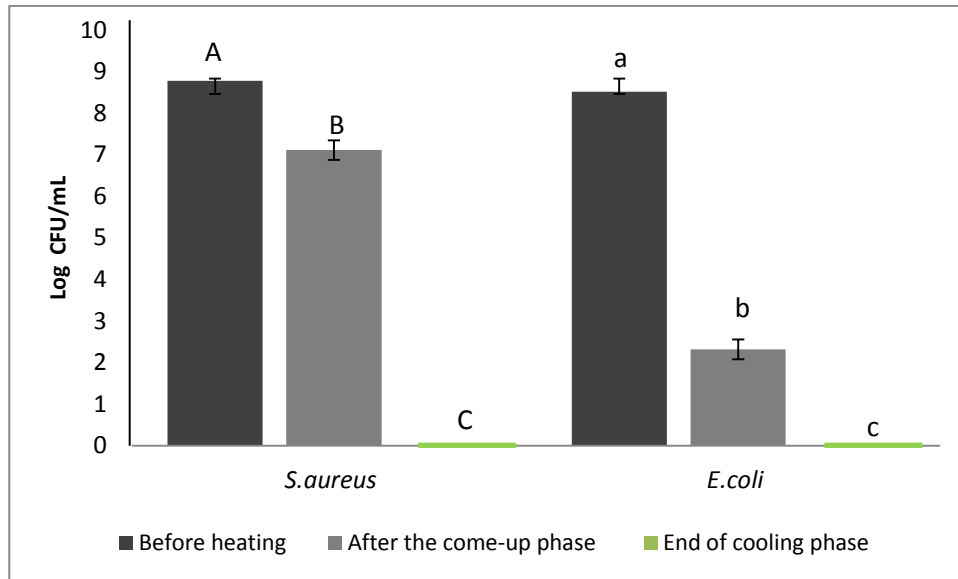


Figure 2: Number of viable cells (log CFU/ml) for samples analyzed before heating (prior to thermal treatment), after the come-up period and after cooling during pasteurization by OH. The results are averaged of three independent experiments. Means with equal letters are significantly similar ($p > 0.05$).

Degradation of nutritional compounds

After addressing the safety concern for a pasteurized product, attention was given to the product quality changes. In designing a thermal process, conditions that promote minimal loss of desired food quality should be used (Peng et al., 2015). In this context, it is important the evaluation of the stability of thermo labile compounds. In a previous study, thermal kinetic data of quality parameters in infant formula were evaluated (Quadros et al., 2016b). No statistical differences between OH and CV heating treatments regarding vitamin C and proteins stability in infant formula were observed, indicating similar mechanisms of degradation during both heating processes (Quadros et al., 2016b).

The present study conducted analyses of vitamin C and protein content in human milk during pasteurization in order to evaluate the aforementioned study performed with infant formula. Table 2 shows the amount of vitamin C and protein before and after the thermal treatment by OH at 65°C. The amount of vitamin C in human milk samples before OH treatment was 1.61 ± 0.04 mg / 100 g of milk. After the heat treatment, the vitamin C content did not change with a retention of approximately 100%. This result is important, since vitamin C is used as a quality index because it is highly sensitive to degradation during processing and storage. It can be used as a valid criterion to predict changes in organoleptic properties and/or

nutritional components (Mercali and Sarkis, 2016). This result is in agreement with those found by Quadros et al. (2016b) who reported a rate constant of $0.030 \pm 0.008 \text{ min}^{-1}$ for vitamin C degradation at 65°C in infant formula. From the model proposed to describe vitamin C stability and F_p value of 5.76 min (calculated from the heating curve and kinetic parameters for vitamin C degradation in infant formula), a concentration of approximately 1.35 mg / 100 g would be expected. This value is close to the one found for human milk in the present study (1.66 mg/100 g). Other studies evaluating the effects of OH treatment on vitamin C content in other foods (acerola juice, blueberry pulp, strawberry products, fruit juices) also observed that the non-thermal effects of the electricity did not influence the degradation rates of ascorbic acid (Castro, Teixeira, Salengke, Sastry, & Vicente, 2004; Jaeschke, Marczak, & Mercali, 2016; Lima, Heskitt, Burianek, Nokes, & Sastry, 1999; Mercali, Gurak, Schmitz, & Marczak, 2015; Mercali, Schwartz, Marczak, Tessaro, & Sastry, 2014).

Table 2: Vitamin C and total protein content before and after pasteurization via OH at 65°C .

Nutricional compounds	Untreated sample	Pasteurized sample
Vitamin C (mg/100g)	1.61 ± 0.04^a	1.66 ± 0.03^a
Total protein (g/100g)	0.94 ± 0.01^a	0.58 ± 0.01^b

^a The results are averaged of three independent experiments. Means in the same line with equal letters are significantly similar ($p > 0.05$).

Loss of vitamin C in pasteurized donor milk is an important public health problem, since babies just get this vitamin through the donor milk. Vitamin C, which often is subject to oxidative stress, is an important antioxidant for newborns (Gitto, D'Angelo, Cusumano, & Reiter, 2012; Matos, et al., 2015; Mutinati, Pantaleo, Roncetti, Piccinno, Rizzo, & Sciorsci, 2014; Sandal, Uras, Gokmen, Oguz, Erdeve, & Dilmen, 2013). Moreover, vitamin C facilitates the absorption of iron and acts in the metabolism of tyrosine, preventing opportunistic infection (Klein, 2002). Breast milk (directly from mother to child) provides the recommended amount of vitamin C to the newborn (Soares, Pereira-da-Silva, Cardoso, & Castro, 2015), but the treatment process that human milk suffers in human milk banks end up reducing the content of this vitamin. These losses occur with long term storage and freeze-thaw cycles, steps of pasteurization and even during the process of feeding (Ballard & Morrow, 2013; Heiman & Schanler, 2006; Moltó-Puigmartí, et al., 2011; Peila, Coscia, et al., 2016; Romeu-Nadal, et al., 2008; Van Zoeren-Grobbe, Schrijver, Van den Berg, & Berger,

1987). For these reasons, supplementation of vitamin C is suggested to compensate losses due to processing that occurs in Human Milk Banks (pasteurization 62.5 ° C for 30 min) (Klein, 2002; Peila, Coscia, et al., 2016).

As can be seen in Table 2, the initial amount of proteins in the human milk samples before OH pasteurization was 0.94 ± 0.01 g / 100g milk; after pasteurization, the amount was 0.58 ± 0.01 g / 100 g (reduction of approximately 35%). There was a significant reduction ($p < 0.05$) of the protein content after the OH treatment. This result differs from those found by Quadros et al. (2016b), in which no changes in protein content in infant formula treated by OH at 65°C was observed. This difference may be due to distinct protein compositions of the human milk and the infant formula. Human milk has hundreds of thousands of different protein bioactive molecules that act as protection against various infections and inflammations, contributing to immune maturation, development agencies and healthy microbial colonization (Ballard, et al., 2013; Greer, 2011; Guimarães, Guedes, Rocha, Tome, & Albino-Teixeira, 2012; Tyler & J McKiernan, 2006). However, many of these protein bioactive molecules are degraded by processing (heating, freezing, thawing) in Human Milk Banks, reducing their bioactivity (Ballard, et al., 2013; Baro, et al., 2011; Ewaschuk, et al., 2011; Israel-Ballard, et al., 2007). Therefore, this higher degradation found in this study may be due to the presence of several bioactive proteins compounds in the human donor milk, which are sensitive to heat treatment, especially immunoglobulins and bioactive peptides. Several studies indicate that many milk proteins are degraded by heat treatment and freeze-thaw cycles, which reduces their bioactivity and functionality (Ballard, et al., 2013; Baro, et al., 2011; Ewaschuk, et al., 2011; Gidrewicz & Fenton, 2014; Peila, Moro, et al., 2016).

4.3.4. Conclusion

The present study was conducted to evaluate a prior work conducted with infant formula. For this, a pasteurization process was designed and applied to human donor milk samples based on kinetic results obtained for infant formula. The results obtained confirm the efficiency of OH technology as heat treatment for microbial inactivation and vitamin C preservation in human milk. However, significant degradation in total protein occurred. This reduction was not observed for infant formula. The different stability behavior may be explained by presence of bioactive proteins compounds in human milk that are sensitive to heat. These proteins are not found in infant formula, which contributes for the lower degradation rate found for this product during thermal treatment. For a better understanding,

studies evaluating the amino acids profile are necessary. Moreover, further studies are needed to elucidate the effects of OH technology on other compounds and microorganisms in human milk in order to guarantee its nutritional and microbiological safety.

References

- An, H. J., & King, J. M. (2007). Thermal Characteristics of Ohmically Heated Rice Starch and Rice Flours. *Journal of Food Science*, 72(1), C084-C088.
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
- Baro, C. G., M, Arslanoglu, S., Giuffrida, M., Dellavalle, G., Conti, A., & Moro, G. (2011). Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 33, 818-829.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2008). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. In. Brasília, DF: Author.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. (2015). Saúde da criança : aleitamento materno e alimentação complementar. In (2. ed ed.). Brasília: Author.
- Castro, I., Teixeira, J. A., Salengke, S., Sastry, S. K., & Vicente, A. A. (2004). Ohmic heating of strawberry products: electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 27-36.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 30-39.
- Chen, C., Abdelrahim, K., & Beckerich, I. (2010). Sensitivity analysis of continuous ohmic heating process for multiphase foods. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 257-265.
- Christen, L., Lai, C. T., Hartmann, B., Hartmann, P. E., & Geddes, D. T. (2013). Ultraviolet-C Irradiation: A Novel Pasteurization Method for Donor Human Milk. *PLoS ONE*, 8(6), e68120.
- Civardi, E., Garofoli, F., Tzialla, C., Paolillo, P., Bollani, L., & Stronati, M. (2013). Microorganisms in human milk: lights and shadows. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(sup2), 30-34.

- Ewaschuk, J. B., Unger, S., O'Connor, D. L., Stone, D., Harvey, S., Clandinin, M. T., & Field, C. J. (2011). Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *Journal of perinatology* 3131(9), 593-598.
- FDA. (2000a). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: Ohmic and inductive heating. In. Silver Spring, MD: Author.
- FDA. (2000b). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: Ohmic and inductive heating. In (Vol. 2010): Department of Health and Human Services.
- Fellows, P. J. (2009). Pasteurization. In *Food Processing Technology* (Third ed., pp. 11-95): Woodhead Publishing.
- Fellows, P. J. (2009). Pasteurization *Food Processing Technology* In *Food Processing Technology: principles and practice* (3tr ed ed.). New York: Woodhead Publishing.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 1-10.
- Forsythe, S. J. (2007). *The Microbiology of Safe Food*: Blackwell Science Ltd.
- Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos* (2. ed. ed.). Porto Alegre: ArtMed.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209.
- Gidrewicz, D. A., & Fenton, T. R. (2014). A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC pediatrics*, 14, 216.
- Giribaldi, M., Coscia, A., Peila, C., Antoniazzi, S., Lamberti, C., Ortoffi, M., Moro, G., Bertino, E., Civera, T., & Cavallarin, L. (2016). Pasteurization of human milk by a benchtop High-Temperature Short-Time device. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* Innovative Food Science & Emerging Technologies, 3636, 228-233.
- Gitto, E., D'Angelo, G., Cusumano, E., & Reiter, R. (2012). Oxidative stress of newborn In Ö. E. Özdemir (Ed.), *Complementary Pediatrics* (pp. 1-25). Rijeka: Tech Books.

