JULIANA APARECIDA DOS SANTOS LEITE

**Impacto do processo térmico assistido por micro-ondas sobre
a funcionalidade do leite humano**

São Paulo
2018

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS LEITE

**Impacto do processo térmico assistido por micro-ondas sobre
a funcionalidade do leite humano**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2018

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS LEITE

**Impacto do processo térmico assistido por micro-ondas sobre
a funcionalidade do leite humano**

Tese apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Engenharia
Química

Orientador: Prof^a. Dra. Carmen Cecília
Tadini

São Paulo

2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Leite, Juliana Aparecida dos Santos

Impacto do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a funcionalidade do leite humano / J. A. S. Leite -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

126 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Propriedades dielétricas 2. Cinética de inativação 3. Qualidade microbiológica 4. Micro-ondas 5. Compostos bioativos I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eliana e Ovídio que dignamente me apresentaram o caminho da honestidade e persistência e que souberam entender os momentos que não pudermos estar juntos.

Ao meu companheiro Raul pela torcida, confiança e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza. Raul foi a pessoa que mais me incentivou durante o período de doutoramento e tenho certeza que ele estará presente na realização de muitos outros sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dra. Carmen Cecília Tadini, pelas oportunidades concedidas e pelos exemplos e ensinamentos valiosos que foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos Professores Jorge Gut, Juliana Ract, Mariza Landgraf e Pedro Oliveira pela importante colaboração, sempre sugerindo melhorias para esse trabalho e permitindo o uso de seus laboratórios para realização das análises.

Ao Banco de Leite Humano da Universidade de São Paulo pela doação de leite humano para esse trabalho, a Dra Virginia Quintal por permitir a minha participação nas coletas domiciliares e no acompanhamento do processo de pasteurização, as enfermeiras do Hospital Universitário da USP, em especial a Andréia, que me ajudaram com a coleta do leite, e a todas as mães que participaram desse trabalho doando leite humano.

Ao laticínio-escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo pela doação de leite de vaca tipo B.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA), alunos de graduação, pós-graduação e funcionários, agradeço pelo apoio, incentivo e auxílio na conclusão deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao FoRC/Fapesp pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida, pelo período de 06 meses, para a realização do doutorado sanduíche na Universidade da Califórnia, Davis, EUA.

À Deus, por abençoar todos os dias da minha vida e ter me dado forças para seguir sempre em frente com muita determinação, para alcançar todos os meus objetivos e superar todas as dificuldades.

Muito Obrigada a todos.

RESUMO

Neste trabalho, foram determinadas as propriedades dielétricas e a condutividade elétrica de quatro tipos de leite (leite humano e 3 tipos de leite de vaca - cru, integral e semi-desnatado) e de três fórmulas infantis (FIs) empregando a técnica de cabo coaxial de ponta aberta. As medições das propriedades dielétricas foram realizadas na faixa de frequência de (500 a 3000) MHz e em temperaturas de (5 a 90) °C. O comportamento dielétrico de todos os tipos de leite e das FIs foi caracterizado por dois mecanismos principais (condução iônica e rotação dipolar), que se mostraram dependentes da frequência e da temperatura. Também foi estudada a inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP), presente em leite de vaca e humano, utilizando um reator de micro-ondas focalizadas em processo térmico descontínuo. Durante o processamento, por meio de um sensor de fibra óptica, em contato direto com o leite, foram obtidos os históricos de temperatura dos quais os parâmetros cinéticos D e z foram calculados no intervalo de temperatura de (50 a 80) °C e tempos de (15, 30, 45, 60, 180 e 300) s. A inativação térmica da ALP obedeceu a cinética de primeira ordem e os parâmetros cinéticos determinados foram: $z = 4,4$ °C e $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1,1$ s para o leite humano e $z = 7,4$ °C e $D_{70^{\circ}\text{C}} = 44,3$ s para o leite de vaca tipo B. Os resultados desse estudo mostraram que o tratamento térmico assistido por micro-ondas, na condição ótima de 60 °C por 30 s, foi eficiente na inativação de micro-organismos patogênicos (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella*) e na preservação do perfil de ácidos graxos em leite humano. Além disso, o tratamento térmico assistido por micro-ondas resultou em menores perdas de proteínas, como as imunoglobulinas e lactoferrina, quando comparado ao processamento térmico convencional (*Holder*), utilizado nos Bancos de Leite Humano (BLH), demonstrando que pode ser considerado uma tecnologia alternativa para o processamento de alimentos líquidos.

Palavras-chave: Propriedades dielétricas. Cinética de inativação. Qualidade microbiológica. Ácidos graxos. Minerais. Compostos bioativos.

ABSTRACT

In this work, the dielectric properties and electrical conductivity of four types of milk (human milk and 3 types of cow milk - raw, whole and low-fat) and three infant formulae (IFs) were measured using the open-ended coaxial method. The measurements of the dielectric properties were performed at frequency range from (500 to 3000) MHz and temperatures from (5 to 90) °C. The dielectric behavior of all types of milk and IFs was characterized by two main mechanisms (ion conduction and dipole rotation), which showed dependency in relation to frequency and temperature. The inactivation of alkaline phosphatase (ALP), present in cow and human milk, was also studied using a microwave reactor focused on a batch process. During the processing, by means of a fiber optic sensor, the temperature histories were obtained from which the kinetic parameters D and z were calculated at temperature range from (50 to 80) °C and times from (15, 30, 45, 60, 180 and 300) s. The thermal inactivation of the ALP followed the first-order kinetics and the kinetic parameters determined were: $z = 4.4$ °C and $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1.1$ s for human milk and $z = 7.4$ °C and $D_{70^{\circ}\text{C}} = 44.3$ s for the type B cow's milk. The results of this study showed that microwave-assisted heating, under optimum condition (60 °C for 30 s), was efficient for inactivation pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Salmonella*) and preservation of fatty acids profile in human milk. In addition, microwave-assisted heating resulted in lower losses of important proteins, such as immunoglobulins and lactoferrin, compared to conventional thermal processing (Holder), used in Human Milk Banks (BLH), demonstrating that it can be considered an alternative technology for the processing of liquid foods.

Keywords: Dielectric properties. Inactivation kinetic. Microbiological quality. Fatty acids. Minerals. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Diferentes perfis de temperatura após 1 min de aquecimento por micro-ondas (A) e em banho de óleo (B)	27
Figura 2.1 – Fases da secreção láctea	30
Figura 2.2 – Curva da taxa de letalidade	39
Figura 2.3 – Curva de tempo de destruição térmica	40
Figura 2.4 – Espectro eletromagnético	44
Figura 2.5 – Oscilação dos campos elétrico e magnético na radiação eletromagnética	45
Figura 2.6 - Magnetron.....	46
Figura 2.7 – Nuvem de elétrons raiada sendo emitida pelo cátodo do magnetron.....	47
Figura 2.8 – Distribuição das moléculas polares submetidas a um campo elétrico.....	48
Figura 3.1 – Sistema de aquecimento e resfriamento do micro-ondas.....	62
Figura 3.2 – Agitador mecânico utilizado para homogeneizar a amostra	64
Figura 3.3 – Representação esquemática do aquecimento por micro-ondas para obtenção do histórico de tempo-temperatura	64
Figura 3.4 – Curva de calibração das diferentes concentrações de fenol em água para análise de leite de humano (A) e leite vaca (B)	66
Figura 4.1 – Permissividade elétrica relativa (ϵ') e fator de perda (ϵ'') em função da frequência e da temperatura para o leite de vaca cru tipo B (A), integral tipo A pasteurizado (B), semi-desnatado tipo A pasteurizado (C), fórmulas infantis FI1 (D), FI2 (E) e FI3 (F) e leite humano (G)	79
Figura 4.2 – Gráfico Cole-Cole da permissividade complexa do leite humano na faixa de frequência entre (500 e 3000) MHz e temperaturas de (5 a 90) °C	80
Figura 4.3 – Contribuição da condutividade elétrica sobre a perda por condução iônica (ϵ''_{σ}) e a perda por dipolos (ϵ''_d) sobre o fator de perda da FI1 em temperaturas de (5 e 90) °C.....	81
Figura 4.4 – Contribuição dos componentes iônicos (ϵ''_{σ}) e dipolar (ϵ''_d) sobre o fator de perda da FI1 nas temperaturas de (5 a 90) °C a frequência de (915 e 2450) MHz.....	82
Figura 4.5 – Condutividade elétrica (σ) em função da temperatura de (5 a 90) °C para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FI)	82
Figura 4.6 – Profundidade de penetração (d_p) nas frequências de (915 e 2450) MHz e temperaturas de (5 a 90) °C para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs).....	84

Figura 4.7 – Histórico da temperatura do leite humano durante o aquecimento por micro-ondas a temperatura de 70 °C e nos tempos de processo de (5 a 300) s	86
Figura 4.8 – Redução da atividade da enzima ALP após o aquecimento por micro-ondas na faixa de temperatura de (50 a 80) °C e nos tempos de processo de (15 a 300) s para o leite humano (A) e leite de vaca (B)	86
Figura 4.9 – Curvas de inativação térmica da enzima ALP em leite humano (A), e respectivo gráfico de paridade entre a atividade enzimática residual predita e experimental (B), e leite de vaca tipo B (C), e respectivo gráfico de paridade entre a atividade enzimática residual predita e a experimental (D), submetidos ao aquecimento por micro-ondas	89
Figura 4.10 – Concentrações de fenol (µg de fenol/mL de leite) presentes em leite de vaca tipo B (A) e leite humano (B), submetidos a diferentes temperaturas e tempos de processo	91
Figura 4.11 – Distribuição de oligossacarídeos em leite humano cru e processado termicamente pelo método <i>Holder</i> e assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Frequências de ondas eletromagnéticas permitidas para uso industrial, médico e científico em diferentes países.....	45
Tabela 3.1 – Parâmetros empregados na análise por ICP-OES	70
Tabela 4.1 – Caracterização físico-química dos leites de vaca (LV), leite humano (LH) e das fórmulas infantis (FI).....	75
Tabela 4.2 - Parâmetros das regressões lineares e coeficientes de determinação da condutividade elétrica para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs)	83
Tabela 4.3 – Regressões múltiplas obtidas das propriedades dielétricas (ϵ' e ϵ'') no intervalo de (5 a 50) °C e frequência de (2 a 3) GHz para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs).....	85
Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos (D e z) para a ALP em leite humano e de vaca tipo B submetidos ao aquecimento por micro-ondas a temperatura de referência de 70 °C	87
Tabela 4.5 - População de micro-organismos em leite humano (LH) cru e submetido ao processamento térmico assistido por micro-ondas (60 °C por 30 s) e <i>Holder</i> (62,5 °C por 30 min)	92
Tabela 4.6 – Composição de ácidos graxos em leite humano (LH) cru e submetido ao processamento térmico assistido por micro-ondas e convencional (<i>Holder</i>)	95
Tabela 4.7 – Perfil de minerais em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelo método convencional (<i>Holder</i>) e assistido por micro-ondas	96
Tabela 4.8 – Comparação do perfil de minerais em leite humano cru obtido nesse trabalho (Leite, 2017) com o de outros autores	97
Tabela 4.9 – Perfil qualitativo e abundância relativa (%) dos oligossacarídeos (OS) em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelo método <i>Holder</i> e assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo	99
Tabela 4.10 – Comparação dos oligossacarídeos em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelo método <i>Holder</i> e assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo.....	101
Tabela 4.11 – Teores de IgA, IgG, IgM e lactoferrina em leite humano (LH) cru e aquecido termicamente pelo método <i>Holder</i> e assistido por micro-ondas nas condições de 60 °C por 30 s, 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Indicador enzimático fosfatase alcalina
BLH	Banco de Leite Humano
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DMS	Diferença Mínima Significativa
Fls	Fórmulas infantis
FI1	Fórmula infantil 1
FI2	Fórmula infantil 2
FI3	Fórmula infantil 3
2'-FL	2'-fucosylactose
LH	Leite humano
LNFP1	Lacto-N-fucopentaose I
LNH	Lacto-N-hexaose
LNnT	Lacto-N-neotetraose
LNT	Lacto-N-tetraose
LV	Leite de vaca
3-SL	3-sialyllactose
6-SL	6-sialyllactose
SEQ	Soma dos erros quadráticos
SV	Valor de esterilização comercial
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

A_0	Atividade enzimática inicial (U/mL)
A	Atividade enzimática a qualquer tempo (U/mL)
AU	Absorbância (-)
C_{σ}''	Contribuição relativa ao mecanismo de condução iônica (-)
C_d''	Contribuição relativa ao mecanismo de rotação dipolar (-)
C	Concentração de fenol ($\mu\text{g/mL}$)
c	Velocidade da luz no vácuo ($3 \cdot 10^8$ m/s)
$C_{m\acute{a}x}$	Concentração máxima de fenol ($\mu\text{g/mL}$)
D	Tempo necessário para a redução decimal da atividade enzimática (s)
D_{ref}	Valor- D na temperatura de referência (s)
d_p	Profundidade de penetração (m)
f	Frequência de oscilação do campo eletromagnético (Hz)
F	Tempo necessário para o processo isotérmico atingir o valor de esterilização (s)
F_{ref}	Letalidade integrada (s)
k	Constante de velocidade de 1° ordem (-)
r^2	Coeficiente de determinação (-)
t	Tempo de processamento (s)
$T(t)$	Histórico de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t_{eq}	Tempo equivalente (s)
T_{ref}	Temperatura de referência do processo ($^{\circ}\text{C}$)
z	Variação da temperatura para provocar uma redução de 90% no valor- D ($^{\circ}\text{C}$)

Símbolos gregos

$\hat{\epsilon}$	Permissividade relativa complexa (-)
ϵ_0	Permissividade elétrica no vácuo ($8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m)
ϵ'	Permissividade elétrica relativa (-)
ϵ''	Fator de perda dielétrica (-)
ϵ_{σ}''	Fator de perda, componente iônico (-)
ϵ_d''	Fator de perda, componente dipolar (-)
σ	Condutividade elétrica (mS/cm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Objetivos	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	Leite humano	29
2.1.1	<i>Composição do leite humano</i>	30
2.1.1.1	<u>Proteínas</u>	30
2.1.1.2	<u>Lipídios</u>	31
2.1.1.3	<u>Minerais</u>	32
2.1.1.4	<u>Carboidratos</u>	33
2.2	Leite de vaca	34
2.2.1	<i>Composição do leite de vaca.....</i>	34
2.3	Métodos de pasteurização.....	35
2.3.1	<i>Tratamento térmico do leite humano em Bancos de Leite Humano (BLH)</i>	36
2.4	Processamento térmico de alimentos	38
2.4.1	<i>Cálculo do tempo de destruição térmica</i>	40
2.4.2	<i>Letalidade do processo não isotérmico</i>	42
2.5	Micro-ondas	43
2.5.1	<i>Mecanismos de geração de micro-ondas.....</i>	44
2.5.2	<i>Mecanismos de aquecimento por micro-ondas</i>	47
2.6	Propriedades dielétricas de alimentos líquidos	49
2.6.1	<i>Processamento de alimentos líquidos assistido micro-ondas</i>	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Matérias-primas	55
3.1.1	<i>Leite humano</i>	55
3.1.2	<i>Leite de vaca</i>	56
3.1.3	<i>Fórmulas infantis</i>	56
3.1.3.1	<u>Reconstituição das formulações infantis</u>	56
3.2	Procedimento Experimental	57
3.2.1	<i>Caracterização físico-química das matérias-primas.....</i>	57
3.2.2	<i>Etapa 1 – Determinação das propriedades dielétricas e condutividade elétrica</i>	58
3.2.2.1	<u>Propriedades dielétricas</u>	58
3.2.2.1.1	<i>Procedimento experimental da medição.....</i>	58
3.2.2.1.2	<i>Cálculo da profundidade de penetração</i>	59
3.2.2.2	<u>Condutividade elétrica</u>	59
3.2.3	<i>Etapa 2 – Estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP)</i>	60
3.2.3.1	<u>Pasteurização Holder do leite humano.....</u>	61
3.2.3.2	<u>Processo térmico descontínuo assistido por micro-ondas</u>	62
3.2.3.3.1	<i>Atividade residual da fosfatase alcalina (ALP)</i>	65
3.2.4	<i>Etapa 3 - Avaliação do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais, de proteínas e compostos bioativos do leite humano em comparação com o processo convencional.....</i>	66
3.2.4.1	<u>Letalidade microbiana.....</u>	66

3.2.4.2	Perfil de ácidos graxos.....	67
3.2.4.3	Teor de minerais	68
3.2.4.4	Teor de proteínas (imunoglobulinas e lactoferrina)	70
3.2.4.5	Compostos bioativos.....	71
3.2.4.5.1	Oligossacarídeos	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	Caracterização físico-química das matérias-primas	75
4.2	Etapa 1 – Determinação das propriedades dielétricas e condutividade elétrica	77
4.3	Etapa 2 – Estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP) em leite humano e de vaca por aquecimento por micro-ondas	85
4.4	Etapa 3 – Avaliação do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais, de proteínas e compostos bioativos em comparação com o processo convencional (<i>Holder</i>)	91
4.4.1	<i>Letalidade microbiana</i>	91
4.4.2	<i>Perfil de ácidos graxos em leite humano</i>	93
4.4.3	<i>Perfil de minerais em leite humano</i>	95
4.4.4	<i>Compostos bioativos (oligossacarídeos) e proteínas (imunoglobulinas e lactoferrina)</i>	97
4.4.4.1	<i>Oligossacarídeos</i>	97
4.4.4.2	<i>Imunoglobulinas e lactoferrina</i>	103
5	CONCLUSÃO	107
5.1	Sugestão de trabalhos futuros	108
	Referências bibliográficas	109
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	125

1 INTRODUÇÃO

O leite é um complexo alimento que fornece proteção imunológica e substâncias biologicamente ativas tanto para recém-nascidos quanto para os adultos (WARNER; KANEKANIAN; ANDREWS, 2001). Os componentes nutricionais e bioativos ajudam no desenvolvimento cognitivo, na prevenção de doenças, modulação da microflora intestinal e no desenvolvimento do sistema imunológico (CASADO; AFFOLTER; KUSSMANN, 2009).

A composição e concentração de alguns componentes presentes no leite variam em relação a espécie a fim de satisfazer as necessidades dos descendentes (FAO, 2013). Conhecer as diferenças entre os nutrientes do leite de várias espécies permite o desenvolvimento de produtos para consumidores com necessidades especiais, como por exemplo, a formulação de um produto que substitua o leite de vaca para pessoas com alergia a esse tipo de leite e os leites formulados que são desenvolvidos para reabilitação de desnutridos e outros grupos nutricionalmente vulneráveis (PARK; HAENLEIN, 2006).

Para a produção de fórmulas infantis o leite humano é usado como referência e o leite de vaca com fonte de proteínas (HERNELL, 2011). As fórmulas infantis são utilizadas como alternativa quando as mães não podem ou não querem amamentar (D'AURIA et al., 2005). Embora a composição das fórmulas infantis seja continuamente melhorada, com o desenvolvimento de um crescente conhecimento sobre o leite humano e nutrição infantil, diferenças entre esses dois produtos em relação à digestibilidade das proteínas, captação de aminoácidos e presença ou abundância de bioativos específicos são reconhecidas (SU et al., 2017).

Uma outra alternativa para alimentar os recém-nascidos que não podem receber o leite da própria mãe é o leite humano de doadoras dos Bancos de Leite Humano (BLHs) (QUIGLEY; MCGUIRE, 2014). Segundo Bourlieu et al. (2015), algumas das vantagens em alimentar os recém-nascidos com leite humano pasteurizado pelos BLHs em relação as fórmulas infantis é que o esvaziamento gástrico é mais rápido e a digestibilidade é melhor.

O leite humano doado aos BLHs deve ser pasteurizado antes de ser utilizado como alimento, pois, por ser rico em nutrientes, proporciona um ambiente ideal para crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos, cuja presença é

determinada pela saúde e higiene da lactante, condições de pré-armazenamento, equipamentos de armazenamento e meio ambiente.

A pasteurização lenta (62,5 °C/30 min), também conhecida como *Holder* foi o primeiro método utilizado para pasteurizar leite humano nos BLHs em todo mundo e no Brasil ainda é empregado. Esse método apesar de eficiente, acarreta a degradação de vitaminas, desnaturação das proteínas do soro (EWASCHUK, et al., 2011), reação de Maillard e reação de isomerização da lactose em lactulose (FAO, 2013).

Alguns estudos mostram que a utilização de outros tratamentos térmicos, como por exemplo, aquecimento por micro-ondas, apresentam vantagens em relação aos processos térmicos convencionais. Lopes-Fandino et al. (1996) compararam o efeito do tratamento térmico contínuo por micro-ondas com o convencional, em trocador de calor, e observaram uma menor desnaturação proteica no leite de vaca processado por micro-ondas, sendo esse resultado atribuído à melhor distribuição do calor e à ausência de superfícies quentes em contato direto com o produto, evitando o superaquecimento.

Outro exemplo é o estudo de Sierra, Vidal-valverde e Olano (1999) que avaliaram a influência dos tratamentos térmicos convencional e por micro-ondas sobre a retenção da vitamina B1 do leite de vaca e observaram que a retenção foi maior quando o leite foi submetido às micro-ondas. O curto intervalo de tempo para alcançar a temperatura máxima e o aquecimento mais uniforme foram considerados os responsáveis por esse resultado.

Na Figura 1.1 é evidenciado como os gradientes de temperatura se apresentam em um material aquecido em banho térmico e por micro-ondas. O aquecimento por micro-ondas aumenta simultaneamente a temperatura de todo o volume (Figura 1.1a) enquanto que no aquecimento convencional as paredes do vaso aquecem antes da mistura reacional (Figura 1.1b) (KAPPE, 2004).

Figura 1.1 – Diferentes perfis de temperatura após 1 min de aquecimento por micro-ondas (A) e em banho de óleo (B)

Fonte: Kappe (2004)

Mediante alguns resultados promissores com o processamento térmico assistido por micro-ondas em leite de vaca, o aquecimento descontínuo por micro-ondas focalizadas torna-se um processo alternativo para minimizar as perdas nutricionais e mais eficiente na inativação enzimática e microbiológica de leite humano em BLHs.

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi aplicar o aquecimento descontínuo por micro-ondas focalizadas em leite humano e avaliar o impacto desse processo sobre a composição de ácidos graxos, minerais (cálcio, cobre, ferro, fósforo, potássio, sódio e zinco), proteínas (imunoglobulinas e lactoferrina), compostos bioativos (oligossacarídeos) e sobre a inativação de micro-organismos como bactérias mesófilas, *Salmonella*, *Staphylococcus* e coliformes totais.

Para atender o objetivo geral, o trabalho foi dividido em etapas:

Etapas 1:

- Determinação experimental dos efeitos da temperatura e da frequência do campo eletromagnético sobre as propriedades dielétricas de diferentes tipos de leite de vaca (cru refrigerado tipo B, pasteurizado integral tipo A e pasteurizado semi-desnatado tipo A), fórmulas infantis para lactentes e em leite humano, no intervalo de temperatura de (5 a 90) °C e frequências de (500 a 3000) MHz.

- Estudo da influência da condutividade elétrica sobre o fator de perda nos diferentes tipos de alimentos.

Etapa 2:

- Estudo da influência de diferentes condições (temperatura-tempo) de processamento térmico assistido por micro-ondas sobre a atividade da enzima (ALP) em leite de vaca e humano.
- Determinação dos parâmetros cinéticos (valores de D e z) frente ao processamento térmico assistido por micro-ondas da ALP presente em leite de vaca e humano.

Etapa 3:

- Quantificação dos ácidos graxos, minerais (cálcio, cobre, ferro, fósforo, potássio, sódio e zinco), proteínas (imunoglobulinas e lactoferrina), compostos bioativos (oligossacarídeos) e micro-organismos presentes no leite humano antes e após o aquecimento por micro-ondas e comparação com os resultados obtidos pela pasteurização convencional (*Holder*), realizada nos BLH.
- Inoculação dos micro-organismos mais termorresistentes (*Salmonella* e *Staphylococcus*), a uma concentração de 6 log UFC/mL, para verificar a eficiência do processamento térmico assistido por micro-ondas na condição ótima.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo uma revisão bibliográfica sobre a composição do leite humano e de vaca, métodos de pasteurização, processamento térmico de alimentos, micro-ondas e propriedades dielétricas é apresentada.

2.1 Leite humano

Sob os pontos de vista nutricional, imunológico e de segurança, o leite humano é considerado o melhor alimento para crianças na primeira fase de sua vida (MEGRAUD et al., 1990). O leite humano protege contra infecções e alergias, favorece o vínculo mãe-filho, melhora o processo gastrointestinal e favorece os desenvolvimentos emocional, cognitivo e do sistema nervoso (ANDERSON; JOHNSTONE; REMLEY, 1999; CALHOUN et al., 2000).

Estudos mostram que os benefícios da amamentação não se restringem apenas aos lactentes, mas estendem-se as mães. Amamentar ajuda na perda de peso pós-parto (BAKER; MILLIGAN, 2008), previne doenças cardiovasculares (SCHWARTZ et al., 2009) e reduz o risco de desenvolver diabetes do tipo 2 (STUEBE et al., 2005) e câncer de mama (GODFREY; LAWRENCE, 2010).

A composição nutricional do leite humano varia conforme o período de lactação, idade gestacional, fase de uma mesma mamada e alimentação materna. Estas modificações ocorrem a fim de atender as necessidades nutricionais e imunológicas do lactente (BRASIL, 2009; HECK, 2007).

Com relação ao período de lactação, após o nascimento a secreção láctea apresenta as seguintes fases: colostro – secreção produzida até 5 dias após o parto com coloração amarela (Figura 2.1), devido ao alto teor de betacaroteno (BRASIL, 2009), que contém o mais alto teor de proteínas, principalmente as imunoglobulinas e a lactoferrina, vitaminas lipossolúveis e minerais. Seu conteúdo de lipídios (2 g/100 g) é inferior ao do leite maduro (4 g/100 g); leite transicional - secreção produzida entre o (6º e o 15º) dia após o parto. O teor de imunoglobulinas diminui, enquanto que o da lactose, de lipídios e calorias totais aumenta. É a fase mais variável entre as lactantes; e leite maduro - produzido após o 15º dia de lactação e se comparado ao colostro é uma secreção mais líquida (PONS et al., 2000). Apesar do leite maduro

apresentar em média 87 g/100 g de água, a matéria seca (13 g/100 g) é composta por substâncias fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da criança (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Figura 2.1 – Fases da secreção láctea

Fonte: A autora (2017)

Nos primeiros dias pós-parto as glândulas mamárias são capazes de produzir de (2 a 20) mL de leite por mamada e as mulheres que já amamentaram podem produzir até 40 mL por mamada (CAMELO; HECK, 2007). Ao longo dos primeiros seis meses de amamentação, a lactante produz de (700 a 900) mL/dia de leite e a partir desse período a produção pode atingir até 600 mL/dia (VALDÉS; SANCHES; LABBOK, 1996).