- Greer, F. R. (2011). Update on Nutritional Recommendations for the Pediatric Patient. *Advances in Pediatrics* *Advances in Pediatrics*, 58(1), 27-39.
- Guimarães, H., Guedes, M. B., Rocha, G., Tome, T., & Albino-Teixeira, A. (2012). Vitamin A in Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia. *Current pharmaceutical design*, 18(21), 3101-3113.
- Hakansson, A. P. (2015). Protective effects of human milk antimicrobial peptides against bacterial infection. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 4-5.
- Heiman, H., & Schanler, R. J. (2006). Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. *Early Human Development* *Early Human Development*, 82(12), 781-787.
- Icier, F. (2012). Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. In *Ohmic heating of fluid foods* *Ohmic heating of fluid foods* (pp. 305-367). San Diego: Academic Press.
- Ikonen, R. S., Miettinen, A., & Grönroos, P. (1982). Bacteriological Quality Control in a Human Milk Bank*. *Klin Padiatr*, 194(05), 295-297.
- Imai, T., Uemura, K., Ishida, N., Yoshizaki, S., & Noguchi, A. (1995). Ohmic heating of Japanese white radish *Rhaphanus sativus* L. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(4), 461-472.
- Israel-Ballard, K., Donovan, R., Chantry, C., Coutsoydis, A., Sheppard, H., Sibeko, L., & Abrams, B. (2007). Flash-heat inactivation of HIV-1 in human milk: a potential method to reduce postnatal transmission in developing countries. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45(3), 318-323.
- Jaeger, H., Roth, A., Toepfl, S., Holzhauser, T., Engel, K.-H., Knorr, D., Vogel, R. F., Bandick, N., Kulling, S., Heinz, V., & Steinberg, P. (2016). Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. *Trends in Food Science & Technology* *Trends in Food Science & Technology*, 55(5), 84-97.
- Jaeschke, D. P., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2016). Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. *Food Chemistry* *Food Chemistry*, 199(1), 128-134.

- Kayiran, P. G., Can, F., Kayiran, S. M., Ergonul, O., & Gürakan, B. (2014). Transmission of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* to a preterm infant through breast milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2727(5), 527-529.
- Keim, S. A., Hogan, J. S., McNamara, K. A., Gudimetla, V., Dillon, C. E., Kwiek, J. J., & Geraghty, S. R. (2013). Microbial Contamination of Human Milk Purchased Via the Internet. *Pediatrics*.
- Kim, S. S., & Kang, D. H. (2015). Effect of milk fat content on the performance of ohmic heating for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 475-486.
- Klein, C. (2002). Nutrient requirements for preterm infant formulas. *The Journal of nutrition*, 132((6)), 1395S-1577S.
- Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A. A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(9), 436-441.
- Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Vicente, M. O. S., Augusto, A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating : A review. *Trends in Food Science & Technology**Trends in Food Science & Technology*, 2121(9), 436-441.
- Lahou, E., Wang, X., De Boeck, E., Verguldt, E., Geeraerd, A., Devlieghere, F., & Uyttendaele, M. (2015). Effectiveness of inactivation of foodborne pathogens during simulated home pan frying of steak, hamburger or meat strips. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 118-129.
- Lee, S. Y., Sagong, H. G., Ryu, S., & Kang, D. H. (2012). Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 723-731.
- Lima, M., Heskitt, B. F., Buriánek, L. L., Nokes, S. E., & Sastry, S. K. (1999). Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. *Journal of Food Processing and Preservation**Journal of Food Processing and Preservation*, 2323(5), 421-443.

- Loghavi, L., Sastry, S. K., & Yousef, A. E. (2008). Effect of Moderate Electric Field Frequency on Growth Kinetics and Metabolic Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, 24(1), 148-153.
- Loghavi, L., Sastry, S. K., & Yousef, A. E. (2009). Effect of moderate electric field frequency and growth stage on the cell membrane permeability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, 25(1), 85-94.
- Matos, C., Ribeiro, M., & Guerra, A. (2015). Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. *Journal of Applied Biomedicine* *Journal of Applied Biomedicine*, 1313(3), 169-180.
- Menon, G., & Williams, T. C. (2013). Human milk for preterm infants: why, what, when and how? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 98(6), F559-F562.
- Mercali, G. D., Gurak, P. D., Schmitz, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation during ohmic heating of jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*) juice. *Food Chemistry* *Food Chemistry*, 171171, 200-205.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2012a). Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 91-95.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2012b). Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* *LWT - Food Science and Technology*, 4747(1), 91-95.
- Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014). Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering* *Journal of Food Engineering*, 123123, 1-7.
- Mesías, M., Wagner, M., George, S., & Morales, F. J. (2016a). Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3434, 24-28.

- Mesías, M., Wagner, M., George, S., & Morales, F. J. (2016b). Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 24-28.
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2011). Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124(3), 697-702.
- Moro, G. E., & Arslanoglu, S. (2012a). Heat Treatment of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(2), 165-166.
- Moro, G. E., & Arslanoglu, S. (2012b). Heat Treatment of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(2), 165-166.
- Mutinati, M., Pantaleo, M., Roncetti, M., Piccinno, M., Rizzo, A., & Sciorsci, R. L. (2014). Oxidative stress in neonatology: a review. *Reproduction in domestic animals*, 49(1), 7-16.
- Nakamura, K., Kaneko, M., Abe, Y., Yamamoto, N., Mori, H., Yoshida, A., Ohashi, K., Miura, S., Yang, T. T., Momoi, N., & Kanemitsu, K. (2016). Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* transmitted through breast milk sharing in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 92(1), 42-46.
- O'Connor, D. L., Ewaschuk, J. B., & Unger, S. (2015). Human milk pasteurization: benefits and risks. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18(3), 269-275.
- Palaniappan, S., Sastry, S. K., & Richter, E. R. (1992). Effects of electroconductive heat treatment and electrical pretreatment on thermal death kinetics of selected microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(2), 225-232.
- Park, I.-K., & Kang, D.-H. (2013). Effect of Electropermeabilization by Ohmic Heating for Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Buffered Peptone Water and Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7122-7129.
- Park, I. K., & Kang, D. H. (2013). Effect of electropermeabilization by ohmic heating for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium,

- and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7122-7129.
- Peila, C., Coscia, A., Bertino, E., Cavaletto, M., Spertino, S., Icardi, S., Tortone, C., Visser, G. H. A., & Gazzolo, D. (2016). Effects of Holder pasteurization on the protein profile of human milk. *Italian Journal of Pediatrics*, 42(1), 36.
- Peila, C., Moro, G., Bertino, E., Cavallarín, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F., & Coscia, A. (2016). The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients*, 8(8), pii: E477.
- Pereira, R., Martins, J., Mateus, C., Teixeira, J., & Vicente, A. (2007). Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. *Chemical Papers*, 61(2), 121-126.
- Pereira, R., Martins, J., Mateus, C., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2007). Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. *Chemical Papers*, 61(2), 121-126.
- Perrin, M. T., Fogleman, A. D., Newburg, D. S., & Allen, J. C. (2016). A longitudinal study of human milk composition in the second year postpartum: implications for human milk banking. *Maternal & Child Nutrition*, n/a-n/a.
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A. I., Gayà, A., & López-Sabater, M. C. (2008). Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chemistry*, 107(1), 434-438.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2006). Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *Journal of Chromatography B*, 830(1), 41-46.
- Roux, S., Courel, M., Birlouez-Aragon, I., Municino, F., Massa, M., & Pain, J.-P. (2016). Comparative thermal impact of two UHT technologies, continuous ohmic heating and direct steam injection, on the nutritional properties of liquid infant formula. *Journal of Food Engineering*, 179, 36-43.
- Sandal, G., Uras, N., Gokmen, T., Oguz, S. S., Erdeve, O., & Dilmen, U. (2013). Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(5), 540-543.

- Serafini, Á. B., André, M. C. D., Rodrigues, M. A., Kipnis, A., Carvalho, C. O., Campos, M. R. H., & Jubé, T. F. (2003). Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. *Revista de Saúde Pública*, 37(6), 775-779.
- Smelt, J. P. P. M., & Brul, S. (2014). Thermal Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), 1371-1385.
- Soares, E., Pereira-da-Silva, L., Cardoso, M., & Castro, M. J. (2015). Vitaminas, Minerais e Oligoelementos por Via Entérica no Recém-Nascido. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 46(2), 159-169.
- Sun, H., Kawamura, S., Himoto, J.-i., Itoh, K., Wada, a., & Kimura, T. (2008). Effects of Ohmic Heating on Microbial Counts and Denaturation of Proteins in Milk. *Food Science Technology Research*, 14(2), 117-123.
- Sun, H., Kawamura, S., Himoto, J.-i., Itoh, K., Wada, T., & Kimura, T. (2008). Effects of Ohmic Heating on Microbial Counts and Denaturation of Proteins in Milk. *Food Science and Technology Research*, 14(2), 117-123.
- Tyler, W., & McKiernan, P. (2006). Prolonged jaundice in the preterm infant—What to do, when and why. *Current Paediatrics*, 16(1), 43-50.
- Van Zoeren-Grobbe, D., Schrijver, J., Van den Berg, H., & Berger, H. M. (1987). Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Archives of Disease in Childhood*, 62(2), 161-165.
- Velliou, E. G., Van Derlinden, E., Cappuyns, A. M., Nikolaidou, E., Geeraerd, A. H., Devlieghere, F., & Van Impe, J. F. (2011). Towards the quantification of the effect of acid treatment on the heat tolerance of *Escherichia coli* K12 at lethal temperatures. *Food Microbiology*, 28(4), 702-711.
- Vieira, A. A., Soares, F. V. M., Pimenta, H. P., Abranches, A. D., & Moreira, M. E. L. (2011). Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*, 87(8), 577-580.
- Windyga, B., Rutkowska, M., Sokołowska, B., Skąpska, S., Wesołowska, A., Wilińska, M., Fonberg-Broczek, M., & Rzoska, S. J. (2015a). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and native microflora in human milk by high pressure processing. *High Pressure Research*, 35(2), 181-188.

- Windyga, B., Rutkowska, M., Sokołowska, B., Skąpska, S., Wesółowska, A., Wilińska, M., Fonberg-Broczek, M., & Rzoska, S. J. (2015b). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and native microflora in human milk by high pressure processing. *High Pressure Research*, 35(2), 181-188.
- World Health Organization. (2015). *Health Topics, Breastfeeding*. In.
- Zaidi, A. K. M., Thaver, D., Ali, S. A., & Khan, T. A. (2009). Pathogens Associated With Sepsis in Newborns and Young Infants in Developing Countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(1), S10-S18.