2.1.1 *Composição do leite humano*

O leite humano é um líquido rico em lipídios, minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas que protegem o recém-nascido contra doenças. Compreender a composição do leite humano torna-se uma ferramenta importante para a gestão da alimentação infantil, especialmente para crianças prematuras, e permite entender como o armazenamento e a pasteurização influenciam os seus componentes (BALLARD; MORROW, 2013).

2.1.1.1 Proteínas

Entre os leites dos mamíferos o leite humano possui o menor teor de proteínas totais, sendo compatível com o crescimento relativamente lento do recém-nascido. Em sua composição química, há em média 1,2 g de proteínas em 100 mL de leite humano (NASCIMENTO; ISSLER, 2004).

As proteínas são classificadas em dois tipos principais: caseína e proteínas do soro de leite. Ao contrário do leite de vaca, aproximadamente dois terços das proteínas no leite humano são proteínas do soro. As proteínas mais representativas do soro de leite humano são α -lactalbumina, lactoferrina e imunoglobulinas (SHI et al., 2011).

Algumas proteínas do leite humano, como a α -lactalbumina, lactoferrina e caseína, são sintetizadas pela glândula mamária, enquanto outras, como a albumina sérica, são derivadas do sangue da mãe (LÖNNERDAL; FORSUN; HAMBRAEUS, 1976).

Imunoglobulinas, lactoferrina e α -lactalbumina, bem como outras proteínas com atividade antimicrobiana, como exemplo, a lisozima e a lactoperoxidase, são relativamente resistentes à proteólise no trato gastrointestinal e contribuem para a defesa dos lactentes contra bactérias e vírus patogênicos (LÖNNERDAL, 2003). As fórmulas infantis para lactentes não contêm esta gama de proteínas (URUAKPA; ISMOND; AKOBUNDU, 2002).

A imunoglobulina IgA, lisozima e lactoferrina têm atividade antimicrobiana notável. A IgA funciona essencialmente por ligação direta a antígenos microbianos específicos, a lisozima age degradando a parede celular externa de bactérias Gram-positivas, causando a lise da parede celular bacteriana, e a lactoferrina, dentre outras funções, tem um grande potencial contra o desenvolvimento de câncer e metástase (RODRIGUES; FERREIRA, 2010).

2.1.1.2 Lipídios

O leite humano contém em média de (3 a 5) g/100 g de lipídios, dentre os quais 98 % são compostos por triacilgliceróis (CHANG; ABRAHAM; JOHN, 1990; YANG et al., 2003), 1,3 % de fosfolipídios e 0,4 % de colesterol (JENSEN et al., 1990). Os ácidos graxos representam 90 % dos triacilgliceróis e 88 % dos lipídios totais. Os lipídios presentes no leite humano são a principal fonte de energia para o

recém-nascido (aproximadamente 50 % das calorias totais), constituídos de ácidos graxos essenciais, como os ácidos linoleico (C18:2 n-6) e alfa-linolênico (C18:3 n-3), participam do transporte de vitaminas (A, D, E e K) e hormônios lipossolúveis (JENSEN; HAGERTY; MCMAHON, 1978).

O teor de lipídios varia de acordo com o tempo de duração da lactação, ao longo do período do dia (JENSEN; HAGERTY; MCMAHON, 1978; HALL, 1975; HARZER et al., 1983) e em relação ao tempo entre o início e o fim da mamada (KOLETZKO; THIEL; ABIODUM, 1992). A concentração dos triacilgliceróis aumenta de aproximadamente 30 g/L no colostro para 35 g/L no leite transicional e para 40 g/L no leite maduro (JENSEN et al., 1990; SMIT et al., 2002).

Os ácidos graxos são em sua maioria de cadeia longa, com cerca de 50 % de saturados e 50 % de insaturados. Mais de 200 ácidos graxos já foram identificados no leite humano, sendo que apenas sete correspondem em média a 90 % do total, representados pelos ácidos oleico, palmítico, láurico, linoleico, mirístico, esteárico e cáprico. Os ácidos graxos de cadeia média (C6 – C12) representam cerca de 7 % (JENSEN et al., 1990).

2.1.1.3 Minerais

A composição do leite humano, especialmente quanto à presença de micronutrientes é muito variada (BENEMARIYA; ROBBERECHT; DEELSTRA, 1995; DOREA, 2000) e pode ser influenciada por diversos fatores, como a individualidade genética, a nutrição materna e o período de lactação (EMMETT, 1997; PICCIANO, 2001).

Os minerais são importantes para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde dos tecidos corporais (AL-AWADI; SRIKUMAR, 2000). São classificados em macro elementos o sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, entre outros, e microelementos ou elementos traços, o cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco e outros.

A ingestão materna de certos minerais como cálcio, magnésio e zinco não afeta a concentração do leite humano (GARG; THIRUPURAM; SAHA, 1988; AGGETT et al., 1980), porém há evidências de que a concentração de selênio no leite humano é afetada pela dieta materna (FUNK et al., 1990).

A necessidade de micronutrientes para o recém-nascido é maior do que em crianças e adultos devido ao rápido crescimento corporal, alto nível de atividade dos caminhos metabólicos envolvidos no crescimento, combate a infecções, entre outros. O atendimento a essa demanda é feito pelo leite humano até que chegue a época do desmame (BATES; PRENTICE, 1994).

2.1.1.4 Carboidratos

O principal carboidrato no leite humano é a lactose e mais de 30 açúcares já foram identificados, como a galactose, frutose e outros oligossacarídeos. Os oligossacarídeos, que são complexos carboidratos formados por glicose, galactose, N-acetilglucosamina, fucose e ácido siálico, são cada vez mais reconhecidos como componentes bioativos porque funcionam como substratos de crescimento seletivo para bactérias benéficas específicas no sistema gastrointestinal (ZIVKOVIC; BARILE, 2011).

De um modo geral, os oligossacarídeos atuam como prebióticos manipulando a microbiota intestinal. Os seres humanos não possuem enzimas para digerir os oligossacarídeos e, conseqüentemente, estas moléculas chegam até o intestino posterior onde promovem o crescimento de micro-organismos como o *Bifidobacterium spp.*, que metaboliza oligossacarídeos em ácidos graxos de cadeia curta para que possam ser utilizados pelo hospedeiro (SMILOWITZ et al., 2014). Estudos mostram que uma microbiota infantil saudável é composta principalmente de bifidobactérias e lactobacilos. Esta composição tem sido proposta como importante para o desenvolvimento de um sistema imunológico totalmente funcional (SEIFERT; WATZL, 2007). Alterações na microbiota do intestino infantil a partir desta composição têm sido associadas ao desenvolvimento de alergias e outras doenças (NAGLER, 2001; BJÖRKSTÉN, 1999; KALLIOMAKI et al., 2001).

A quantidade de oligossacarídeos em leite humano varia de (1 a 10) g/L na fase maduro e de (15 a 23) g/L na fase colostro (MARTIN-SOSA et al., 2003). Embora as porções de oligossacarídeos presentes no leite tendem a variar entre as espécies, a sua presença exerce efeito fisiológico semelhante, independente da espécie animal.

2.2 Leite de vaca

Desde os primórdios da civilização, o leite tem sido usado como alimento básico na dieta humana devido ao seu alto valor nutritivo, principalmente em relação aos seus teores de proteínas, carboidratos, lipídios, aminoácidos essenciais, vitaminas, sais minerais e água (LEITE et al., 2002).

Apesar dos muitos benefícios, o consumo de leite de vaca por crianças antes de 12 meses de idade pode estar associado com a perda de sangue nas fezes e menor quantidade de ferro no organismo (ZIEGLER et al., 1990; ABRAMS; GRIFFIN; DAVILLA, 2002), pois há evidências de que o elevado consumo de cálcio interfere na absorção de ferro (DROR; ALLEN, 2011). Em comparação com o leite humano, o leite de vaca apresenta alta carga de soluto renal para crianças, devido a maior concentração de minerais e proteínas, e por esse e outros motivos, diretrizes internacionais e políticas nacionais (BRASIL, 2008) recomendam o aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade.

2.2.1 Composição do leite de vaca

O leite de vaca é composto, em média, de 87 % de água e 13 % de sólidos totais, assim distribuídos: proteínas totais, (3,3 a 3,5) %; lipídios, (3,5 a 3,8) %; lactose, 4,9 %; além de minerais, 0,7 % e vitaminas (SGARBIERI, 2004).

A fase de lactação representa um importante fator de variação na composição do leite vaca. Pesquisas indicam que os valores de proteína, lipídios e lactose aumentam no decorrer do período de lactação (AGANGA; AMARTEIFIO; NKILE, 2002; PRASAD; SENGAR, 2002).

O leite de vaca contém, aproximadamente, 3,3 g/100 g de proteínas, das quais 80 % são constituídas pelas caseínas e 20 % pelas proteínas do soro. A caseína pode ser definida como a fração da proteína do leite que precipita em pH = 4,6 a 20 °C; enquanto que o restante não precipita e são chamadas coletivamente de proteínas do soro (FARREL et al., 2004).

Com relação ao conteúdo vitamínico, Lobato (2000) ressalta que o leite de vaca, embora contenha a maioria das vitaminas, só pode ser considerado uma boa fonte de vitamina A, riboflavina (B2) e cianocobalamina (B12), sendo classificado

como alimento deficiente em relação as vitaminas C e D e nas demais do complexo B.

A lactose, um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma de glicose, é o principal carboidrato do leite (SANVIDO, 2007) e não apresenta grandes variações em seus teores entre as raças bovinas (RAIMONDO, 2006).

Os lipídios do leite de vaca são constituídos principalmente por triglicerídeos, cerca de 98%, entretanto outros componentes lipídicos menores são mais atraentes do ponto de vista dos alimentos funcionais, como por exemplo os ácidos linoleicos, que apresentam benefícios para a saúde, incluindo efeitos anticarcinogênicos, antidiabetogênicos e imunomoduladores (BENJAMIN; SPENER, 2009).

Pesquisas mostram que o leite de vaca contém oligossacarídeos que são análogos aos encontrados no leite humano, sugerindo um papel protetor similar (GOPAL; GILL, 2000; TAO et al., 2008; TAO et al., 2010). Nos Estados Unidos existem indústrias que estão investindo em pesquisas para aprimorar o processo de extração de oligossacarídeos em leite de vaca para utilização na formulação de fórmulas infantis para lactentes (ZIVKOVIC; BARILE, 2011).

2.3 Métodos de pasteurização

No início do século XX, a comunidade científica mundial reconheceu a pasteurização do leite como método importante no controle à alta incidência de doenças diretamente relacionadas ao consumo de leite cru e determinou padrões comerciais para seu tratamento térmico, o que resultou em um decréscimo significativo das doenças transmitidas pelo leite (STABEL, 2003).

A determinação do tempo e temperatura de pasteurização do leite de vaca teve como principal parâmetro a resistência térmica do *Mycobacterium* spp. e da *Coxiella burnetti*. O primeiro padrão, estabelecido em 1924, indicava que o aquecimento a 61,7 °C por 30 min eliminava o *Mycobacterium tuberculosis* (NORTH; PARK, 1927), porém, mais tarde verificou-se que, nestas condições, a *Coxiella burnetti* sobrevivia (HUEBNER et al., 1949); tal fato determinou o aumento da temperatura para 62,8 °C por 30 min como padrão oficial nos Estados Unidos (STABEL, 2003) afim de garantir que a *Coxiella burnetti* fosse eliminada.

Na indústria, para indicar a eficiência da pasteurização, é feita a verificação da atividade residual da fosfatase alcalina (ALP), que é uma enzima termo sensível que está presente naturalmente no leite cru. Por ser mais resistente ao calor que o *Mycobacterium* spp., presume-se que se a ALP foi inativada outras espécies menos resistentes ao tratamento térmico também foram destruídas (BEHMER, 1991).

Existem dois métodos de pasteurização: a pasteurização lenta, na faixa de (62 a 63) °C durante (30 a 35) min, também conhecida como pasteurização LTLT (*Low Temperature, Long Time* ou temperatura baixa, tempo longo); e a pasteurização rápida, na faixa de (72 a 75) °C, durante (15 a 20) s, também conhecida como pasteurização HTST (*High Temperature, Short Time*, ou alta temperatura, tempo curto. Nesses dois métodos acontecem mudanças nas características sensoriais e/ou no valor nutricional (SANVIDO, 2007).

Quando um tratamento térmico mais severo é desejado, para prolongar a vida de prateleira ou inativar esporos termorresistentes, opta-se pelo processo de esterilização UHT (*Ultra High Temperature*). Este processo, também conhecido como *esterilização comercial*, inativa os micro-organismos e esporos do produto, que se presentes, seriam capazes de desenvolver-se no alimento sob condições de armazenagem definidas (FELLOWS, 2006).