4.4 ARTIGO CIENTÍFICO 4

Efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano: Uma Revisão

Artigo científico submetido à revista *Alimentação Humana*

Resumo

O leite materno é a primeira escolha para alimentação do recém-nascido. Porém, quando o leite da própria mãe não está disponível, o leite de uma doadora é uma alternativa valiosa. Para tanto, este leite precisa obrigatoriamente passar pelo processo de pasteurização, que consiste, geralmente, em um tratamento térmico a 62,5 °C, por 30 minutos, o qual tem como objetivo garantir a segurança microbiológica do leite doado. Contudo, este processo ao qual o leite é submetido pode resultar em significativas perdas à sua qualidade nutricional, afetando principalmente as proteínas bioativas. Por este motivo, diversos estudos têm investigado o uso de novas tecnologias alternativas para o tratamento do leite humano doado, a fim de se obter um tratamento menos agressivo à composição nutricional. Com base nisso, a presente revisão tem como objetivo descrever os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano. Esta revisão foi realizada através de pesquisa em base de dados (*Science Direct* e *Embase*), obtendo-se um total de 19 estudos. Esses estudos indicam que a pasteurização convencional, que tradicionalmente é utilizada nos Bancos de Leite Humano, afeta negativamente a composição de proteínas bioativas, principalmente as imunoglobulinas, lactoferrina e lisozimas. Dentre as tecnologias emergentes, o processo de alta pressão e a radiação ultravioleta apresentaram os melhores resultados quando comparados com o método tradicional. Não foram encontrados estudos que envolvessem o aquecimento ôhmico e proteínas bioativas em leite humano. No geral, os dados levam à conclusão de que a pasteurização convencional afeta a composição de proteínas bioativas e que as tecnologias emergentes são alternativas viáveis para a pasteurização do leite humano por apresentarem menores degradações de compostos nutricionais.

4.1 Introdução

O leite humano é considerado um alimento completo para a nutrição de um recém-nascido (RN), pois sua composição, além de nutrir, confere ao organismo resistência a diversas doenças infecciosas e alérgicas (Brasil, 2010; Fox, 2008). Este efeito protetor é, em grande parte, conferido pelas diversas proteínas bioativas presentes naturalmente no leite humano, que atuam diretamente no sistema imunológico, contribuindo decisivamente na defesa do organismo, durante os primeiros dois anos de vida (Donovan, 2016; Legrand, 2016; Wada & Lönnerdal, 2014).

A digestão dessas proteínas bioativas gera derivados proteicos denominados peptídeos bioativos. Dentre as proteínas que apresentam tal efeito, destaca-se a importância das imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas, que desempenham papel importante no amadurecimento do sistema imunológico das crianças. A bioatividade exercida por estas proteínas incluem o aumento da absorção de minerais, imunomodulação, ação anti-hipertensiva e atividades antimicrobianas (Donovan, 2016; Legrand, 2016; Bo Lönnerdal, 2016; Wada & Lönnerdal, 2014).

Apesar de o leite materno representar a primeira e melhor escolha para alimentação do recém-nascido (Eidelman et al., 2012), o leite da própria mãe pode não estar disponível. Nesses casos, utilizar o leite de uma doadora é a alternativa mais adequada (Perrin, Fogleman, Newburg, & Allen, 2013). Os Bancos de Leite Humano (BLH) são os centros responsáveis pela coleta, tratamento e distribuição deste leite humano doado. Nesses centros, o leite humano doado é submetido à pasteurização, que consiste em um tratamento térmico a 62,5 °C, por 30 minutos. Este processo é recomendado por todas as diretrizes internacionais para Bancos de Leite Humano, que têm como objetivo garantir a segurança microbiológica do leite doado, uma vez que inativa agentes virais e bactérias patogênicas (Brasil, 2010; Fox, 2008).

Apesar do benefício da inativação microbiológica, o processo de pasteurização pode provocar significativas perdas a sua qualidade nutricional do leite, afetando principalmente as proteínas bioativas. Por este motivo, diversos estudos têm investigado tecnologias alternativas e emergentes para o tratamento do leite humano doado, a fim de se obter um tratamento menos agressivo à composição nutricional. Com base nisso, a presente revisão tem como objetivo descrever os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano.

4.2 Metodologia

Foi realizada uma pesquisa exploratória do tipo revisão bibliográfica, a qual buscou responder a seguinte questão norteadora: quais as evidências dos efeitos de tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano?

A revisão da literatura foi efetuada nas bases de dados *Science Direct* e Embase, contemplando publicações dos últimos dez anos. Foi realizado o cruzamento com os termos indexados ou palavras-chave conforme segue: “(Human Milk AND Donor milk AND protein bioactives), (Human Milk AND immunoglobulin AND treatment heating), (Human Milk AND lactoferrin AND lysozyme AND treatment heating) e (Human Milk AND Pasteurization AND Processing)”. A pesquisa limitou-se a estudos do tipo experimental, nos idiomas inglês e português.

Os critérios de inclusão para a revisão bibliográfica foram estudos que avaliassem os efeitos da pasteurização por tecnologia convencional (62,5 °C por 30 minutos) ou emergente sobre o teor de imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas presentes no leite humano. Os critérios de exclusão descartaram artigos repetidos e aqueles que não estavam alinhados ao objetivo proposto pelo presente estudo. Além disso, foram consultadas as referências dos artigos selecionados com o objetivo de identificar outras publicações importantes acerca do tema.

Os dados foram analisados de acordo com a metodologia proposta por Gil, A.C (2002), através de quatro leituras: exploratória, seletiva, analítica e interpretativa. Pela leitura exploratória foi analisado se a obra consultada interessava à pesquisa. A leitura seletiva foi baseada na seleção do material que de fato interessava a pesquisa de acordo com os objetivos do trabalho. A leitura analítica teve como finalidade ordenar as informações e verificar se as mesmas estavam de acordo com os propósitos da pesquisa, consistindo na leitura integral do artigo selecionado para verificação geral do conteúdo, identificação, hierarquização e sintetização das ideias. Por fim, foi realizada a leitura interpretativa, a última etapa do processo de leitura das fontes bibliográficas, relacionando o que cada autor afirmou com as questões propostas neste estudo, sendo os achados organizados em unidades de conteúdo.

4.3 Resultados e discussão

O leite humano, além de apresentar um teor proteico importante para o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido, apresenta uma composição diversa de proteínas bioativas, com destaque para as imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas, encontradas em altas

concentrações e que podem se degradar significativamente com o tratamento térmico, diminuindo sua concentração e conseqüentemente sua funcionalidade (Peila et al., 2016).

Um total de 121 artigos foi encontrado a partir de uma combinação das pesquisas, mas apenas 19 preencheram todos os critérios de inclusão. A tabela 1 resume os detalhes técnicos sobre os aspectos metodológicos e uma visão geral da literatura sobre os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes sobre o conteúdo de proteínas bioativas do leite humano.

Tabela 1: Resumo e detalhes técnicos sobre os aspectos metodológicos e visão geral da literatura sobre os efeitos de tecnologias convencionais e emergentes sobre o conteúdo de proteínas bioativas do leite humano.

Condições de Tratamento	Efeitos do processamento no Teor de proteínas bioativas	Referências
Pasteurização		Oliveira et al., 2016a.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Proteólise da lactoferrina aumentando a biodisponibilidade	
Pasteurização		Oliveira et al., 2016b.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Proteólise da lactoferrina aumentando a biodisponibilidade	
Pasteurização		Czank et al., 2009.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Redução de 28% de IgA Redução de 78% de lactoferrina Redução de 60 % de lisozima	
Pasteurização		Espinosa-Martos et al., 2013.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Redução de 50% IgA Redução de 37% IgM Redução não declarada de IgG	
Pasteurização		Koenig, et al., 2005.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Redução de 49% de IgA Redução de 23 % de IgM Redução de 100% de IgG	

Pasteurização		Chang et al., 2013.
LTLT a 40 por 30 min	Não apresentou redução de IgA e Lactoferrina	
LTLT a 60°C por 30 min	Não apresentou redução de IgA e Lactoferrina	
Pasteurização		Baro et al., 2010.
LTLT 62,5°C por 30 min	Não apresentou redução no perfil de proteínas bioativas	
HTST a 72°C por 15 s	Apresentou retenção no perfil de proteínas bioativas	
Pasteurização		Giribaldi et al., 2016.
HTST a 72°C por 15 segundos	Retenção do conteúdo IgAs secretora Retenção da atividade de lisozima por Sais Biliares	
Pasteurização		Braga, L. P., & Palhares, D. B. 2007.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Redução de 64% de IgA	
Evaporação	Redução de 45% de IgA	
Pasteurização		Sousa et al., 2014.
LTLT a 62,5°C por 30 min	Redução de 20% de IgA Redução de 51% de IgM Redução de 23% de IgG	

Alta Pressão

200 Mpa a 2,5, 15 e 30 min	Não apresentou redução
400 Mpa a 2,5 min	Redução não significativa de IgA Redução de 21 % de IgM Redução de 21 % de IgG
600 Mpa a 15 e 30 min	Perdas semelhantes aos da pasteurização

Pasteurização

Contador et al., 2013.

LTLT a 62,5°C por 30 min	Redução de 50 a 60 % de IgA e IgM
--------------------------	-----------------------------------

Alta pressão

400 MPa a 20°C por 3 minutos	Não apresentou redução
600 Mpa a 25°C por 6 minutos	Redução de 50 a 60 % de IgA e IgM

Pasteurização

Permanyer et al., 2010.

LTLT a 62,5 °C durante 30 min	Redução de 28% de IgA
-------------------------------	-----------------------

Alta pressão por 5 min a 12 ° C

HPP 400 Mpa	Retenção de 100% de IgA
HPP 500 Mpa	Redução de 12,1% de IgA
HPP 600 Mpa	Redução de 30,7% de IgA

Alta Pressão Térmica por 1 min

Delgado et al., 2013.

HPT 300 MPa e 50°C

Redução de 25 % de IgM

Redução de 52 % de IgA

Retenção de 100% de IgG

HPT 600 e 900 MPa

Redução nos teores de
imunoglobulinas

Pasteurização

Mayayo et al., 2016.

LTLT a 65 °C por 30 min

Redução de 57 % de IgA

HTST a 72 °C por 15 s

Redução de 57 % de IgA

HTST a 80 e 90 °C por 15 s

Redução de 78% de IgA

Alta Pressão por 30 min

300 Mpa

Redução de 20% de IgA

400 Mpa

Redução de 42% de IgA

500 Mpa

Redução de 53% de IgA

600 Mpa

Redução de 64 % de IgA

Pasteurização

Mayayo et al., 2014.