Em geral, tratamentos térmicos são tradicionalmente aplicados para pasteurizar ou esterilizar o alimento, geralmente com perdas de qualidade sensorial e nutricional. Com a tendência de hábitos saudáveis e busca por alimentos minimamente processados, que possuem características do produto *in natura*, muitos estudos estão sendo realizados para otimizar as condições de pasteurização. Dessa forma, surgiram outras tecnologias para processamento de alimentos como tentativa de complementar ou até mesmo substituir a pasteurização térmica convencional, como por exemplo, aquecimento por micro-ondas, ôhmico, radiofrequência, exposição a radiação UV, irradiação e filtração por membranas (LOPES et al., 2016).

2.3.1 Tratamento térmico do leite humano em Bancos de Leite Humano (BLH)

O primeiro Banco de Leite Humano (BLH) surgiu em Viena, Áustria, em 1909 e logo após, em 1910, o segundo BLH foi criado em Boston, Massachusetts, EUA.

Na Europa existem 221 BLHs e a maioria surgiu durante a segunda parte do século XX (EMBA, 2017). No Brasil existe, desde 1998, a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH-BR), coordenada pela FIOCRUZ (Fundação Instituto Oswaldo Cruz), na qual estão cadastradas 220 unidades de BLH. Os BLHs tem como missão promover e apoiar o aleitamento materno, coletar e distribuir o leite humano com qualidade, sem fins lucrativos, e contribuir para diminuição da mortalidade infantil (rBLH-BR, 2017). Em 2016, os BLHs de todo Brasil distribuíram um total de mais de 138 mil litros de leite humano proveniente de mais de 173 mil doadoras (rBLH-BR, 2017).

O leite humano proveniente dos BLHs não deve conter patógenos e deve manter a capacidade antibacteriana e preservar proteínas imunes, como imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima, contribuindo para a proteção do recém-nascido contra a infecções (PICAUD; BUFFIN, 2017). Para fornecer leite humano seguro e de alta qualidade, muito cuidado deve ser tomado em todas as etapas do processo que inclui seleção de doadoras, coleta, armazenamento, tratamento e distribuição (BRASIL, 2008).

O tratamento térmico mais comum utilizado pelos BLHs é a pasteurização à baixa temperatura (62,5 °C) e longa duração (30 minutos) (*Low-Temperature Long-Time*, LTLT) também conhecida como pasteurização *Holder* (HMBANA, 2013).

Como o tratamento térmico *Holder* oferece a melhor relação entre a segurança microbiológica e a preservação de alguns componentes importantes do leite, a maioria dos BLHs em todo o mundo utiliza esse processo térmico (HMBANA, 2013).

Apesar do tratamento térmico *Holder* prolongar a vida útil dos produtos e reduzir o risco de transmissão de micro-organismos patogênicos pelos alimentos, também causa redução de alguns componentes biologicamente ativos que são cruciais para a defesa contra infecções, tais como imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG), lactoferrina, lisozima e linfócitos (GOELZ et al., 2009; CONTADOR et al., 2013).

Ford et al. (1977) estudaram a influência de diferentes condições de aquecimento, variando o tempo e temperatura dos processos em (56 e 62,5) °C por 30 min e (65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 100) °C por 15 min, sobre alguns componentes protetores, como imunoglobulinas, em leite humano. Os autores observaram que com o aumento da temperatura ocorreu redução do teor das imunoglobulinas, chegando a 100 % a 100 °C e que no processo térmico a 62,5 °C por 30 min

(pasteurização *Holder*) ocorreu uma redução de 20 % do teor da IgA e redução total da IgM.

Moltó-Puigmartí et al. (2011), em busca de uma alternativa não térmica de processamento do leite humano, compararam os efeitos da pasteurização lenta e do processamento de alta pressão (*High Pressure Preservation* – HPP) sobre os teores de ácidos graxos e vitamina C em leite humano. Os autores concluíram que os dois processos não modificaram os teores de ácidos graxos e que a quantidade total de vitamina C foi mantida somente após o HPP. A pasteurização lenta resultou em uma redução de 20 % do teor de vitamina C em relação ao leite não tratado.

Considerando a responsabilidade dos BLHs em fornecer leite humano cujas características favoreçam o crescimento e desenvolvimento do lactente, faz-se necessário desenvolver processos que reduzam as perdas nutricionais e destrua a flora microbiana patogênica.

2.4 Processamento térmico de alimentos

O processamento térmico causa desnaturação de proteínas que consequentemente reduz a atividade enzimática e os metabolismos controlados por enzimas. De acordo com Stumbo (1973), Haug (1993) e Van Loey et al. (2003) a cinética de inativação térmica de muitos micro-organismos pode ser descrita assumindo um decaimento de primeira ordem, conforme a eq. (1).

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (1)$$

em que:

k é a constante de velocidade de 1º ordem (s^{-1})

N é o indicador biológico do processo (número de viáveis do micro-organismo patogênico/deteriorador, atividade da enzima ou nutriente termolábil)

t é o tempo de processo (min ou s)

Esta equação é válida para sistemas que exibem curvas de sobrevivência tipo exponencial à temperatura constante. Isto significa que quando uma população microbiana é exposta a altas temperaturas, o número de células vivas decresce gradualmente, de maneira que o logaritmo do número de células sobreviventes em

um dado momento, decresce linearmente em relação ao tempo, como pode ser verificado na Figura 2.2. Isso é conhecido como ordem logarítmica de morte e é descrita pela curva da taxa de letalidade (FELLOWS, 2017).

O tempo necessário para destruir 90 % dos micro-organismos (reduzir seu número por um fator de 10) é referido como *tempo de redução decimal* ou valor D . Valores de D variam para diferentes espécies microbianas e um maior valor de D indica maior resistência ao calor (LEWIS; HEPPELL, 2000).

A destruição dos micro-organismos depende da temperatura; as células morrem mais rapidamente em temperaturas elevadas. De valores de D obtidos de diferentes temperaturas, pode-se construir uma curva de *tempo de destruição térmica* (TDT). Da inclinação da curva de TDT o valor z é obtido e definido como número de graus Celsius necessários para alterar 10 vezes o tempo de redução decimal (Figura 2.3). Os valores D e z são utilizados para determinar a resistência térmica de um micro-organismo e sua dependência da temperatura, respectivamente (FELLOWS, 2006).

Figura 2.2 – Curva da taxa de letalidade

Fonte: Adaptado de Fellows (2017)

Figura 2.3 – Curva de tempo de destruição térmica

Fonte: Adaptado de Fellows (2017)

2.4.1 Cálculo do tempo de destruição térmica

A eq. (1) representa a cinética de destruição térmica considerando cinética de primeira ordem (TOLEDO, 1999).

Rearranjando a equação e integrando a equação diferencial, tem-se desde $t = 0$ e $N = N_0$ até $t = t$ e $N = N$

$$-\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = k \int_0^t dt \quad (2)$$

O que resulta:

$$\ln N = -kt + C \quad (3)$$

Se for considerado que no tempo t_0 a população inicial é igual a N_0 e desde que a equação esteja na forma logarítmica, pode-se ajustar a constante C para $\ln N_0$, ficando a eq. (3) igual a:

$$\ln N = -kt + \ln N_0 \quad (4)$$

A partir deste modelo linear, pode-se determinar duas das principais variáveis no tratamento térmico de destruição dos micro-organismos: D e z .

Inicialmente deve-se rearranjar a eq. (4), levando em consideração a presença de uma população inicial de micro-organismos (N_0) e uma população final (N) (TOLEDO, 1999):

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad (5)$$

A eq. (5) pode ainda ser expressa baseada no logaritmo decimal, conforme indicado pela eq. (6), pois $\ln x = 2,303 \log x$.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{k}{2,303}t \quad (6)$$

em que k representa o grau de inclinação da curva de sobrevivência.

A eq. (7) representa a eq. (6) quando $t = D$ e assumindo que o número final de micro-organismos, N , é reduzido a 10 % do valor inicial.

$$\log\left(\frac{0,1N_0}{N_0}\right) = -\frac{k}{2,303}D \quad (7)$$

em que D é o tempo de redução decimal a uma determinada temperatura.

A partir da eq. (7) tem-se a eq. (8) que relaciona o valor da constante cinética da reação, k e o tempo de redução decimal, D .

$$k = \frac{2,303}{D} \quad (8)$$

Substituindo a eq. (8) na equação (6), tem-se a eq. (9)

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (9)$$

A notação é feita na forma de D_T , por exemplo, $D_{121^\circ\text{C}} = 1$ min. Se o valor de $\log D_T$ for plotado em diferentes temperaturas em um gráfico semilogarítmico, será obtida uma reta (Figura 2.3). Da inclinação dessa reta para um ciclo log obtém-se o valor de z .

Pela curva de tempo de destruição térmica (Figura 2.3) nota-se que:

$$\tan(\phi) = \frac{(\log D_2 - \log D_1)}{T_2 - T_1} = \frac{1}{z} \quad (10a)$$

Ou considerando uma temperatura de referência (T_{ref}):

$$D_T = D_{T_{\text{ref}}} 10^{\frac{(T_{\text{ref}} - T)}{z}} \quad (10b)$$

O parâmetro z indica a variação da taxa de morte térmica com a temperatura, representando o aumento ou a diminuição da temperatura necessária para reduzir ou aumentar o valor do tempo de redução decimal D_T .

Uma outra maneira de determinar se o processamento térmico foi adequado para um dado indicador biológico é determinar o valor de esterilização (SV) (eq. 11), que é definido para garantir que micro-organismos deterioradores ou patogênicos não proliferem nas condições normais de armazenamento do produto (GUT; TADINI, 2015).

$$SV = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (11)$$

Também pode ser utilizado para apresentar o grau de esterilização o valor F . Esta variável é definida como o tempo necessário de processo isotérmico na temperatura do processo para atingir o valor de esterilização desejado (eq. 12) (GUT; TADINI, 2015).

$$F = SV \times D \quad (12)$$

2.4.2 Letalidade do processo não isotérmico

Em um processo térmico com temperatura variável deve-se considerar o histórico de temperatura não isotérmico do alimento. Para garantir a confiabilidade do histórico de temperatura é necessário que a temperatura seja uniforme por meio da homogeneização do alimento, ou que o sistema de aquisição de dados esteja localizado no ponto de aquecimento mais lento do alimento.

Dessa forma, a variável $F_{T_{ref}}$ representa a letalidade (efeito integrado do tempo e da temperatura sobre os micro-organismos) do processo não isotérmico com o mesmo efeito letal de um processo isotérmico na temperatura de referência T_{ref} (LEWIS; HEPPELL, 2000).

$$F_{T_{ref}} = \int_0^{\infty} L \, dt = \int_0^{\infty} 10^{\frac{(T(t)-T_{ref})}{z}} \, dt \quad (13)$$

Em que L , $T(t)$ e T_{ref} representam a letalidade do processo, o histórico de temperatura e a temperatura de referência do processo, respectivamente.

A eq. (13) permite avaliar também a letalidade do tratamento térmico que ocorre nas seções de aquecimento, resfriamento e retenção, em um típico trocador de calor para pasteurização de alimentos líquidos.

2.5 Micro-ondas

O forno de micro-ondas tornou-se um equipamento indispensável em muitas residências no século XXI e o principal fator que suporta a popularidade desse equipamento é a rapidez para aquecer e descongelar os alimentos (WHO, 2015).

Aplicações industriais utilizando aquecimento por micro-ondas também aumentaram nos últimos anos e unidades de processamento de alimentos foram desenvolvidas para descongelamento (SHAHEEN et al., 2012; LLAVE et al., 2014), branqueamento (KOWALSKA; LENART; LESZCZYK, 2008; XIN et al., 2015), cozimento (KIRMACI; SINGH, 2012; YOLACANER; SUMNU; SAHIM, 2017), secagem (ZHU et al., 2012; JIANG et al., 2016), pasteurização (AWUAH et al., 2005; HOU; JOHNSON; WANG, 2016) e extração de compostos bioativos (KRISHNASWAMY et al., 2013; GUAN et al., 2011), apresentando vantagens em relação aos processamentos térmicos convencionais, como por exemplo, a redução do tempo de processamento, melhora na qualidade do alimento e maior eficiência energética (ZHANG; JIANG; LIM, 2010; JIANG et al., 2016). No entanto, o desenvolvimento e implementação de tecnologias industriais utilizando micro-ondas ainda é lento devido aos elevados custos do equipamento e operacional, problemas de segurança, relacionados a vazamento das micro-ondas durante o processamento

(WRAY; RAMASWAMY, 2015) e aquecimento não uniforme e de difícil previsão (WANG et al., 2007; ALFAIFI et al., 2014).

Segundo Wang et al. (2007), o aquecimento não uniforme pode ser evitado através do conhecimento sobre as propriedades físicas, térmicas e dielétricas do alimento, além dos parâmetros dos desenhos da guia de onda, do tubo aplicador e da câmara de ressonância.

2.5.1 Mecanismos de geração de micro-ondas

As micro-ondas fazem parte do espectro eletromagnético, dentro de uma frequência de oscilação de 300 MHz até 300 GHz e comprimento de onda entre 1 mm e 1 m (MUDGETT, 1985). Nesse intervalo do espectro eletromagnético existem frequências usadas para comunicação de telefones celulares, radares e satélites de televisão (VAN LOOCK, 2006). Na Figura 2.4 ilustra-se o espectro eletromagnético, com destaque para a faixa de frequência das micro-ondas.