LTLT a 65 °C por 30 min

Redução de 80% de Lactoferrina

Alta pressão por 15 min

300 Mpa

Redução de 9% de Lactoferrina

400 Mpa	Redução de 23% de Lactoferrina	
500 Mpa	Redução de 34% de Lactoferrina	
600 MPa	Redução de 48% de Lactoferrina	
Pasteurização		Martysiak-Żurowska et al., 2016.
LTLT 62,5 °C por 30 min	Redução de 47% de Lisozima	
Radiação		
UV-C – 9,1 W/m ² (tempos 5, 10, 20, 30, 40 min)	Redução de 40% de Lisozima	
Pasteurização		Silvestre et al., 2008.
LTLT a 63 °C por 30 min	Redução de 52 % da atividade bactericida	
Esterilização		
HTST a 75 °C por 15 s	Redução de 36 % da atividade bactericida	
Pasteurização		Viazis et al., 2007.
LTLT a 62,5 °C por 30 min	Redução de 48,8 % de IgA	
	Redução de 39,5 % de Lisozima	
Alta pressão em 400 MPa		
30 min	Redução de 15 % de IgA	
60 min	Redução de 12,9 % de IgA	
90 min	Redução de 19,4 % de IgA	
120 min	Redução de 24,6 % de IgA	
30 min	Retenção de 100 % de Lisozima	

60 min	Redução de 3,7 % de Lisozima
90 min	Redução de 3,7% de Lisozima
120 min	Redução de 4,2% de Lisozima

LTLT (*low-temperature, long-time*, ou seja, temperatura baixa, tempo longo);

HTST (*high-temperature, short-time*, alta temperatura e tempo curto);

UV-C (Radiação Ultravioleta);

IgA (Imunoglobulina A);

IgM (Imunoglobulina M);

4.3.1 Efeitos das tecnologias convencionais no teor de proteínas bioativas

As proteínas bioativas presentes no leite humano são objetos de estudos por vários pesquisadores (Baro et al., 2011; Braga & Palhares, 2007; Chang et al., 2013; Christen, Lai, Hartmann, Hartmann, & Geddes, 2013; Contador, Delgado-Adámez, Delgado, Cava, & Ramírez, 2013; Czank, Prime, Hartmann, Simmer, & Hartmann, 2009; Delgado et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013; Giribaldi et al., 2016; Koenig, Diniz, Barbosa, & Vaz, 2005; Martysiak-Żurowska et al., 2016; C. Mayayo et al., 2014; C Mayayo et al., 2016; Oliveira, Bourlieu, et al., 2016; Oliveira, Deglaire, et al., 2016; Permanyer et al., 2010; Silvestre, Ruiz, Martínez-Costa, Plaza, & López, 2008; Sousa, Delgadillo, & Saraiva, 2014; Viazis, Farkas, & Allen, 2007). A pasteurização a que o leite humano é submetido nos Bancos de Leite é um tratamento que utiliza baixa temperatura por tempo prolongado (62,5 °C por 30 min), processo conhecido por LTLT (do inglês, *low tempersture, long time*). Esse processo é obrigatório para garantir a segurança microbiológica do leite doado (Sousa et al., 2014). Contudo, a aplicação e calor por tempos prolongados podem resultar em perdas no valor nutricional, principalmente quanto ao conteúdo de proteínas bioativas (imunoglobulinas, lactoferrina e lisozimas) (C Mayayo et al., 2016; Peila et al., 2016; Sousa et al., 2014).

Imunoglobulinas

A principal classe de imunoglobulinas de leite humano é IgA, que representa mais de 90% das imunoglobulinas totais. Elas estão presentes na forma secretora (sIgA), que consiste em dois monómeros de IgA ligadas por uma cadeia peptídica unida a um componente secretor. A IgA é a primeira linha de defesa do organismo infantil (Zinkernagel 2001) e tem a capacidade de promover a eliminação de micro-organismos patogênicos e antigênicos a partir

do lúmen intestinal. A concentração de IgA no leite humano é bastante elevada, sendo a principal responsável pela menor incidência de doenças gastrointestinais em recém-nascidos amamentados em comparação a bebês alimentados com fórmula láctea (Field, 2005). Por estes motivos, é imprescindível conhecer os efeitos da pasteurização convencional na preservação destas proteínas bioativas (C Mayayo et al., 2016).

O efeito da pasteurização convencional sobre o conteúdo de imunoglobulinas foi investigado por vários pesquisadores (Braga & Palhares, 2007; Chang et al., 2013; Christen et al., 2013; Contador et al., 2013; Czank et al., 2009; Espinosa-Martos et al., 2013; Giribaldi et al., 2016; Koenig et al., 2005; C Mayayo et al., 2016; Permanyer et al., 2010; Sousa et al., 2014), sendo que a classe mais investigada foi a IgA, que, em quase todos os estudos, apresentou redução que variou de 20 a 64% após a pasteurização convencional. A variação na redução pode estar associada a diversos fatores, tais como o tempo para atingir a temperatura de aquecimento, o volume de amostra processada e a metodologia de quantificação (C Mayayo et al., 2016).

A maior redução foi observada no estudo conduzido por Braga et al., (2007), que reportaram uma redução de 64% no teor de IgA após a pasteurização. Este mesmo estudo avaliou o efeito da evaporação do leite sobre o teor de IgA, que também apresentou redução de 45%. Mayayo et al. (2016) também relataram elevada redução no teor de IgA, de 57%, após a pasteurização LTLT (62,5 °C por 30 min) e HTST (72°C por 15s). Este mesmo estudo avaliou a degradação na pasteurização HTST com temperaturas mais elevadas (80 e 90°C por 15 s) e obteve reduções acima de 78%. Este estudo ressaltou que, em temperaturas elevadas (acima de 65°C), a concentração de IgA diminuiu significativamente ao longo do tempo de tratamento. Outros estudos apresentaram reduções em torno de 50% após a pasteurização e concluíram que a mesma modificou o perfil imunológico do leite humano (Christen et al., 2013; Contador et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013); (Koenig et al., 2005).

As outras classes de imunoglobulinas foram investigadas em um menor número de estudos (Contador et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013; Koenig et al., 2005; Sousa et al., 2014), cujos resultados apresentaram altos níveis de degradação, que variou de 21 a 60%.

Os resultados obtidos nos estudos indicam claramente que a pasteurização influencia diretamente no conteúdo de imunoglobulinas, reduzindo sua disponibilidade.

Lactoferrinas

A lactoferrina é uma glicoproteína da família da transferrina que apresenta alta concentração no leite humano (B Lönnerdal & Atkinson, 1995). Dentre suas funções

fisiológicas, as ações antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora do trato gastrointestinal são as principais. A atuação na modulação da função imune é mediada principalmente pelo receptor intestinal de lactoferrina que apresenta uma estrutura relativamente resistente à digestão (Ochoa & Cleary, 2009; Peila et al., 2016).

Além do efeito imunomodulador, a lactoferrina é ligada ao ferro auxiliando na absorção de ferro presente no leite humano. Alguns estudos sugerem que pode haver um receptor específico para a lactoferrina no intestino delgado, facilitando a absorção de ferro pelo lactente (Ochoa & Cleary, 2009; Peila et al., 2016).

A lactoferrina tem sido investigada em vários estudos (Chang et al., 2013; Christen et al., 2013; Czank et al., 2009; Oliveira, Bourlieu, et al., 2016; Oliveira, Deglaire, et al., 2016; Peila et al., 2016), que relataram uma redução de 78 a 91% em sua concentração após a pasteurização. A maior redução (91%) ocorreu no estudo de Christen et al., (2013). Os autores indicaram que outras tecnologias para a pasteurização precisam ser exploradas com o objetivo de minimizar estas perdas, uma vez que estas proteínas são fundamentais para o bom desenvolvimento do recém-nascido. Lönnerdal (2003) sugeriu que a atividade bactericida da lactoferrina pode ser mantida por peptídeos que se formam durante o processo de digestão, e, por este motivo, é possível que parte da sua atividade se encontre ainda retida no leite humano pasteurizado, embora com a redução das proteínas. Ainda, um estudo recente observou que na pasteurização ocorre a proteólise da lactoferrina aumentando sua biodisponibilidade (Oliveira, Bourlieu, et al., 2016; Oliveira, Deglaire, et al., 2016). Outro estudo sugeriu um possível efeito de agregação da lactoferrina, e não degradação após a pasteurização, porém não foi evidenciado se essa agregação provoca diminuição da atividade bactericida (Mayayo et al., 2016). Estudos discutem ainda que a lactoferrina possui uma ação conjunta com a lisozima, potencializando os benefícios destas proteínas (C Mayayo et al., 2016; Peila et al., 2016; Sousa et al., 2014). Esta ação é discutida na próxima seção.

Lisozima

A lisozima, além de atuar em conjunto com a lactoferrina na eliminação de bactérias gram-negativas, pode eliminar de forma independente as bactérias gram-positivas via degradação por hidrólise de sua membrana externa. Além disso, ela se liga a endotoxinas aumentando a produção de IgA e contribuindo para a ativação de macrófagos (Sousa et al., 2014). A Lisozima, assim como a lactoferrina, exerce atividade antimicrobiana e imunomoduladora no intestino de crianças amamentadas (Sousa et al., 2014).

Igualmente a lactoferrina, a atividade da lisozima tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores (Chang et al., 2013; Christen et al., 2013; Czank et al., 2009; Giribaldi et al., 2016; Martysiak-Żurowska et al., 2016). Estes estudos relataram uma redução significativa dessa proteína após a pasteurização, entre de 47 a 60%. Peila et al. (2016) salientaram que o leite humano é composto por várias enzimas e fatores antimicrobianos. Segundo esses autores, o método *Micrococcus lysodeikticus*, amplamente utilizado para a determinação da atividade da lisozima, pode não discriminar se a redução dessa proteína após a pasteurização é apenas devido a uma diminuição na sua concentração ou se os outros componentes do leite estão envolvidos com esta redução. Isso se deve ao fato de o método ser baseado em ensaio turbimétrico, que mede o ponto de crescimento bacteriano através de adição de amostras contendo lisozima (Sousa et al., 2014; Viazis et al., 2007).

Giribaldi et al. (2016) observaram que ocorreu retenção da atividade da lisozima por sais biliares após a pasteurização, através da utilização de uma metodologia em que a atividade da lisozima muramidase específica foi medida pela quantificação da fluorescência obtida a partir de um marcador de *M. Lysodeikticus* nas paredes celulares. Este estudo discute que esta diferença na abordagem analítica pode explicar a discordância como outros dados da literatura e apontou a necessidade de ferramentas analíticas adequadas e uma correta interpretação dos resultados. Por outro lado, Chang et al. (2013) observaram um aumento significativo ($p < 0,016$) na atividade da lisozima após pasteurização. Contudo, o estudo foi conduzido com uma pasteurização utilizando uma menor temperatura (40 e 60°C por 30 min). O mesmo estudo concluiu que as proteínas biologicamente ativas do leite humano são mais suscetíveis a processos térmicos e que menores temperaturas podem promover uma maior retenção desses compostos. No entanto, é necessário avaliar em conjunto a segurança microbiológica do leite.

4.3.2 Efeitos das tecnologias emergentes no teor de proteínas bioativas

Imunoglobulinas

A alta pressão é uma tecnologia emergente não térmica que está sendo amplamente utilizada em alternativa aos tratamentos térmicos convencionais. Uma das grandes vantagens é a sua capacidade de produzir alimentos seguros e com características similares aos não processados, mantendo as características nutricionais e funcionais (Ramirez, Saraiva, Pérez Lamela, & Torres, 2009).

Sousa et al. (2014) investigaram e compararam os efeitos da alta pressão (200, 400 e 600 MPa por 2,5, 15 e 30 min, a 8 °C) e da pasteurização convencional sobre os conteúdos totais de imunoglobulinas do colostro humano. Os autores observaram que a alta pressão a 200 e 400 MPa por 2,5, 15 e 30 min não alteraram os teores das imunoglobulinas. Para IgA, a alta pressão, aplicada a 600 MPa por 2,5 min, também não causou diferenças significativas quando comparada as concentrações no colostro cru. Porém, o processamento a 600 MPa por 15 e 30 min e a pasteurização convencional reduziram de maneira significativa as concentrações de IgA, IgM e IgG em 20, 51 e 23%, respectivamente.

Contador et al. (2013) também aplicaram a tecnologia de alta pressão, 400 MPa por 3 ou 6 min, observando a manutenção dos níveis originais de imunoglobulinas (A, M e G). Os autores afirmam que uma pressão maior (600 MPa) não deve ser aplicada para a preservação destes compostos pois observaram perdas de até 60% nestas condições.

Essa tecnologia não térmica modifica a estrutura e as propriedades funcionais das macromoléculas alimentares, como proteínas, sem afetar o valor nutricional. Além disso, segundo Trujillo et al., (2007) a alta pressão foi efetiva na inativação microbiológica em leite bovino.

Permanyer et al. (2010) também investigaram a influência de tratamentos com alta pressão no conteúdo de IgA, porém a um tempo mais curto de processamento: 5 minutos. O processamento a 400 MPa não produziu mudanças no IgA do soro de leite humano concentrado, enquanto que a 500 e 600 Mpa, a retenção foi de 87,93 e 69,1%, respectivamente. Os autores afirmam que a perda de imunoglobulinas observada em leite humano ou de outros mamíferos pode ser influenciada pelo tempo e pressão empregados, que podem envolver ainda o uso de alta temperatura, como é o caso da alta pressão térmica.

A alta pressão térmica é outra tecnologia emergente que envolve a aplicação de alta pressão (100–900 MPa) e calor (50–120 °C) por um tempo específico (Rastogi et al. 2008). De acordo com Delgado et al. (2013), a alta pressão térmica acelera a inativação enzimática, reduz o tempo de processamento a alta temperatura, diminui a severidade do processo em comparação ao tratamento térmico convencional e, conseqüentemente, melhora a qualidade final do alimento. Esses pesquisadores investigaram o impacto desta tecnologia na qualidade do leite humano, utilizando pressões de 300, 600 ou 900 MPa por 1 min a uma temperatura inicial de 50, 65 ou 80°C. As imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG) foram afetadas de forma significativa pelo aumento da pressão e da temperatura aplicadas. Apenas o tratamento a 300 MPa e 50 °C preservou o conteúdo original destes compostos. A IgM foi reduzida em aproximadamente 25%, a IgG não foi afetada pelo tratamento, e apenas 48% do conteúdo

original de IgA foi mantido. A retenção de IgA no tratamento mais brando (300 MPa a 50 °C por 1 min) foi similar a retenção após a pasteurização a 62,5 °C por 30 minutos aplicada por Viazis et al. (2007) (51%) e menor que a retenção observada por Permanyer et al. (2010) (72%), que aplicou o mesmo binômio de tempo e temperatura (62,5 °C por 30 minutos).

Viazis et al. (2007) aplicaram 400 MPa por tempos relativamente maiores: 30, 60, 90, e 120 minutos, resultando na retenção de 85,6, 87,1, 80,6, e 75,4% de IgA, respectivamente. Segundo os autores, a maior vantagem da alta pressão sobre a pasteurização é a obtenção de um produto com qualidade imunológica melhorada, mais rápido e provavelmente mais conveniente.

Mayayo et al. (2016) observaram reduções de 20, 42, 53 e 64 % de IgA quando aplicadas pressões de 300, 400, 500 e 600 MPa, respectivamente, por 30 min. Os autores atribuem as diferenças nos resultados obtidos, às diferenças de temperatura das amostras e no fluido de transmissão na câmara de pressão após a pressurização. Temperaturas de 8 °C, 10 °C e 12 °C foram indicadas por outros estudos (Permanyer et al., 2010; Sousa et al., 2014; Viazis et al., 2007), enquanto neste uma temperatura de 20 °C foi empregada. Sabe-se que a temperatura alcançada durante a aplicação de pressão é um parâmetro importante que influencia a taxa de desnaturação, bem como a pressão e temperatura que parecem exercer um efeito sinérgico na desnaturação de imunoglobulinas do leite humano (Delgado et al. (2013).

Contador et al. (2013) defendem o uso da tecnologia emergente a fim de melhorar a qualidade do leite de doadoras após comparar os efeitos da pasteurização convencional aos da alta pressão nas imunoglobulinas do leite humano. Os autores afirmam que a alta pressão é uma alternativa viável à pasteurização na melhoria da qualidade imunológica do leite humano por manter de forma adequada as imunoglobulinas.

Além da alta pressão, a radiação ultravioleta tem sido estudada como possível alternativa à pasteurização do leite humano. A radiação ultravioleta é um método não térmico conhecido por estender a *shelf life* de alimentos frescos. O espectro da radiação ultravioleta C (UV-C), entre comprimentos de onda de 250 e 270nm, é especialmente utilizado na indústria de alimentos e na medicina. Os efeitos bactericidas exercidos pela radiação UV-C envolvem sua absorção pelo DNA bacteriano e proteínas do citoplasma. Quando absorvida, rompe a transcrição e replicação do DNA que, em combinação com os danos fitoquímicos às proteínas citoplasmáticas, leva a perda das funções dos micro-organismos, acarretando a morte (Rongies et al., 2011).

Christen et al. (2013) investigaram o crescimento bacteriano e a concentração de proteínas bioativas de leite humano submetido à radiação UV-C e pasteurização. A retenção

de IgA após a radiação UV-C (4683 J.L^{-1}) foi de 89%, enquanto a pasteurização reteve 49%. Os autores observaram uma relação positiva linear entre lisozima e o total de sólidos. Uma alta concentração de sólidos pode promover efeito protetor contra a perda de lisozima. A radiação UV-C pode ser uma alternativa viável para diminuir os danos às proteínas quando comparada ao tratamento convencional que utiliza altas temperaturas.

Lactoferrinas

A lactoferrina é uma glicoproteína que apresenta atividade antimicrobiana no leite humano. Sua concentração no colostro é de cerca de 7 g.L^{-1} , mas diminui para menos de $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ no leite maduro. Essa alta concentração leva a crer que este composto é de grande importância no desenvolvimento de recém-nascidos. Diversas atividades biológicas têm sido propostas à lactoferrina, como atividade antibacteriana devido a sua habilidade de sequestrar ferro e impedir o uso deste pelos micro-organismos. Assim, pode alterar a integridade e viabilidade da bactéria (Ward, Paz, & Conneely, 2005).

Mayayo et al. ((2014) trataram o leite humano a 300, 400, 500 e 600 MPa por 30 min, resultando em uma retenção de 90, 75, 62 e 52% de lactoferrina, respectivamente. Por outro lado, o tratamento convencional de pasteurização (62,5 por 30 min), que é tradicionalmente aplicado ao leite humano, reteve apenas 20%. Portanto, aplicação de alta pressão fornece um leite seguro do ponto de vista microbiológico com a vantagem da maior retenção de proteínas bioativas em comparação ao tratamento térmico atualmente utilizado. Além disso, a pressão é transmitida rapidamente e uniformemente em containers fechados de diferentes tamanhos. Essas vantagens fazem dessa tecnologia uma grande aposta para o futuro dos bancos de leite.

Christen et al. (2013) reportaram que o tratamento por radiação UV-C apresentou uma retenção de um 87% de lactoferrina (4683 J.L^{-1}), enquanto apenas 9% foi obtido com a pasteurização convencional (62,5 °C por 30 min).

Lisozimas

Mayayo et al. (2016) avaliaram o efeito do tratamento de alta pressão no leite humano a diferentes pressões (300–650 MPa) na atividade de lisozima. A lisozima mostrou uma maior atividade no leite tratado a 400, 450 e 500 Mpa, quando comparada ao leite tratado em todas as pressões avaliadas (500 a 650 Mpa). Os autores sugerem que 450 MPa por 30 minutos forneceu os melhores resultados que a pasteurização na ativação da lisozima.

Viazis et al. (2007) aplicaram 400 MPa por tempos relativamente maiores, 30, 60, 90, e 120 minutos, resultando na retenção de 100, 96,3, 96,3, e 95,8 de lisozima, respectivamente.

Comparativamente, com a pasteurização convencional (62,5 °C por 30 min), houve retenção de 78,8%. Esses dados sugerem que a alta pressão é uma alternativa potencial à pasteurização de leite humano quando se trata de retenção de suas proteínas bioativas.

Martyziak-Zurowska et al. (2016) avaliaram o efeito da radiação UV-C no conteúdo de compostos bioativos em leite humano, como compostos antioxidantes e lisozima. A dose de 85 J.L⁻¹ não afetou a concentração de lisozima nas amostras analisadas. O aumento gradual da dose diminuiu os níveis de lisozima e, após 740 J.L⁻¹, a concentração de lisozima reduziu cerca de 40% em relação ao valor inicial (efeitos similares àqueles observados no tratamento convencional). Christen et al. (2013) expuseram leite humano a uma dose extremamente maior (4683 J.L⁻¹) e observaram a redução de 9% (8,3 min), 16% (14,8 min) e 25% (26,5 min) de lisozima. No leite submetido à pasteurização convencional (62,5°C por 30 min), a redução da mesma proteína foi de aproximadamente 47% em relação ao valor inicial.

4.4 Considerações finais

Esta revisão apresentou dados sobre os efeitos das tecnologias convencionais e emergentes na composição de proteínas bioativas presentes no leite humano. A pasteurização convencional (62,5°C por 30 min), que tradicionalmente é utilizada, afeta negativamente a composição de proteínas bioativas, principalmente as imunoglobulinas. As tecnologias emergentes de alta pressão e radiação ultravioleta apresentaram melhores resultados quando comparadas ao método tradicional. Não foram encontrados estudos que envolvessem o aquecimento ôhmico e proteínas bioativas em leite humano. No geral, os dados levam a conclusão de que a pasteurização convencional afeta a composição de proteínas bioativas e que as tecnologias emergentes apresentam-se como uma alternativa viável para a pasteurização do leite humano por apresentarem menores reduções no conteúdo de proteínas bioativas. Contudo, são necessários mais estudos acerca destas tecnologias a fim de identificar as melhores condições de tratamento, que garanta a qualidade nutricional e microbiológica.