Figura 2.4 – Espectro eletromagnético

Fonte: adaptado de Rao, Rizvi e Datta (2005)

As ondas eletromagnéticas são uma forma de energia oscilatória constituída por campos elétrico e magnético que se propagam no espaço. Se essas ondas estão em um mesmo plano, ou seja, se os deslocamentos estão sempre no plano XY pode-se dizer que o movimento ondulatório é polarizado linearmente (GOMES, 2002).

Na Figura 2.5, a seta ϵ representa o campo elétrico; a $\mathcal{H}$, o campo magnético e o λ , o comprimento de onda. Os dois campos, elétrico e magnético, da onda plana

estão perpendiculares entre si. Portanto, a onda está polarizada no plano XY (BOGDAL; PROCIK, 2007).

Figura 2.5 – Oscilação dos campos elétrico e magnético na radiação eletromagnética

Fonte: Adaptado de Bogdal e Prociak (2007)

Os fornos de micro-ondas domésticos utilizam ondas eletromagnéticas com frequência de 2450 MHz e a primeira frequência liberada para aplicações em escala industrial nas Américas foi de 915 MHz (ORSAT; RAGHAVAN; KRISHNASWAMY, 2017). Na Tabela 2.1 pode ser visto uma lista com várias frequências de ondas eletromagnéticas determinadas pela FCC (*Federal Communications Commission*), que são permitidas para uso industrial, doméstico, médico e científico em diferentes países

Tabela 2.1 – Frequências de ondas eletromagnéticas permitidas para uso industrial, médico e científico em diferentes países

Frequência (MHz)	Área
433,92	Áustria, Holanda, Portugal, Alemanha e Suíça
896	Reino Unido
915	América do Norte e do Sul
2375	Albânia, Bulgária, Hungria, Romênia e Rússia
2450	Todos os países, exceto onde é usado 2375 MHz
3390	Holanda
5800	Todos os países
6780	Holanda
24150	Todos os países
40680	Reino Unido

Fonte: Adaptado do Orsat, Raghavan e Krishnaswamy (2017)

As micro-ondas são geradas através do magnetron que é constituído por ânodo, cátodo, antena e ímãs permanentes (Figura 2.6). O ânodo é uma peça metálica oca, geralmente feita de cobre ou ferro, contendo um número par de aletas na sua cavidade, apontando para o cátodo. O cátodo é um filamento que é o emissor de elétrons e fica localizado no centro da cavidade do magnetron. A antena fica ligada a uma aleta do ânodo e é responsável por conduzir as micro-ondas para a parte externa do magnetron (LOVE, 1995).

Figura 2.6 - Magnetron

Fonte: Dean (2012)

Uma análise detalhada do funcionamento do magnetron revela que o cátodo, quando aquecido, emite elétrons. Ele está ligado ao pólo negativo submetido a uma voltagem de 4.000 V em relação ao ânodo (ORSAT; RAGHAVAN; KRISHNASWAMY, 2017). Os elétrons são emitidos em direção ao ânodo, porém o campo magnético criado pelos dois ímãs circulares posicionados entre o cátodo e o ânodo, aplica uma força magnética sobre estes elétrons, obrigando-os a descrever uma trajetória circular antes de, eventualmente, alcançar o ânodo (Figura 2.7) (VENKATESH; RAGHAVAN, 2005; ORSAT; RAGHAVAN; KRISHNASWAMY, 2017).

Figura 2.7 – Nuvem de elétrons raiada sendo emitida pelo cátodo do magnetron

Fonte: Mai (2008)

Na realidade, não é apenas um elétron emitido que se move na cavidade do magnetron, mas um aglomerado deles que se movem juntos, ejetados a partir do cátodo devido à diferença de potencial existente, movendo-se no sentido radial e influenciados pelo campo magnético dos ímãs permanentes. Essa aglomeração de elétrons de alta energia gira no espaço da cavidade, localizado entre o cátodo e o ânodo, e eventualmente alcança o ânodo (LOVE, 1995). Enquanto os elétrons giram na cavidade e passam próximos das aletas, eles vão alternando as cargas elétricas positivas e negativas, conforme mostra a Figura 2.7. Essa oscilação produzida pela alternância entre cargas positivas e negativas nas aletas funciona como circuito ressonante, que é repetido 2.450.000.000 vezes por segundo e gera micro-ondas de alta frequência (2,45 GHz) (VENKATESH; RAGHAVAN, 2005). A antena capta e irradia a energia dessas ondas para a câmara do forno através do guia de ondas, que nada mais é do que um tubo de metal retangular ou cilíndrico (SCAMAN, 2014).

2.5.2 Mecanismos de aquecimento por micro-ondas

O aquecimento de alimentos por micro-ondas é um complexo processo que depende da propagação das micro-ondas, governada pelas equações de Maxwell para ondas eletromagnéticas, e interação entre as micro-ondas e o alimento, determinada pelas propriedades dielétricas e pela dissipação do calor, que é governada pelas teorias de transferência de massa (TANG et al., 2002).

Segundo a literatura, conhecer a composição do alimento é importante para compreender como ocorrem os mecanismos de interação entre os componentes dos alimentos e as micro-ondas; dessa forma é possível identificar produtos e processos que possam ser submetidos a esse método de processamento de maneira eficaz (ORSAT; RAGHAVAN; KRISHNASWAMY, 2017).

Os principais mecanismos que contribuem para a transformação de energia eletromagnética em energia térmica são a polarização de dipolo e condução iônica.

Na polarização de dipolo, as moléculas polares presentes no alimento, como por exemplo, a água, quando expostas a um campo elétrico alternado em alta frequência (2450 MHz), oscilam (rotação de dipolo) para acompanhar a mudança de sentido do campo (Figura 2.8). A energia associada com a movimentação destas moléculas e o atrito entre elas é dissipada na forma de calor, o que provoca um aumento da temperatura do alimento (RYYNÄNEN, 1995; TEWARY, 2007).

Figura 2.8 – Distribuição das moléculas polares submetidas a um campo elétrico

Fonte: A autora (2017)

Na condução iônica, a polarização é causada por deslocamento dos íons presentes em um alimento em resposta a um campo elétrico aplicado (RYYNÄNEN, 1995; TEWARY, 2007; VENKATESH; RAGHAVAN, 2005). O calor é gerado pela interação do campo elétrico com os íons positivos e negativos presentes no alimento. A migração dos íons para regiões carregadas positiva ou negativamente e a colisão com outras moléculas provoca o aquecimento.

Além da composição do alimento, a geometria, o volume e a área superficial, são fatores críticos que afetam a quantidade e distribuição da energia absorvida. Produtos com geometrias regulares apresentam um aquecimento mais uniforme. Se

o tamanho do alimento a ser aquecido for muito maior que o comprimento de onda, a profundidade de penetração das micro-ondas será prejudicada e o aquecimento não será uniforme. Neste caso, o centro do alimento será aquecido por condução de calor e não por radiação (HEDDLESON; DOORES, 1994).

2.6 Propriedades dielétricas de alimentos líquidos

As propriedades dielétricas fornecem informações sobre como os materiais interagem com a energia eletromagnética durante o aquecimento. Essa propriedade juntamente com as propriedades térmicas e físicas e com as características do campo eletromagnético, determinam como será o comportamento do alimento quando submetido ao tratamento térmico por micro-ondas (TANG et al., 2002; SOSA-MORALES et al., 2010).

As propriedades dielétricas variam significativamente com a frequência do campo e a temperatura. Portanto, devem ser conhecidas em uma ampla faixa de temperatura, para permitir predição adequada do comportamento de um alimento quando aquecido por micro-ondas (HEDDLESON; DOORES, 1994).

As propriedades dielétricas de interesse básico no processo de alimentos são normalmente descritas em termos de permissividade relativa complexa, $\hat{\epsilon}$ (eq. 14) (MUDGET, 1985; WANG et al., 2003):

$$\hat{\epsilon} = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (14)$$

Em que: $j = \sqrt{-1}$.

A parte real da permissividade relativa complexa, ϵ' , conhecida como permissividade elétrica relativa, descreve a habilidade de um material armazenar energia em resposta ao campo eletromagnético aplicado. A parte imaginária, ϵ'' , conhecida como fator de perda dielétrica descreve a habilidade de um material dissipar energia em resposta ao campo eletromagnético aplicado, resultando em geração de calor. A razão entre o fator de perda dielétrica e a permissividade elétrica relativa é definida como tangente de perda (eq. 15), ou fator de dissipação e está relacionado à habilidade do material em converter energia eletromagnética em calor.

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (15)$$

Uma substância com alta permissividade elétrica relativa irá absorver radiação com elevada eficiência e conseqüentemente aquecer mais rapidamente. Geralmente, os solventes polares, como álcoois e ácidos têm valores elevados de permissividade elétrica relativa, diferente dos solventes apolares, como hexano e tolueno, que possuem valores de ε' muito baixos (KAPPE, 2004).

A profundidade de penetração das micro-ondas é determinada pela permissividade elétrica relativa e pelo fator de perda dielétrica (FELLOWS, 2006) e é definida como a profundidade na qual a energia apresenta uma redução de $1/e = 36,8 \%$ ($e = 2,7183$) em relação a energia incidente na superfície do material (YAM; LAI, 2006). A profundidade de penetração é dependente da frequência do campo (FELLOWS, 2006), e segundo Nelson e Datta (2001) pode ser calculada com a eq. (16), derivada das leis de Maxwell para o eletromagnetismo:

$$d_p = \frac{c}{2\pi f \sqrt{2\varepsilon' \left[\sqrt{1 + \left(\frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}\right)^2} - 1 \right]}} \quad (16)$$

Em que:

d_p = profundidade de penetração (m)

c = velocidade da luz no espaço ($3 \cdot 10^8$ m/s)

f = frequência (Hz)

Como a profundidade de penetração é inversamente proporcional à frequência, uma penetração mais profunda é obtida em frequências mais baixas e as frequências mais altas resultam em maior aquecimento superficial (WANG et al., 2009).

A medição das propriedades dielétricas é necessária para simulação, aplicação e compreensão bem sucedida do aquecimento por micro-ondas (WANG et al., 2009). Os três métodos mais utilizados para medir as propriedades dielétricas de alimentos na faixa de frequência de (500 a 3000) MHz são: linha de transmissão, cabo coaxial aberto e perturbação em cavidade de ressonância (WANG et al., 2003).

O método do cabo coaxial aberto é a técnica usada com mais frequência devido ao seu baixo custo e fácil preparação das amostras (SOSA-MORALES et al., 2010). Nesse método as propriedades dielétricas são determinadas a partir das características (fase e amplitude) do sinal refletido no final do cabo coaxial aberto que está mergulhado na amostra líquida ou encostado na superfície para sólidos (DATTA; SUMNU; RAGHAVAN, 2005).

Kumar et al. (2008) utilizaram a técnica de cabo coaxial de ponta aberta para determinar as propriedades dielétricas de leite desnatado na frequência de 915 MHz e variando a temperatura de (20 a 130) °C. Os resultados mostraram que as propriedades dielétricas do leite desnatado foram semelhantes na faixa de temperatura que varia de (20 a 120) °C; no entanto, na temperatura de 130 °C foram observadas diferenças entre os resultados, que, segundo os autores, pode ser atribuída a mudança de fase que ocorre nessa temperatura. Os dados também mostraram que o efeito da temperatura, entre (20 a 120) °C e a 130 °C, sobre as propriedades dielétricas foi similar: ϵ' decresceu com aumento da temperatura e ϵ'' aumentou com aumento da temperatura.

2.6.1 *Processamento de alimentos líquidos assistido por micro-ondas*

O processamento de alimentos líquidos assistido por micro-ondas tem sido utilizado como um método alternativo para inativação de micro-organismos e retenção da qualidade nutricional de alimentos (SALAZAR-GONZALVEZ et al., 2012).

Muitos autores relataram vantagens no uso das micro-ondas em relação ao aquecimento convencional, como por exemplo, Valero et al. (2000) que avaliaram a vida-de-prateleira, durante 15 dias, do leite de vaca submetido ao tratamento térmico convencional e assistido por micro-ondas. As amostras de leite foram tratadas em um experimento de fluxo contínuo assistido por micro-ondas na frequência de 2450 MHz (523 W) e a temperaturas de (80 e 92) °C durante 15 s e em trocador de calor nas mesmas condições. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os dois processos térmicos em relação os valores de pH, concentração de monossacarídeos e compostos voláteis. Os autores concluíram que o aquecimento

por micro-ondas representou uma boa alternativa aos métodos convencionais de pasteurização.

Clare et al. (2005) avaliaram, durante 12 meses, os efeitos do aquecimento por micro-ondas versus UHT (*Ultra High Temperature*) em relação aos parâmetros sensoriais, microbiológicos e bioquímicos do leite de vaca desnatado. O leite desnatado foi aquecido em temperatura de 137,8 °C por 10 s em uma unidade de processamento UHT, a vazão de 2,0 L/min, e no processamento térmico assistido por micro-ondas, o leite foi aquecido em um equipamento de fluxo contínuo com potência de 60 kW (915 MHz) a uma vazão de 3,8 L/min. Os resultados mostraram que ambos os tratamentos térmicos inativaram a enzima plasmina em níveis não detectáveis. A esterilidade foi mantida ao longo de um ano de armazenamento. Com relação à cor, eles observaram diferenças significativas entre as amostras processadas por UHT e micro-ondas. Os resultados da análise sensorial indicaram que o leite tratado pelo método UHT ficou visivelmente mais escuro, com sabor gorduroso e caramelizado e com maior adstringência em comparação com o leite aquecido por micro-ondas.