Referências

- Altuner, E. M., Alpas, H., Erdem, Y. K., & Bozoglu, F. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical and biochemical properties of milk. *European Food Research and Technology*, 222(3), 392-396. doi:10.1007/s00217-005-0072-4
- Baro, C. G., M, Arslanoglu, S., Giuffrida, M., Dellavalle, G., Conti, A., & Moro, G. (2011). Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3, 818-829.
- Braga, L. P., & Palhares, D. B. (2007). Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *Jornal de Pediatria*, 83(1), 59-63. doi:doi:10.2223/JPED.1578
- Brasil, M. d. S. S. d. A. à. S. D. d. A. B. (2010). Dez passos para uma alimentação saudável : guia alimentar para crianças menores de dois anos: um guia para o profissional da saúde na atenção básica. (2 ed.). Brasília, DF: Ministério da Saúde.
- Chang, J.-C., Chen, C.-H., Fang, L.-J., Tsai, C.-R., Chang, Y.-C., & Wang, T.-M. (2013). Influence of Prolonged Storage Process, Pasteurization, and Heat Treatment on Biologically-active Human Milk Proteins. *Pediatrics & Neonatology*, 54(6), 360-366. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.03.018
- Christen, L., Lai, C. T., Hartmann, B., Hartmann, P. E., & Geddes, D. T. (2013). The Effect of UV-C Pasteurization on Bacteriostatic Properties and Immunological Proteins of Donor Human Milk. *PLOS ONE*, 8(12), e85867. doi:10.1371/journal.pone.0085867
- Contador, R., Delgado-Adámez, J., Delgado, F. J., Cava, R., & Ramírez, R. (2013). Effect of thermal pasteurisation or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *International Dairy Journal*, 32(1), 1-5. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.006
- Czank, C., Prime, D. K., Hartmann, B., Simmer, K., & Hartmann, P. E. (2009). Retention of the Immunological Proteins of Pasteurized Human Milk in Relation to Pasteurizer Design and Practice. *Pediatr Res*, 66(4), 374-379. doi:10.1203/PDR.0b013e3181b4554a
- Delgado, F. J., Contador, R., Álvarez-Barrientos, A., Cava, R., Delgado-Adámez, J., & Ramírez, R. (2013). Effect of high pressure thermal processing on some essential nutrients and immunological components present in breast milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 50-56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.05.006

- Donovan, S. M. (2016). The Role of Lactoferrin in Gastrointestinal and Immune Development and Function: A Preclinical Perspective. *The Journal of Pediatrics*, 173, Supplement, S16-S28. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.072>
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., Segura, A. G. d., Escuder, D., Bustos, G., Pallás, C., . . . Fernández, L. (2013). Bacteriological, Biochemical, and Immunological Modifications in Human Colostrum After Holder Pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 560-568. doi:10.1097/MPG.0b013e31828393ed
- Eidelman, A. I., Schanler, R. J., Johnston, M., Landers, S., Noble, L., Szucs, K., & Viehmann, L. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827
- Field, C. J. (2005). The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 1-4.
- Fox, P. (2008). Milk: an overview In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk proteins: From expression to food* (pp. 1-54). London: Academic press.
- Gil, AC. Como delinear uma pesquisa bibliográfica In: Gil, AC. Como elaborar projetos de pesquisa. São Paulo: Atlas; 2002.p. 59-85.
- Giribaldi, M., Coscia, A., Peila, C., Antoniazzi, S., Lamberti, C., Ortoffi, M., . . . Cavallarin, L. (2016). Pasteurization of human milk by a benchtop High-Temperature Short-Time device. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 228-233. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.004>
- Koenig, Á., Diniz, E. M. d. A., Barbosa, S. F. C., & Vaz, F. A. C. (2005). Immunologic Factors in Human Milk: The Effects of Gestational Age and Pasteurization. *Journal of Human Lactation*, 21(4), 439-443. doi:10.1177/0890334405280652
- Legrand, D. (2016). Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *The Journal of Pediatrics*, 173, Supplement, S10-S15. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.071>
- Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1537S-1543S.
- Lönnerdal, B. (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *The Journal of Pediatrics*, 173, Supplement, S4-S9. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.070>
- Lönnerdal, B., & Atkinson, S. (1995). Handbook of composição do leite. In R. Jensen (Ed.), (pp. 351-368). San Diego: Academic Press.

- Martysiak-Żurowska, D., Puta, M., Kotarska, J., Cybula, K., Malinowska-Pańczyk, E., & Kołodziejaska, I. (2016). The effect of UV-C irradiation on lipids and selected biologically active compounds in human milk. *International Dairy Journal*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.009>
- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Calvo, M., Sánchez, L., & Pérez, M. D. (2014). Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *International Dairy Journal*, 39(2), 246-252. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.07.001>
- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Calvo, M., Sánchez, L., & Pérez, M. D. (2016). Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk. *European Food Research and Technology*, 242(6), 891-898. doi:10.1007/s00217-015-2595-7
- Ochoa, T. J., & Cleary, T. G. (2009). Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie*, 91(1), 30-34. doi:10.1016/j.biochi.2008.04.006
- Oliveira, S. C. d., Bourlieu, C., Ménard, O., Bellanger, A., Henry, G., Rousseau, F., . . . Deglaire, A. (2016). Impact of pasteurization of human milk on preterm newborn in vitro digestion: Gastrointestinal disintegration, lipolysis and proteolysis. *Food Chemistry*, 211, 171-179. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.028>
- Oliveira, S. C. d., Deglaire, A., Ménard, O., Bellanger, A., Rousseau, F., Henry, G., . . . Bourlieu, C. (2016). Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion. *Food Research International*, 88, Part B, 263-275. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.022>
- Peila, C., Moro, G., Bertino, E., Cavallarín, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., . . . Coscia, A. (2016). The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients*, 8(8), pii: E477.
- Permanyer, M., Castellote, C., Ramírez-Santana, C., Audí, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., . . . Franch, À. (2010). Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 877-883. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2643>
- Perrin, M. T., Fogleman, A., & Allen, J. C. (2013). The Nutritive and Immunoprotective Quality of Human Milk beyond 1 Year Postpartum Are Lactation-Duration-Based Donor Exclusions Justified?. *Journal of Human Lactation*, 0890334413487432.

- Ramirez, R., Saraiva, J., Pérez Lamela, C., & Torres, J. A. (2009). Reaction Kinetics Analysis of Chemical Changes in Pressure-Assisted Thermal Processing. *Food Engineering Reviews*, 1(1), 16-30. doi:10.1007/s12393-009-9002-8
- Rastogi, N. K., Nguyen, L. T., & Balasubramaniam, V. M. (2008). Effect of pretreatments on carrot texture after thermal and pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 541-547. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.016
- Rongies, W., Wultanska, D., Kot, K., Bogusz, A., Rongies, M., Swiercz, P., . . . Meisel-Mikolajczyk, F. (2011). [The impact of UV radiation B and C in vitro on different of bacteria strains isolated from patients hospitalized in the Warsaw Medical University Clinics]. *Przegląd epidemiologiczny*, 65(1), 89-94.
- Silvestre, D., Ruiz, P., Martínez-Costa, C., Plaza, A., & López, M. C. (2008). Effect of Pasteurization on the Bactericidal Capacity of Human Milk. *Journal of Human Lactation*, 24(4), 371-376. doi:10.1177/0890334408319158
- Sousa, S. G., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2014). Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chemistry*, 151, 79-85. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.024
- Trujillo, A. J., Castro, N., Quevedo, J. M., Argüello, A., Capote, J., & Guamis, B. (2007). Effect of Heat and High-Pressure Treatments on Microbiological Quality and Immunoglobulin G Stability of Caprine Colostrum. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 833-839. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71567-9
- Viazis, S., Farkas, B. E., & Allen, J. C. (2007). Effects of High-Pressure Processing on Immunoglobulin A and Lysozyme Activity in Human Milk. *Journal of Human Lactation*, 23(3), 253-261. doi:10.1177/0890334407303945
- Wada, Y., & Lönnnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), 503-514. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012
- Ward, P. P., Paz, E., & Conneely, O. M. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2540. doi:10.1007/s00018-005-5369-8
- Zinkernagel, R. M. (2001). Maternal Antibodies, Childhood Infections, and Autoimmune Diseases. *New England Journal of Medicine*, 345(18), 1331-1335. doi:doi:10.1056/NEJMra012493

5 DISCUSSÃO GERAL

O leite humano é o melhor alimento para um recém-nascido, pois contém diversos nutrientes essenciais, os quais são importantes para o desenvolvimento saudável. Contudo, muitas vezes, as mães são impossibilitadas de amamentar o recém-nascido e, por esse motivo, o leite de uma doadora é uma alternativa valiosa para garantir os benefícios desse alimento.

Nesse contexto, é importante que o leite da doadora não apresente micro-organismos patogênicos que possam representar risco para a saúde do recém-nascido. Assim, é necessário dispor de procedimentos capazes de garantir a qualidade sanitária do leite humano doado. Por esse motivo, em todo o mundo foram criados os Bancos de Leite Humano, que são centros especializados em receber, processar e distribuir, de forma segura, esse alimento tão precioso.

O método utilizado pelos Bancos de Leite em todo o mundo é a pasteurização convencional, que utiliza baixa temperatura por tempo prolongado (62,5 °C por 30 minutos). Esse processamento garante a qualidade microbiológica do leite humano, porém pode resultar em perdas significativas na qualidade nutricional. Por isso, tecnologias alternativas precisam ser exploradas a fim de se obter uma pasteurização que garanta a segurança microbiológica e que mantenha as propriedades nutricionais desse alimento que é tão importante para a saúde de um recém-nascido.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de uma tecnologia alternativa para pasteurização do leite humano: o aquecimento ôhmico. O aquecimento ôhmico é uma tecnologia que permite a inativação de micro-organismos patogênicos, preservando as propriedades nutricionais e sensoriais do alimento.

Na primeira parte do estudo (Artigo 1), investigaram-se os efeitos não-térmicos da eletricidade na cinética de inativação microbiana de *S. aureus* e *E. coli* durante o aquecimento ôhmico (OH) e convencional (CV) em fórmula láctea infantil. A fórmula láctea foi utilizada em substituição do leite humano devido à necessidade de um volume elevado de leite para a realização dos experimentos e pela alta demanda desse alimento nos Bancos de Leite. De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo cinético de inativação microbiológica revelaram que, além da inativação pelo efeito térmico, ocorreu inativação por efeito elétrico. Além disso, o efeito elétrico foi mais pronunciado na menor temperatura de estudo (57,5 °C), onde se observou diferença significativa entre os tratamentos avaliados (OH e CV).

Comparando os micro-organismos estudados, a *E. coli* teve um menor número de células viáveis no final do experimento, em ambos tratamentos (OH e CV). Esse resultado está de acordo com as características desse micro-organismo que é mais sensível a

tratamentos térmicos por ser Gram-negativo; já o *S. aureus* apresentou maior resistência por agentes físicos (calor e eletricidade).

Para uma comparação adequada entre as duas tecnologias de aquecimento, os resultados de inativação foram ajustados a equações cinéticas, e esses parâmetros foram comparados. Para o *S. aureus*, os valores de K_{max} e D foram significativamente menores ($p < 0,05$) para o tratamento por OH em relação aos valores obtidos para tratamento CV, quando comparados à mesma temperatura. Esse resultado demonstra que o tratamento OH foi mais eficiente para inativação do micro-organismo. Além disso, foi possível observar que quanto menor a temperatura, maior foi a diferença entre os valores D nos diferentes tratamentos (OH e CV). Assim, pode-se inferir que a inativação microbiana sofreu influência do campo elétrico moderado, embora o principal mecanismo de inativação microbiana durante o tratamento por OH seja de natureza térmica. Para a *E. coli*, apenas na temperatura de 57,5 °C observou-se uma diferença significativa entre os valores D de ambas as tecnologias de aquecimento. Esse resultado evidencia que, em temperaturas mais baixas, o efeito do calor não é tão pronunciado, sendo assim possível observar os efeitos não-térmicos da eletricidade.

Os valores cinéticos obtidos foram usados para calcular o valor de F do processo, tempo de morte térmica (TDT), que tem como base a comparação de tratamentos térmicos. Os modelos obtidos no presente estudo foram utilizados para calcular a combinação de tempo e temperatura necessários para atingir uma redução logarítmica de 12 ciclos no número de *S. aureus* e *E. coli*.

Nos Bancos de Leite Humano, o binômio convencional utilizado é de 62,5 °C por 30 minutos. Esse binômio tem sido questionado por provocar maiores alterações na composição nutricional, principalmente no teor de vitaminas e proteínas termo-sensíveis. Quando possível, as condições de processamento deve ser otimizada para a retenção da qualidade nutricional e sensorial. Neste estudo, a temperatura que obteve menor valor D para ambos os micro-organismos foi a de 65 °C, e esta foi utilizada então para se dimensionar o processo de pasteurização do leite humano.