Igual et al. (2010) estudaram os impactos da pasteurização convencional e do aquecimento por micro-ondas sob os compostos bioativos e atividade enzimática do suco de toranja. Os resultados mostraram que a atividade enzimática residual da pectina metilesterase reduziu 12,04 % após o tratamento térmico convencional e 10,07 % após o tratamento térmico assistido por micro-ondas. Além disso, o tratamento convencional provocou uma redução significativa do teor de ácido cítrico (de 1,54 para 1,48) mg/100 g e do ácido ascórbico (de 36 para 34,3) mg/100 g, enquanto o aquecimento por micro-ondas preservou esses compostos com valores de (1,518 e 36) mg/100 g, respectivamente. O estudo também indicou que as amostras tratadas termicamente por micro-ondas preservaram mais os teores de fenóis totais e a capacidade antioxidante (82 % e 33 %, respectivamente) do que as pasteurizadas pelo método convencional, que mantiveram 75 % dos fenóis totais e 20 % de capacidade antioxidante. Assim, os autores concluíram que o suco de toranja aquecido por micro-ondas apresentou mais vantagens em relação a retenção de compostos bioativos do que o aquecido pelo método convencional.

Ben-Shoshan et al. (2016) submeteram amostras de leite humano contaminadas naturalmente com citomegalovírus, que pertence à família do vírus da

herpes, ao aquecimento por micro-ondas na frequência de 2450 MHz e nas potências de (500 e 750) W por 30 s e obtiveram a completa neutralização desse vírus na potência de 750 W. Os autores concluíram que é possível erradicar com sucesso o citomegalovírus presente em leite humano usando a radiação de micro-ondas com alta potência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas as matérias-primas e as metodologias utilizadas nas três etapas do projeto, que compreenderam: Etapa 1 - determinação das propriedades dielétricas e condutividade elétrica; Etapa 2 - estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP) e Etapa 3 - avaliação do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais e compostos bioativos do leite humano em comparação com o processo convencional.

3.1 Matérias-primas

3.1.1 Leite humano

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP) (Registro CEP-HU/USP: 1461/15 de 15/05/2015) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (número do parecer: 1.848.499 de 04/12/2016) de Brasília/DF. O CEP permitiu a doação de leite humano pelo Banco de Leite do HU/USP e o CONEP autorizou o envio de amostras de leite humano para a Universidade da Califórnia (Davis, EUA) para análise dos compostos bioativos.

O Banco de Leite Humano (BLH) forneceu para este trabalho, em data posterior à aprovação pelo CEP e CONEP, aproximadamente 3,5 L de leite humano cru maduro (obtido após o 15^o dia pós-parto), congelado e proveniente de diferentes doadoras. O leite humano não foi doado de uma única vez e para cada etapa do projeto foi utilizado um *pool* de leite de aproximadamente 10 doadoras. Participaram desse projeto 30 doadoras que contribuíram com aproximadamente 115 mL de leite humano cada uma. As doadoras assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) autorizando a doação de leite humano para esta pesquisa.

Os frascos contendo leite humano foram transportados do BLH até o Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA), Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, em caixa isotérmica, contendo gelo

reutilizável. Logo após a chegada das amostras no LEA os leites foram armazenados no freezer plasma vertical modelo 349 FV (Fanem, Brasil) a - 30 °C até posterior uso.

3.1.2 *Leite de vaca*

Os leites pasteurizados tipo A (integral e semi-desnatado) foram adquiridos no comércio local e o leite cru refrigerado tipo B foi doado pelo laticínio-escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, situado no *campus* de Pirassununga, SP. As amostras de leite cru refrigerado tipo B foram transportadas do laticínio até o LEA em caixa isotérmica contendo gelo reutilizável para manter a temperatura próxima a 4 °C. Ao chegar no LEA, o leite foi fracionado em tubos Falcon de 50 mL e armazenado no freezer plasma vertical modelo 349 FV (Fanem, São Paulo, Brasil) a - 30 °C até posterior uso.

3.1.3 *Fórmulas infantis*

O Banco de Leite Humano do HU/USP não permite a doação de leite humano para pesquisa sem que o projeto seja aprovado por um Comitê de Ética. Por isso, antes da sua aprovação pelo CEP, fórmulas infantis para lactentes foram utilizadas como matéria-prima do estudo (Etapa 1), que embora sejam consideradas inferiores ao leite humano sob diversos aspectos, como por exemplo, ausência de enzimas e imunoglobulinas, possuem composição nutricional semelhante (FERREIRA, 2005).

Foram escolhidos três tipos de formulação infantil, contendo diferentes composições nutricionais, para avaliar o seu comportamento quando expostos a diferentes temperaturas e frequências de micro-ondas. As fórmulas infantis, adquiridas do comércio local, foram: fórmula Infantil 1 (FI1) recomendada para bebês de (0 a 6) meses de vida, fórmula Infantil 2 (FI2) recomendada para bebês a partir de 6 meses de vida e fórmula Infantil 3 (FI3) recomendada para bebês a partir de 10 meses de vida.

3.1.3.1 Reconstituição das formulações infantis

As fórmulas infantis foram reconstituídas conforme a instrução do fabricante. Para a FI1 foram adicionados 13,8 g de leite em pó em 90 mL de água filtrada morna (40 °C) e para as FI2 e FI3 foram adicionados 14,8 g de leite em pó em 90 mL de água filtrada morna (40 °C). Previamente às análises, o produto reconstituído foi armazenado no refrigerador modelo 340 (Consul, Brasil) na temperatura 5 °C por 12 h afim de verificar visualmente se não havia precipitações.

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Caracterização físico-química das matérias-primas

A caracterização físico-química foi realizada antes de iniciar cada etapa do projeto, por determinação do extrato seco total, teores de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, e acidez titulável. Os valores obtidos experimentalmente foram comparados com os padrões estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 1998, 2008) e pelo MAPA (BRASIL, 2002).

A determinação do extrato seco total foi realizada de acordo com o método 429/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008), que consiste em desidratar os alimentos, de volume conhecido (5 mL), em estufa (modelo MA030, Marconi, Brasil) a 105 °C por 4 h.

O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico 437/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os alimentos foram carbonizados em placa aquecedora modelo AA-2050 (Gehaka, Brasil) e incinerados em forno mufla (Qumis, Brasil) a (550 ± 10) °C por 5 h.

O teor de lipídios totais foi determinado pelo método da AOAC (2005) e a leitura do resultado foi realizada na escala do butirômetro de Gerber (Gerber, Suíça) com graduação de (0 a 8) g/100 g.

O teor de proteínas, expresso como quantidade de nitrogênio total (g/100 g), foi determinado de acordo com o método de micro Kjeldahl (AOAC, 2005) em bloco digestor modelo 040/25 (Tecnal, Brasil) e destilador Kjeldahl modelo TE036/1 (Tecnal, Brasil). Para converter o valor do nitrogênio total em proteína, o fator para produtos lácteos de 6,38 foi empregado.

O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença.

A acidez titulável, expressa em g ácido láctico/100 mL, foi determinada por titulação utilizando solução de NaOH 0,1 M e 3 gotas de indicador (solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %), de acordo com a AOAC (2005).

Os resultados das análises físico-químicas foram tratados estatisticamente utilizando o programa *Statgraphics Centurion XV* (Statpoint, EUA), considerando o erro puro. O teste de Tukey foi aplicado para as diferenças encontradas no intervalo de confiança de 95 %.

3.2.2 *Etapa 1 – Determinação das propriedades dielétricas e condutividade elétrica*

3.2.2.1 Propriedades dielétricas

Para realizar as medições das propriedades dielétricas foi utilizada a técnica de sonda coaxial de ponta aberta, conforme descrito em Franco (2015), através da sonda 85093C (Agilent Technologies, Malásia) conectada a um analisador de rede E5061B (Agilent Technologies, Malásia). Com a finalidade de obter uma maior precisão, minimizando interferências, foi utilizado o módulo de calibração eletrônica 85093C (Agilent Technologies, Malásia).

As propriedades dielétricas foram obtidas a partir da medida do coeficiente de reflexão da amostra em contato com a ponta do sensor. A magnitude do sinal refletido foi registrada pelo software Dielectric Probe Kit 85070E (Agilent Technologies, Malásia), e os valores da permissividade complexa relativa (permissividade elétrica relativa e fator de perda dielétrica) foram fornecidos e posteriormente processados no programa Excel (Microsoft, EUA).

Antes do uso, o equipamento permaneceu ligado por no mínimo 90 min para estabilização e em seguida o processo de calibração foi conduzido, de acordo com as recomendações do fabricante, que utiliza três padrões: circuito aberto (ar), bloco de curto circuito (*shorting block*) e água deionizada a uma temperatura conhecida.

3.2.2.1.1 *Procedimento experimental da medição*

As medições das propriedades dielétricas foram realizadas em 100 mL de amostras em um erlenmeyer imerso em banho termostático modelo TC550

(Brookfield, EUA) com fluido térmico Kyro 20 (Lauda, Alemanha) até atingir a temperatura desejada, que foi monitorada com o sensor de temperatura termopar (Milleto, Brasil) com tolerância de ± 1 °C.

Após atingir a temperatura desejada no banho termostático a amostra foi colocada sob o sensor e elevada com a ajuda de uma base para regular a altura da amostra, pois a ponta da sonda deve ficar submersa respeitando os limites mínimos de 10 mm de imersão e 10 mm ao redor do sensor, evitando a presença de bolhas de ar na ponta do sensor. Depois de cada medida a sonda foi limpa com água destilada e seca com papel absorvente macio.

As medições foram realizadas na faixa de temperatura de (5 a 90) °C, com intervalos de 10 °C após atingir 10 °C, e na faixa de frequência de 500 MHz (limite inferior da sonda) até 3000 MHz (limite superior da sonda) em 101 pontos em escala logarítmica. A temperatura máxima de 90 °C foi limitada pelo tipo de sensor usado e a temperatura mínima de 5 °C foi escolhida porque representa uma condição inferior a temperatura média de armazenamento do leite na geladeira dos consumidores.

Os experimentos foram realizados em duplicatas independentes e em cada experimento foram conduzidas três varreduras de frequência na temperatura selecionada. Foi calculada a média e o desvio padrão das seis leituras para cada temperatura e frequência.

3.2.2.1.2 Cálculo da profundidade de penetração

A profundidade de penetração da radiação eletromagnética nos alimentos foi determinada pela eq. (16) através dos valores médios da permissividade elétrica relativa (ϵ') e do fator de perda dielétrica (ϵ'') nas frequências comerciais de (915 e 2450) MHz, obtidos por interpolação linear dos pontos adjacentes. A profundidade de penetração foi correlacionada com a temperatura no intervalo de (5 a 90) °C.

3.2.2.2 Condutividade elétrica

Foram realizadas as medições da condutividade elétrica, com a finalidade de calcular o componente iônico do fator de perda (ϵ''_o), no intervalo de temperatura de (5 a 90) °C, usando o condutivímetro YSI-3200 (YSI, EUA) e o eletrodo YSI-3252

(YSI, EUA). Para o controle da temperatura foi utilizado o banho termostático modelo TC550 (Brookfield, EUA) com fluido térmico Kryo 20 (Lauda, Alemanha) e um sensor de temperatura termopar (Milleto, Brasil). As medições foram realizadas em triplicatas. A condutividade elétrica foi correlacionada linearmente com a temperatura no intervalo de (5 a 90) °C.

Segundo Rynänen (1995) o componente iônico do fator de perda (ϵ''_{σ}) pode ser calculado com a eq. (17):

$$\epsilon''_{\sigma} = \frac{\sigma}{2\pi f \epsilon_0} \quad (17)$$

em que: σ é a condutividade elétrica (S/m), f é a frequência (Hz) e ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo ($8,85 \times 10^{-12}$ F/m).

O componente dipolar de perda (ϵ''_d) foi calculado empregando a eq. (19), a partir do ϵ''_{σ} calculado (eq. 17) e do fator de perda dielétrico medido (ϵ'').

$$\epsilon'' = \epsilon''_d + \epsilon''_{\sigma} \quad (18)$$

$$\epsilon''_d = \epsilon''_{\sigma} - \epsilon'' \quad (19)$$

Os componentes iônico (ϵ''_{σ}) e dipolar (ϵ''_d) do fator de perda foram utilizados para calcular a contribuição de cada um sobre o fator de perda de acordo com as equações (20) e (21) (FRANCO et al., 2015).

$$C''_{\sigma} = \frac{\epsilon''_{\sigma}}{\epsilon''} \quad (20)$$

$$C''_d = \frac{\epsilon''_d}{\epsilon''} \quad (21)$$

3.2.3 *Etapa 2 – Estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP)*

Em muitos processos industriais os alimentos estão sujeitos a condições de aquecimento não isotérmico, ou seja, a temperatura do produto varia com a posição axial e radial e com o tempo. Nestes casos, a letalidade integrada (F_{Tref}), calculada

pela eq. (13) e que representa o tempo de retenção em condições isotérmicas na temperatura de referência, promove o mesmo efeito letal que o tratamento não isotérmico, permitindo a avaliação do impacto do processo sobre o indicador biológico (LEWIS; HEPPEL, 2000).