Com base nos resultados obtidos no estudo de cinética de inativação microbiana, realizou-se o segundo estudo (Artigo 2), que teve como objetivo investigar o efeito do tratamento térmico (OH e CV) na cinética de degradação de vitamina C e estabilidade de proteínas e lipídeos. Neste estudo, pode-se perceber que a degradação de vitamina C, proteínas e lipídeos totais apresentaram comportamentos semelhantes para ambos os tratamentos. Em geral, as degradações foram menores quando foram utilizadas as temperaturas mais elevadas, 62,5 e 65 °C por 4,5 min de tratamento. Contudo, o tempo de

processamento nessas temperaturas foi menor quando comparado com as outras temperaturas que foram investigadas neste estudo (57.5°C por 38 min., e 60°C por 11 min.) o que, possivelmente, resultou em degradação menor, devido à redução do tempo de exposição ao calor.

Esses resultados demonstraram que o tempo e a temperatura parecem determinar o grau de degradação em alimentos tratados termicamente. Os resultados evidenciaram que os efeitos não-térmicos do OH não influenciaram na degradação, o que é positivo para essa tecnologia. No entanto, estudos adicionais, considerando o efeito de tratamento OH em outros componentes do leite, são necessários antes da utilização dessa técnica para pasteurizar o leite humano. Além disso, estudos utilizando leite humano deveriam ser realizados a fim de corroborar os resultados obtidos com a fórmula infantil.

Por esses motivos, o terceiro estudo (Artigo 3) avaliou a inativação microbiológica e a degradação de compostos nutricionais (vitamina C e proteínas totais) em leite humano. O tratamento de pasteurização utilizado neste estudo foi proposto pelos estudos anteriores (Artigo 1 e 2) que determinaram binômio de tempo-temperatura para a pasteurização. Neste estudo, avaliou-se a capacidade desse tratamento na inativação de agentes patogênicos em leite humano, como *S. aureus* e *E. coli*. Esses micro-organismos foram escolhidos em razão de serem patógenos alimentares conhecidos, um Gram-positivo e outro Gram-negativo, os quais podem causar contaminação no leite humano e possíveis infecções neonatais.

Os resultados da inativação de *S. aureus* e *E. coli* no leite humano ao longo do tratamento de pasteurização por OH foram avaliados em três fases: no leite fresco (antes da pasteurização); depois da rampa de aquecimento (quando a amostra atingi a temperatura de pasteurização); e ao final do tratamento (após o resfriamento da amostras em temperaturas inferiores a 8°C).

Na rampa de aquecimento ocorreu uma redução expressiva nas contagens de *E. coli* (6,2 ciclos logarítmicos). Já nas contagens de *S. aureus*, houve uma menor redução (1,7 ciclos logarítmicos). Essa grande redução de *E. coli* na rampa de aquecimento foi, provavelmente, devido às características das bactérias Gram-negativas, que são mais sensíveis à inativação por agentes físicos, tais como calor e eletricidade. Esse resultado corrobora o estudo anterior (Artigo 1), que apresentou o mesmo comportamento na rampa de aquecimento. Contudo, no final do tratamento, todas as espécies bacterianas foram inativadas. Esses resultados vêm ao encontro das conclusões obtidas no artigo 1 que demonstraram que o modelo seria efetivo na inativação microbiológica na fórmula láctea. Além disso, o resultado indicou que, em adição ao efeito térmico, a presença do campo elétrico presente no OH favorece uma inativação

extra, relacionada aos efeitos não-térmicos, em células vegetativas de *S. aureus* e *E. coli*. Com isso, os resultados obtidos neste estudo confirmam que o teste realizado e apresentado no artigo 1 foi bem-sucedido na inativação microbiana.

Quanto à composição nutricional, o presente estudo avaliou o impacto desse tratamento sobre o conteúdo nutricional de vitamina C e proteínas totais em leite humano. A quantidade de vitamina C em amostras de leite humano, após o tratamento térmico, manteve-se inalterado, com retenção de aproximadamente 100% da quantidade inicial de vitamina C na amostra. Esse resultado é importante, uma vez que a vitamina C é um biomarcador de estresse oxidativo em amostras biológicas e sua retenção, após o processamento, demonstra a eficiência do tratamento térmico. Esses resultados corroboram as conclusões obtidas estudo apresentado no artigo 2, que avaliou a cinética de degradação da vitamina C em fórmula láctea infantil tratadas com OH.

O teor de proteínas totais sofreu uma redução significativa ($p < 0,05$) após a pasteurização por OH. Esse resultado não era esperado, visto que, no artigo 2, o teor de proteínas totais da fórmula láctea infantil não foi afetado pelo tratamento térmico. Contudo, é importante salientar que a fórmula láctea infantil apresenta uma composição proteica diferente do leite humano e, por esse motivo, acredita-se que uma maior redução pode estar relacionada a presença de diversos compostos bioativos proteicos presentes no leite humano. Embora não tenha sido avaliado o perfil dos aminoácidos após o tratamento, esse resultado sugere que os compostos bioativos presentes no leite humano possam ter sido degradados com a pasteurização via OH, pois o tratamento térmico afeta, principalmente, as proteínas de ação imunológica e anti-infecciosas, influenciando o teor de proteínas totais presentes no leite humano. Para melhor compreender os efeitos do processamento térmico e das tecnologias emergentes na estabilidade de proteínas bioativas em leite humano, um estudo de revisão de literatura foi conduzido. Esta revisão bibliográfica indicou que a pasteurização convencional, com temperatura de 62,5 °C por 30 minutos, afeta negativamente o teor de proteínas bioativas. Por outro lado, as tecnologias emergentes investigadas apresentaram efeito positivo na retenção de compostos nutricionais. Contudo, são necessários maiores investigações sobre os efeitos destas tecnologias, principalmente pelo OH, em outros componentes do leite humano.

A avaliação dos efeitos do tratamento OH na inativação microbiana e na estabilidade dos compostos nutricionais do leite humano ainda são escassos. Esse estudo contribui para uma melhor compreensão dessa tecnologia, concluindo que o aquecimento ôhmico foi efetivo na inativação microbiana e na preservação de vitamina C em leite humano. Contudo, uma degradação significativa nos níveis de proteína total após o tratamento foi observado (35% de

redução). Para indicação do uso dessa tecnologia em Bancos de Leite Humano, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da tecnologia OH no perfil de aminoácidos e em outros compostos do leite humano, assim como em outros micro-organismos patogênicos que podem estar presente nesse alimento.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- a inativação de *S. aureus* e *E. coli* em fórmula láctea infantil contaminada artificialmente obtiveram comportamentos distintos. A *E. coli* obteve um menor número de células viáveis no final do experimento em ambos tratamentos (OH e CV). Por outro lado, o *S. aureus* apresentou uma maior resistência aos agentes físicos aplicados (calor e eletricidade). Ainda, *S. aureus* apresentou menores valores de *D*, em todas as temperaturas, no tratamento OH quando comparado com o tratamento CV. Já para *E. coli*, apenas na temperatura de 57,5 °C observou-se uma diferença significativa entre os valores de *D* de ambos os tratamentos;
- na inativação de *S. aureus*, os efeitos não-térmicos da eletricidade foram significativos em todas as temperaturas avaliadas, indicando um possível efeito de eletroporação. Já para *E. coli*, foi possível perceber os efeitos não-térmicos da eletricidade apenas na menor temperatura de estudo (57,5 °C), sugerindo que, em temperaturas mais elevadas, os efeitos não-térmicos sejam mascarados pelos efeitos térmicos intensos na cinética de inativação;
- a estabilidade da vitamina C, proteínas e lipídeos foi semelhante durante o aquecimento por OH e CV, demonstrando mecanismos semelhantes de degradação em ambos os processos de aquecimento. Este resultado é positivo para o OH, pois demonstra que efeitos não-térmicos da eletricidade não influenciam nas propriedades nutricionais do alimento;
- a tecnologia de OH foi efetiva na inativação dos micro-organismos testados em leite humano, pois, ao final da pasteurização, todos os micro-organismos inoculados artificialmente foram inativados. Com relação à parte nutricional, o teor de vitamina C não foi afetado. Contudo, uma maior degradação de proteínas foi observada no leite humano, possivelmente esta degradação se deu pelos efeitos térmicos associados com a aplicação de calor.

- pode-se concluir que a pasteurização por OH é efetiva na inativação microbiológica. Devido aos efeitos elétricos, uma maior taxa de inativação é alcançada, diminuindo o tempo de processamento, resultando em menores perdas nutricionais presente no alimento. Os efeitos não-térmicos do OH não afetam a degradação de compostos nutricionais, sendo estes degradados basicamente pelos efeitos térmicos associados com a aplicação de calor.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. 2. ed. **Nutrição em obstetrícia e pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.

ACETI, A.; CORVAGLIA, L.; FALDELLA, G. Human milk banks: lights and shadows. **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, v. 3, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://www.jpnim.com/index.php/jpnim/article/viewFile/030225/181>>. Acesso em: 6 mar. 2016.

ALTUNTAS, E. G. Isolation, identification and characterization of *Staphylococcus epidermidis* in human milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 36-41, Jan. 2015.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, n. 3, p. e827-41, Mar. 2012. Section on Breastfeeding.

AN, H. J.; KING, J. M Thermal characteristics of ohmically heated rice starch and rice flours. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. C84–C88, 2007.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 6, p. 584–602, Jun. 2007.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49-74, Feb. 2013.

BERGSTRÖM, A. et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of danish infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2889-2900, May. 2014.

BHARADVA, K. et al. Human milk banking guidelines. **Indian Pediatrics**, v. 51, n. 6, p. 469-474, Jun. 2014.

BLACKWELL, C. C.; WEIR, D. M. The role of infection in sudden infant death syndrome. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-6, Aug. 1999..

BODE, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147–1162, Sep. 2012.

BRAGA, L. P. M.; PALHARES, D. B. Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 59-63, fev. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dados de 2015. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acesso em: 6 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006** : dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança/ Ministério da Saúde, Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. (Série G. Estatística e Informação em Saúde). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Dez passos para uma alimentação saudável**: guia alimentar para crianças menores de dois anos: um guia para o profissional da saúde na atenção básica. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança**: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 23).

CALIL, V. M. L. T.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, v. 82, n. 1-4, p. 1-10, Jan./dez. 2003.

CALIL, V. M. L. T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. Composição nutricional do colostro de mães de recém nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional e composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação, vantagens em relação ao leite de vaca. **Revisões e Ensaios**. 1991. Disponível em: <http://www.academia.edu/8928961/Composi%C3%A7%C3%A3o_nutricional_do_colostro_de_m%C3%A3es_de_rec%C3%A9mnascidos_de_termo_adequados_e_pequenos_para_a_idade>. Acesso em: 10 jan. 2016.

CASADO, B.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. **Journal of Proteomics**, v. 73, n.2, p. 196-208, Dec. 2009.

CASTANYS-MUÑOZ, E.; MARTIN, M. J.; VAZQUEZ, E. Building a beneficial microbiome from birth. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 323-30, Mar. 2016.

CHARLIER, C. et al. Interactions between staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 30-39, Apr. 2009.