Para a determinação da letalidade integrada necessita-se do valor de z . Inicialmente, utilizou-se uma aproximação grosseira do valor de z (1ª tentativa) para que um valor inicial de tempo equivalente fosse calculado. O tempo equivalente (t_{eq}) foi calculado para cada um dos experimentos, em diferentes tempos e temperaturas de processo, e depois ele foi agrupado em um único grupo, para que a correspondente atividade residual da enzima ALP calculada, $(A/A_0)_{calc}$, obtida da eq. (22), fosse correlacionada com a atividade residual da enzima ALP experimental, $(A/A_0)_{exp}$. Esse processo foi realizado para cada tipo de leite, humano e de vaca tipo B.

$$\left(\frac{A}{A_0}\right)_{calc} = 10^{-t_{eq}/D_{ref}} \quad (22)$$

A atividade residual calculada, $(A/A_0)_{calc}$, foi então plotada em função da experimental, $(A/A_0)_{exp}$, e para minimizar o desvio quadrático entre os pares utilizou-se a ferramenta *Solver* do programa Excel (Microsoft Office 2011) que efetuou a busca dos valores ótimos dos parâmetros de D e z , de forma a encontrar o mínimo da soma dos quadrados dos erros. A partir desse processo iterativo foi possível determinar os valores corrigidos de D e z para a temperatura de referência adotada, utilizando a equação (13).

3.2.3.1 Pasteurização *Holder* do leite humano

Na pasteurização *Holder*, amostras de 100 mL de leite humano foram recolhidas em frascos previamente autoclavados com tampa, contendo um furo no centro para inserir o sensor, e submetidas ao aquecimento em um banho ultratermostatizado, modelo MA-184 (Marconi, Brasil) a 62,5 °C por 30 min. Após o período de aquecimento os frascos foram imediatamente imersos em banho de água com gelo, sob agitação, até que a temperatura atingisse um valor inferior a 10 °C. O sensor de fibra óptica, modelo Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA), foi

utilizado para medir a temperatura no centro geométrico da amostra e o termômetro digital Fluoroptic STF-1M (LumaSense Technologies, EUA) registrou a temperatura a cada 0,5 s.

3.2.3.2 Processo térmico descontínuo assistido por micro-ondas

Todo o processo descontínuo foi conduzido em um reator de micro-ondas focalizadas modelo *Discover Reflux* (CEM, EUA). Esse equipamento possui um sistema de irradiação de micro-ondas contínuo na frequência de 2450 MHz com saída de potência selecionável pelo operador, (0 a 300) W, e um sistema de controle de temperatura de (25 a 250) °C que usa um sensor de infravermelho localizado abaixo da cavidade de micro-ondas para medir a temperatura no fundo do frasco. Os dados do sensor de temperatura foram enviados para o software *Synergy* (CEM, EUA) a taxa de 1/s, que realizou o auto ajuste da potência irradiada em função da rampa de aquecimento e da relação temperatura/potência programada.

O reator de micro-ondas focalizadas contém uma cavidade “*single mode*”, que comporta apenas um frasco por experimento com diâmetro interno de 4 cm e altura de 5,5 cm (Figura 3.1). O equipamento possui sete cavidades que direcionam as ondas eletromagnéticas para o meio, resfriamento por ar comprimido para manter a temperatura desejada pelo tempo determinado e também possui a opção de agitação magnética que consiste em uma placa magnética rotativa localizada abaixo da cavidade.

Figura 3.1 – Sistema de aquecimento e resfriamento do micro-ondas

Fonte: CEM (2005)

Para garantir a confiabilidade do histórico de temperatura durante todo o processo de aquecimento e resfriamento foi utilizado o termômetro de fibra óptica,

modelo Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA), para medir a temperatura no centro da amostra.

O sistema do *Discover Reflux* possui quatro opções de controle para programar um método: controle padrão, controle tempo-potência, acoplamento e controle de desproteção (CEM, 2005). Nesse trabalho, foi utilizado o controle padrão que permite ao usuário estabelecer um tempo para que o sistema mantenha a temperatura programada, através da regulação da potência baseada nos dados do sensor infravermelho. Foi utilizado um tempo de rampa de 1 min e potência máxima de 300 W.

O processamento térmico assistido por micro-ondas foi dividido em duas etapas: Na primeira etapa foram utilizados pequenos volumes de amostras (5 mL), inseridos em tubo de ensaio Pyrex, e submetidos à incidência das micro-ondas em diversas condições de temperatura (50 a 80) °C e tempos de exposição (15, 45, 60, 180 e 300) s para o estudo da cinética de inativação enzimática da ALP em leite humano e de vaca.

Na segunda etapa, após o estudo da cinética de inativação da ALP e obtenção das condições ótimas de processamento térmico (60 °C por 30 s, para leite humano e 65 °C por 45 s, para o leite de vaca), foram feitos testes com volume maior (100 mL) para avaliar se a eficiência do processamento térmico era similar em relação a inativação da ALP.

Amostras de leite humano com volume de 100 mL além de terem sido processadas nas condições ótimas, foram também submetidas a incidência das micro-ondas a 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s. Esses novos binômios temperatura-tempo foram escolhidos porque apresentam o mesmo valor de esterilização (SV), eq. (12), ($SV = 3,7$ para leite humano) que a condição ótima de processamento obtida.

Para garantir a homogeneidade da temperatura da amostra no segundo estudo, foi improvisado uma haste e pás para o agitador mecânico, de maneira a não interferir na radiação de micro-ondas, pois visualmente o agitador magnético do equipamento não foi suficiente para homogeneizar 100 mL de leite. Foi utilizado um canudo de polipropileno para servir como haste e dois mexedores de poliestireno (mexedor para café) para servir como pás que foram conectados a um agitador mecânico, modelo 715 (Fisatom, Brasil) (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Agitador mecânico utilizado para homogeneizar a amostra

Fonte: A autora (2016)

Decorrido o tempo programado para incidência das micro-ondas, nos dois estudos, a amostra foi rapidamente retirada da cavidade do forno e imersa em banho de gelo, sob agitação, até que a temperatura atingisse um valor inferior a 10 °C (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Representação esquemática do aquecimento por micro-ondas para obtenção do histórico de tempo-temperatura

Fonte: A autora (2016)

Após o processamento térmico as amostras foram colocadas em tubos Falcon e armazenadas no freezer plasma vertical modelo 349 FV (Fanem, Brasil) a - 30 °C até posteriores análises.

Amostras de leite não processadas (cru) também foram armazenadas para posteriores análises e consideradas como não processadas com tempo zero para comparação dos resultados.

3.2.3.2.1 Atividade residual da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade enzimática da ALP foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 650 nm, modelo 700 PLUS (FEMTO, Brasil), provido de cubetas de vidro óptico de 40 mm, da marca HELLMA, seguindo o método 979.13 da AOAC (2005), antes e após o leite humano e de vaca tipo B terem sido processados termicamente assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo.

A verificação da atividade enzimática foi feita mediante a adição do substrato fenil fosfato dissódico às amostras de leite humano e de vaca, cru e processadas termicamente assistidas por micro-ondas em diferentes condições de processo. A fosfatase alcalina presente naturalmente no leite hidrolisou os ésteres de monofosfatos e liberou fenol, que reagiu com 2,6-dicloroquina cloroimida na presença de sulfato de cobre gerando indofenol de cor azul, que indicou a concentração de fenol presente nas amostras de leite.

A determinação da concentração de fenol, resultante da atividade da ALP, presente no leite humano e de vaca, com o substrato, foi realizada por meio de curvas de calibração obtidas da regressão linear da absorbância de diferentes soluções de fenol em água as concentrações de (0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4) μg de equivalente fenol em 1 mL de solução (Figura 3.4). Nas equações (Figuras 3.4A e 3.4B), A é a absorbância lida pelo equipamento em AU e c é a concentração de fenol ($\mu\text{g/mL}$ de leite), que deve ser calculada.

Figura 3.4 – Curva de calibração das diferentes concentrações de fenol em água, utilizada para determinar a atividade da enzima ALP em leite de humano (A) e a atividade da ALP em leite vaca (B)

Fonte: A autora (2016)

Para que os valores das absorbâncias estivessem entre (0 e 1) AU foi necessário diluir em 25 vezes as amostras de leite de vaca e concentrar em 10 vezes as amostras de leite humano.

3.2.4 Etapa 3 - Avaliação do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais, de proteínas e compostos bioativos do leite humano em comparação com o processo convencional.

3.2.4.1 Letalidade microbiana

Amostras do leite humano processado termicamente assistido por micro-ondas a 60 °C por 30 s (condição ótima) e a 62,5 °C por 30 min (pasteurização *Holder* utilizada nos BLH) foram submetidas às análises microbiológicas quanto às populações de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, *Staphylococcus aureus* e presença/ausência de *Salmonella* spp. As análises microbiológicas foram realizadas imediatamente após os tratamentos térmicos e os resultados foram comparados com os do leite humano cru.

As análises foram realizadas no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a coordenação

da Prof^a. Mariza Landgraf, segundo a metodologia preconizada pelo *American Public Health Association* (APHA, 2001), em triplicata.

Para a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade, seguindo a metodologia descrita por Morton (2001), com utilização do meio de cultura *plate count agar* (PCA). O resultado foi expresso em UFC/mL.

Para a determinação de coliformes totais foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) em Caldo Bile Verde Brilhante, com tubos de Durham invertidos, que foram incubados por 48 h a 37 °C, conforme descrito na metodologia proposta por Kornachi e Johnson (2001). Os tubos com produção de gás foram considerados positivos para coliformes totais e o resultado foi expresso em NMP/mL.

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi feita de acordo com o procedimento descrito por Lancette e Benett (2001), por contagem direta em placas, com semeadura em superfície de ágar Baird-Parker e espalhadas com alça de Drigalsky. As colônias suspeitas passaram pelo processo de identificação bioquímica. O resultado foi expresso como UFC/mL.

Para a pesquisa de *Salmonella*, as amostras foram submetidas a um pré-enriquecimento em Caldo Lactosado, seguido de enriquecimento seletivo em Caldo Tetrationato e Caldo Rappaport-Vassiliadis. O isolamento de colônias foi feito no ágar Hektoen (HE) e ágar xilose lisina desoxicolato conforme descrito por Andrews et al. (2001). As colônias com características de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímico e sorológicos para completa identificação. O resultado foi expresso como “ausência” ou “presença” de *Salmonella* spp. em 25 mL de leite.

Dentre as bactérias estudadas nesse trabalho, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. são consideradas as mais termorresistentes, consequentemente, elas foram selecionadas para verificar a eficiência do processamento térmico assistido por micro-ondas na condição ótima de 60 °C por 30 s. O leite humano cru foi inoculado com essas bactérias, separadamente, a uma concentração de 6 log UFC/mL e depois foi processado. Para controle, foi considerado como processamento térmico eficiente, uma redução de pelo menos 5 log de cada patógeno (CODEX, 2004), em relação a concentração inicial.

3.2.4.2 Perfil de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos em leite humano foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da USP, sob a coordenação da Prof^a. Juliana Ract.

A extração dos lipídios do leite humano foi realizada segundo as normas da *International Organization for Standardization* ISO/DIS (2000), método 14156, e a preparação de ésteres metílicos, para posterior quantificação de ácido graxos, foi realizada segundo o método 15884 (ISO, 2002).

A análise de ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa, conforme descrito por Silva et al. (2011), porém com modificações nas temperaturas da rampa de aquecimento do forno. O cromatógrafo utilizado foi o modelo 430 GC (Varian Chromatograph Systems, EUA) equipado com injetor automático modelo CP 8412 e detector de ionização de chama.

O *software* Galaxie (VarianChromatograph Systems, EUA) foi utilizado para a quantificação e identificação dos picos. As amostras foram injetadas (1µL, 250 °C) em coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno), revestida com 0,2 L de polietileno glicol (SP-2560, Supelco, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, na pressão isobárica de 255,1 kPa e velocidade linear de 20 cm/s, e como gás auxiliar (*make up*) a velocidade de 29 mL/min. A temperatura do injetor e do detector foi de (250 e 280) °C, respectivamente, enquanto a do forno foi inicialmente ajustada para 75 °C por 3 min e programada para atingir 150 °C a uma taxa de 37,5 °C/min e, novamente programada até 215 °C a uma taxa de 3 °C/min.

A análise qualitativa dos ácidos graxos foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos produzidos pelas amostras metiladas com aqueles obtidos com os respectivos padrões. A análise quantitativa foi realizada por normalização de área e expressa de acordo com o método 15885 (ISO, 2002).

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação dos processos térmicos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey no intervalo de confiança de 95 %.

3.2.4.3 Teor de minerais

Os teores de ferro, cobre, zinco, cálcio, potássio, sódio e fósforo foram determinados nas amostras de leite humano, antes e após o processamento térmico convencional (62,5 °C por 30 min) e assistido por micro-ondas (60 °C por 30 s), empregando a digestão por via úmida em chapa aquecedora. A determinação dos minerais foi realizada no laboratório do Grupo de Análise e Pesquisa em Espectrometria (GAPE) do Instituto de Química da USP, sob a coordenação do Prof. Pedro Oliveira.