CHEN, C.; ABDELRAHIM, K.; BECKERICH, I. Sensitivity analysis of continuous ohmic heating process for multiphase foods. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 2, p. 257-265, May 2010.

CHOI, Y. K. et al. Association of maternal diet with zinc, copper, and iron concentrations in transitional human milk produced by korean mothers. **Clinical Nutrition Research**, v. 5, n. 1, p. 15-25, Jan. 2016.

CHRISTEN, L. et al. Ultraviolet-C irradiation: a novel pasteurization method for donor human milk. **PLoS One**, v. 8, n. 6, Jun. 2013.

CIVARDI, E. et al. Microorganisms in human milk: lights and shadows. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 26, Suppl. 2, p. 30-34, 2013.

COGEN, A. L. et al. Staphylococcus epidermidis Antimicrobial δ -Toxin (Phenol-Soluble Modulin- γ) Cooperates with Host Antimicrobial Peptides to Kill Group A Streptococcus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8557, Jan. 2010.

COSCIA, A. et al. Effect of holder pasteurisation on human milk glycosaminoglycans. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 127-130, Jan. 2015.

CURY, Maria Thereza Furtado. Aleitamento materno. In: ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C. 2009.

DONANGELO, C. M.; TRUGO, N. M. F. Human milk: composition and nutritional value. In: CABALLERO, B. (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. Londres:

FAO; WHO. **Food safety risk analysis: a guide for national food safety authorities**. Rome, Itália: FAO/WHO, 2009.

FARR, B. M. et al. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled? **Lancet Infectious Disease**, v. 1, n. 1, p. 38-45, Aug. 2001.

FELLOWS, P. J. (2009). Pasteurization. In *Food Processing Technology* (Third ed., pp. 11-95): Woodhead Publishing.

FETSCH, A. et al. Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, n. 18, p. 1-6, Sep. 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOX, P. F. Milk: an overview. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. **Milk proteins: from expression to food**. Londres: Academic Press, 2008. p. 1-54.

GREER, F. R. Vitamin metabolism and requirements in the micropremie. **Clinics in Perinatology**, v. 27, n. 1, p. 95-118, Mar. 2000.

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de Bacillus coagulans por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HEIKKILA, M. P.; SARIS, P. E. Inhibition of staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 471-478, 2003.

HEIMAN, H.; SCHANLER, R. J. Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. **Early Human Development**, v. 82, n. 12, p. 781-787, Dec. 2006.

HO, J.; BOOST, M.; O'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. **Epimediology and Infection**, v. 143, n. 8, p. 1751-1760, Oct. 2014.

HOUSKA, M. et al. High pressure and foods–fruit/vegetable juices. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 386-398, Dec. 2006.

HOYT, A. E. W.; MEDICO, T.; COMMINS, S. P. Breast milk and food allergy: connections and current recommendations. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1493-1507, Dec. 2015.

ICIER, Filiz. Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. **Ohmic heating of fluid foods**, Academic Press, San Diego, p. 305-367, 2012.

IMAI, T. et al. Ohmic heating of Japanese white radish *Rhaphanus sativus* L. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 461-472, Jun. 2007.

JONSSON, S.; PULKKINEN, M. O. Mastitis today: incidence, prevention and treatment. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae. Supplementum**, v. 208, p. 84-87, 1994.

KAJAK, K.; KRAJEWSKA, D. K. Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 7, n. 1-2, p. 152-159, Jun. 2006.

KAYIRAN, P. G. et al. Transmission of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* to a preterm infant through breast milk. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 27, n. 5, p. 527-529, Mar. 2014.

KEIM, S. et al. Contamination of human milk purchased via the Internet. **Pediatrics**, v. 132, n. 5, p. 1227-1235, Nov. 2013.

KNIRSCHA, M. et al. Ohmic heating – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 9, p. 436-441, Sep. 2010.

LACERDA, E. M. A. **Nutrição em obstetricia e pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica Guanabara, 2009. p. 281-302.

LAMBRESCHTS, A. et al. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 4, p. 755-758, Jul. /Ago. 2014.

LANARI, M. Human milk, a concrete risk for infection? **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, Suppl 4, p. 75-77, Oct. 2012.

LEAF, Alison; WINTERSON, Rebecca. Breast-milk banking: evidence of benefit. *Paediatrics and Child Health*, v. 19, n. 9, p. 395-399, 2009.

LONNERDAL, B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. In: PICKERING, L. K. et al. (Ed.). **Protecting infants through human milk**. New York: Springer, p. 11-25, 2004. p. 11-25. (Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 554).

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n. 6, p. 1537-1543, Jun. 2003.

MADAPPA, T. **Escherichia coli infections medication**. 2014. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/217485-medication>>. Acesso em: 6 novembro. 2016.

MARTÍN, V. et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28,n. 1, p. 36-44, Feb. 2012.

MARX, C. et al. Human milk oligosaccharide composition differs between donor milk and mother's own milk in the NICU. **Journal of Human Lactation**, v. 30, n. 1, p. 54-61, Feb. 2014.

McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1-2, p. 1-27, Nov. 1999.

McMEEKIN, T. A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 133- 153, Sep. 2002.

McMEEKIN, T. et al. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 2-9, Nov. 2008.

MENON, G.; WILLIAMS, T. C. Human milk for preterm infants: why, what, when and how?. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 98, n. 6, F559-F562, Nov. 2013.

MESÍAS, M. et al. Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 24-28, Apr. 2016.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C. et al. Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 697-702, Feb. 2011.

MORO, G. E.; ARSLANOGLU, S. Heat treatment of human milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 165-166, Feb. 2012.

NAKAMURA, K. et al. Outbreak of extended-spectrum b-lactamase producing *Escherichia coli* transmitted through breast milk sharing in a neonatal intensive care unit. **The Journal of Hospital Infection**, v. 92, n. 1, p. 42-46, Jan. 2016.

NARANG, A. P. S. et al. Serial composition of human milk in preterm and term mothers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 21, n. 1, p. 89-94, 2006.

NASCIMENTO, C. O.; REIS, I. P.; REBELLO, F. F. Utilização do aquecimento ôhmico no processamento de alimentos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v 9, n. 5, p. 62 - 67, dez, 2014.

NEVES, L. et al. Doação de leite humano: dificuldades e fatores limitantes. **O Mundo da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 156-161, 2011.

O'CONNOR, D. L.; EWASCHUK, J. B.; UNGER, S. Human milk pasteurization: benefits and risks. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 3, p. 269-275, May. 2015.

OLIVEIRA, M. I. C. et al. **Manual de capacitação de multiplicadores na Iniciativa Unidade Básica Amiga da Amamentação**. Rio de Janeiro: Fiotec, 2006. v. 1.

PALANIAPPAN, S.; SASTRY, S. K. Electrical conductivity of selected juices: influences of temperature, solids content, applied voltage, and particle size. **Journal of Food Process Engineering**, v. 14, n. 4, p. 247-260, 1991.

PEILA, Chiara et al. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 477, 2016.

PEREIRA, R. et al. Death kinetics of escherichia coli in goat milk and bacillus licheniformis in cloudberry jam treated by ohmic heating. **Chemical Papers**, v. 61, n. 2, p. 121-126, 2007.

PERRIN, M. T.; FOGLEMAN, A.; ALLEN, J. C. J. The nutritive and immunoprotective quality of human milk beyond 1 year postpartum: are lactation-duration-based donor exclusions justified? **Journal of human lactation**, v. 29, n. 3, p. 341-349, Aug. 2013.

PERRIN, Maryanne T. et al. A longitudinal study of human milk composition in the second year postpartum: implications for human milk banking. **Maternal & child nutrition**, 2016.

POTHAKAMURY, U. R. et al. Inactivation of escherichia coli and staphylococcus aureus in model foods by pulsed electric field technology. **Food Research International**, v. 28, n. 2, p. 167-171, 1995.

PRATICÒ, G. et al. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. **Natural product research**, v. 28, n. 2, p. 95-101, Oct. 2013.

PUIGMARTI, C. M. et al. Effects of pasteurization and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 697-702, Feb. 2011.

RAO, R.; GEORGIEFF, M. Iron therapy for preterm infants. **Clinics in Perinatology**, v. 36, n. 1, p. 27-42, Mar. 2009.

RDC-ANVISA nº. 171, de 04 de setembro de 2006. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/rdc_171.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2016.

ROMEU-NADAL, M. et al. Effect of pasteurization on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 434–438, Mar. 2008.

RONA, M. S. et al. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nas determinações de acidez, cálcio, proteínas e lipídeos de leite de doadoras de bancos de leite humano. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 8, n. 3, p. 257-263, 2008.

SAARELA, T.; KOKKONEN, J.; KOIVISTO, M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 9, p. 1176-1181, Sep. 2005.

SANTOS, P. S. **Avaliação dos teores de elementos essenciais no leite materno de mães de recém-nascidos prematuros e a termo e em fórmulas infantis por meio da análise por ativação com nêutrons**. 2009. 105 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

SARANG, S; SASTRY, S. K.; KNIFE, L. Electrical conductivity of fruits and meats during ohmic heating. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 3, p. 351-356, Aug. 2008.
second year postpartum: implications for human milk banking. **Maternal & Child Nutrition**, Jan. 2016. [Epub ahead of print]. doi: 10,1111 / mcn.12239.

SEMBA, R. D. et al. Mastitis and immunological factors in breast milk of lactating women in Malawi. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 671–674, Sep. 1999.

SENSOY, I.; SASTRY, I. Extraction using moderate electric fields. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. 7-13, Jan. 2004.

SERAFINI, A. B. et al. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 775-779, 2003.

SHI, W; CHANCE, M. R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SILVA, R. et al. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1535-1538, 2007.

SILVEIRA, L. A. M. et al. Controle microbiológico do leite humano de um hospital universitário. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p.844-850. jul./set. 2012.

SOARES, E. et al. Vitaminas, minerais e oligoelementos por via entérica no recém-nascido. Revisão do Consenso Nacional. **Acta Pediatrica Portuguesa**, v. 46, p. 159-169, 2015.

SUN, H. X. et al. Effects of ohmic heating on microbial counts and denaturation of proteins in milk. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 117-123, 2008.

TONDO, E.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2014.

VALENTINE, C. J.; WAGNER, C. L. Nutritional management of the breastfeeding dyad. **Pediatric clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 261-74, Feb. 2013.

VIEIRA, A. A. et al. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**, v. 87, n. 8, p. 577–580, Aug. 2011.

VITOLO, M. R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014.

WANG, H. Y. et al. *Leuconostoc mesenteroides* growth in food products: prediction and sensitivity analysis by adaptive-network-based fuzzy inference systems. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2013.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods: critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 467-494, 1995.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology: reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

WINDYGA, B. et al. Inactivation of *staphylococcus aureus* and native microflora in human milk by high pressure processing. **High Pressure Research: An International Journal**, v. 35, n. 2, p. 181-188, Feb. 2015.

ZHANG, Q. et al. Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. **Transactions of the ASAE**, v. 37, n 2, p. 581-587. 1995.

ZHU, S. M. et al. Electrical conductivity of particle–fluid mixtures in ohmic heating: measurement and simulation. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1666-1672, July 2010.

ZORGANI, A. et al. Detection of pyrogenic toxins of *staphylococcus aureus* in sudden infant death syndrome. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 25, n. 1-2, p. 103-108, Aug. 1999.