Todos os materiais utilizados nessa análise foram previamente lavados com detergente e água corrente, abundantemente enxaguados com água destilada, deixados em banho de HNO₃ 10 % (v/v) por 24 h e depois enxaguados com água destilada.

Amostras de 0,5 mL de leite humano foram digeridas em um béquer de 125 mL, tampado com vidro de relógio, com ácido nítrico (HNO₃) a 65 mL/100 mL e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30 mL/100 mL em placa aquecedora, modelo AA-2050 (Gehaka, Brasil), por 4 h conforme procedimento descrito por Nascimento et al. (2010).

Após a digestão, as amostras foram diluídas com 20 mL de água deionizada e os teores foram determinados por ICP-OES, modelo iCAP 6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, Inglaterra). O gás utilizado para purgar a óptica e formar o plasma foi o argônio 99,998 mL/100 mL (Oxilúmen, Brasil).

Soluções padrão estoque (Merck, Alemanha), contendo 1000 mg/L de cada elemento de interesse, foram utilizadas no preparo de soluções-padrão de (0 a 20) mg/L. Como padrão interno utilizou-se a solução com 10 mg/L de Rh.

Na Tabela 3.1 os parâmetros utilizados na análise por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), são apresentados.

Para a determinação das concentrações abaixo dos limites de quantificação do ICP-OES, foi utilizado o GF AAS (Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite), modelo ZEEiT® 60 (AnalytikjenaAG, Alemanha), para quantificar Fe, Cu e Zn. O gás de purga e protetor de tubo de grafite foi argônio 99,998 mL/100 mL (Oxilúmen, Brasil). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Fe ($\lambda = 248,3$ nm, $i = 4,0$ mA, resolução espectral = 0,8 nm), Cu ($\lambda = 324,8$ nm, $i = 4,0$ mA, resolução espectral = 0,8 nm) e Zn ($\lambda = 213,9$ nm, $i = 4,0$ mA, resolução espectral = 0,8 nm) como fontes de radiação.

Tabela 3.1 – Parâmetros empregados na análise por ICP-OES

Parâmetros instrumentais	Condição adotada
Potência da rádio frequência	1250 W
Orientação da tocha	Modo Duo (Axial e Radial)
Rotação da bomba	25 rpm
Vazão do nebulizador	0,57 L/min
Vazão do gás do plasma	12 L/min
Vazão do gás auxiliar	1,0 L/min
Tempo de integração	Alto comprimento de onda: 5 s Baixo comprimento de onda: 15 s
Câmara de expansão	Ciclônica resistente
Nebulizador	Burgener Mira Mistr®
Comprimento de onda	Ca: 317,9 nm K: 766,4 nm Na: 589,5 nm P: 177,4 nm

Fonte: A autora (2017)

3.2.4.4 Teor de proteínas (Imunoglobulinas e lactoferrina)

Os ensaios imunoenzimáticos para detecção da concentração dos anticorpos IgA, IgE, IgM, IgG e lactoferrina em leite humano foram realizados no Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, na Universidade da Califórnia, Davis (EUA), sob coordenação da Prof^a. Daniela Barile, pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) específico para cada classe de imunoglobulina e lactoferrina, seguindo as recomendações do fabricante (Bethyl Laboratories, EUA).

Os ensaios foram realizados nas amostras processadas termicamente por micro-ondas a 60 °C por 30 s, 65 °C por 15 s e 70 °C a 10 s. Além disso, as análises foram realizadas leite humano cru e pasteurizado pelo método convencional (62,5 °C por 30 min).

As amostras foram diluídas 1:10.000 vezes em tampão de diluição (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % TweenTM20, pH 8,0) e homogeneizadas em vórtex. Foram pipetados 100 µl de amostra em cada poço de uma placa, que contém 96 poços de fundo arredondado, e a placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. Os volumes foram descartados e a placa foi lavada 4 vezes com PBS TweenTM20 (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % TweenTM20, pH 8,0), e depois

incubada com 100 µL do anticorpo conjugado de interesse, anti-IgA humano (E88-102; Bethyl Laboratories, EUA); anti-IgE (E88-108; Bethyl Laboratories, EUA), anti-IgG (E88-104; Bethyl Laboratories, EUA), anti-IgM (E88-100; Bethyl Laboratories, EUA) e lactoferrina (E88-143; Bethyl Laboratories, EUA). A placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente e depois foi lavada 4 vezes com PBS Tween™20. Após a lavagem foi adicionado 100 µL de solução HRP, peroxidase de rábano, e a placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. A placa foi lavada 4 vezes com PBS Tween™20 e depois foi adicionado 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que forma um produto azul. A placa foi deixada no escuro por 30 min e em seguida adicionou-se 100 µL de H₂SO₄ 1 N em cada poço para interromper a reação, resultando em um produto amarelo. Para a leitura da placa foi selecionado o comprimento de onda de 450 nm no espectrofotômetro modelo SpectraMax M Series (Molecular Devices, EUA). Os dados foram processados e analisados pelo programa SoftMax Pro 6.5.1 (Molecular Devices, EUA).

3.2.4.5 Compostos bioativos

3.2.4.5.1 *Oligossacarídeos*

A determinação dos oligossacarídeos em leite humano foi realizada no Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, da Universidade da Califórnia, Davis (EUA), sob a coordenação da Prof^a. Daniela Barile.

Para esse estudo, além de utilizar as amostras processadas termicamente assistidas por micro-ondas nas condições ótimas (60 °C por 30 s) também foram estudadas amostras processadas a 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s. Esses novos binômios temperatura-tempo foram escolhidos porque apresentam os mesmos valores de esterilização (SV) das condições ótimas.

Para a extração dos oligossacarídeos presentes no leite humano foi utilizado o método descrito por Ninonuevo et al. (2007). As amostras de leite (0,5 mL) foram diluídas com um volume igual de água nanopura (18,2 MΩ de pureza iônica) e centrifugadas a 4 °C por 30 min a 4000 g (modelo Allegra X-30R, Beckman Coulter, EUA). A fração livre de lipídios foi tratada com 20 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugada a 4000 g por 30 min a 4 °C, sendo que a

fase inferior, contendo clorofórmio e proteínas, foi descartada. A fase superior, contendo os oligossacarídeos foi coletada e 3 mL de etanol foram adicionados. O frasco foi colocado no freezer a -30 °C por 1 h para que o restante das proteínas precipitasse. Após esse período a amostra foi centrifugada a 4000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante livre de proteínas foi coletado e seco na centrífuga de vácuo (modelo Quattro miVac Speed Vac, Genevac Technology, UK), a 37 °C por 24 h. Os oligossacarídeos foram reidratados com 1 mL de água nanopura e depois identificados por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em sistema Dionex (modelo DX-500) e separados em coluna de troca iônica CarboPac PA 100 (Dionex Corporation, EUA). Os oligossacarídeos quantificados foram: LNnT (lacto-N-neotetraose), LNT (lacto-N-tetraose), LNH (lacto-N-hexaose), 3-SL (3-sialyllactose), 6-SL (6-sialyllactose), LNFPI (lacto-N-fucopentaose I) e 2-FL (2'-fucosyllactose).

A eluição foi realizada com os seguintes gradientes: água (Eluente A), NaOH 200 mM (Eluente B) e NaOAc 100 mM em NaOH 100 mM (Eluente C). No tempo variando de (0 – 10) min foi utilizado 50 % do eluente A e 50 % do eluente B; no tempo de (10 – 35) min foi utilizado 50 % do eluente A, 45 % do eluente B e 5 % do eluente C; no tempo de (35 – 40) min foi utilizado 45 % do eluente A, 45 % do eluente B e 10 % do eluente C.

Foram preparadas soluções padrão para fazer a curva de calibração nas concentrações finais de (0,0001; 0,0002; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01) g/L para cada um dos grupos, Fucosilados (LNFPI e 2-FL), neutros (LNT, LNnT e LNH) e sialilados (3-SL e 6-SL). As curvas de calibração foram obtidas plotando as áreas de pico do analito em função das concentrações de cada composto presente no grupo. A curva de calibração para todos os compostos foi linear com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999.

Visando proporcionar maior exatidão e confiabilidade nos resultados as amostras de leite humano também foram analisadas por Q-ToF que permitiu a checagem da abundância dos oligossacarídeos de interesse. Com essas informações foi possível comparar os resultados obtidos com os do equipamento Dionex e verificar se os picos mais abundantes eram correspondentes nas duas análises.

Para análise por Q-ToF, os oligossacarídeos extraídos foram purificados, conforme procedimento descrito por Ninonuevo et al. (2007), por extração em fase sólida usando um cartucho de carbono não-poroso (GCC-SPE, Alltech, EUA) antes de serem analisados pelo instrumento HPLC-chip/TOF MS, modelo 6200 (Agilent Technologies, EUA). O *chip glycan* (G4240-62003, Agilent Technologies, EUA) usado para separação de glicanos (oligossacarídeos) é constituído por uma coluna de enriquecimento (4 mm, 40 nL) e uma coluna analítica (75 μ m $\times$ 43 mm) com ionização por nanoelectrospray. As fases móveis utilizadas foram: Eluente A (97 % de água nanopura, 3 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico) e eluente B (90 % de acetonitrila, 10 % de água nanopura e 0,1 % de ácido fórmico). O gradiente de eluição empregado teve início com 100 % de eluente A e foi diminuindo da seguinte forma: (2,5 a 20) min, (0 – 16) % de eluente B; (20 a 30) min, (16 – 44) % de eluente B; (30 a 35) min, (44 a 100) % de eluente B, seguido de 100 % de eluente B por 10 min, e finalmente a 0 % de eluente B por 20 min para equilibrar a coluna do *chip* antes da próxima injeção. A calibração interna foi determinada usando 1152,38 *m/z* como referência de massa (ESI-TOF Tunning Mix G1969-85000, Agilent Technologies, EUA).

As listas de massas obtidas a partir do chip HPLC/TOF MS foram deconvoluídas usando o extrator de localização de compostos por características moleculares, *Mass Baker Qualitative Analysis* versão B.03.01 (Agilent Technologies, EUA), com pesquisa em banco de dados. O algoritmo examina uma lista de massas avaliadas experimentalmente e busca todas as combinações de monossacarídeos possíveis combinando a massa experimental dentro de um nível de tolerância especificado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da caracterização físico-química das matérias-primas, das propriedades dielétricas e condutividade elétrica dos alimentos (Etapa 1), da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP) (Etapa 2) e do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais e compostos bioativos do leite humano em comparação com o processo convencional (Etapa 3).

4.1 Caracterização físico-química das matérias-primas

Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química do leite humano, dos leites de vaca (cru tipo B e pasteurizado tipo A integral e semi-desnatado) e das fórmulas infantis reconstituídas para lactentes (FI1, FI2 e FI3).

Tabela 4.1 – Caracterização físico-química dos leites de vaca (LV), leite humano (LH) e das fórmulas infantis (FIs)

Alimento	Acidez (1) (g/100g)	Água (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Carboidratos (g/100g)	Cinzas (g/100g)
LV Cru	0,15 ± 0,01 ^a	85,50 ± 0,25 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	3,13 ± 0,04 ^a	6,97 ± 0,26 ^a	0,86 ± 0,02 ^a
LV Integral	0,14 ± 0,01 ^b	88,22 ± 0,02 ^b	3,3 ± 0,1 ^a	2,97 ± 0,06 ^b	4,86 ± 0,09 ^b	0,68 ± 0,01 ^b
LV semi-desnatado	0,16 ± 0,00 ^a	89,31 ± 0,05 ^c	1,5 ± 0,1 ^b	3,05 ± 0,06 ^c	5,41 ± 0,09 ^b	0,76 ± 0,06 ^c
LH	0,04 ± 0,01 ^c	87,73 ± 0,17 ^d	3,1 ± 0,1 ^a	1,25 ± 0,05 ^d	7,42 ± 0,30 ^a	0,21 ± 0,01 ^d
FI1	0,37 ± 0,01 ^d	86,74 ± 0,02 ^e	3,3 ± 0,1 ^a	1,25 ± 0,00 ^d	8,35 ± 0,08 ^c	0,34 ± 0,01 ^e
FI2	0,44 ± 0,01 ^e	85,70 ± 0,00 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	1,80 ± 0,08 ^e	8,94 ± 0,09 ^c	0,51 ± 0,01 ^f
FI3	0,52 ± 0,01 ^f	85,46 ± 0,03 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	1,95 ± 0,02 ^f	9,02 ± 0,06 ^c	0,52 ± 0,01 ^f
DMS	0,01	0,21	0,51	0,12	0,46	0,04

Os resultados são médias de três repetições ± desvio padrão. Médias na mesma coluna, seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

(1) expressa em ácido láctico. DMS = Diferença Mínima Significativa

Fonte: A autora (2017)

Para o leite de vaca, os resultados estão de acordo com o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A e B (BRASIL, 2002) estabelecido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). No anexo I do citado regulamento, para leite pasteurizado tipo A, tem-se:

- Lipídios – Teor deve ser no mínimo de 3,0 g/100 g para o leite integral e entre (0,6 e 2,9) g/100 g para o leite semi-desnatado;
- Acidez – Deve ser entre (0,14 a 0,18) g de ácido láctico/100 g, tanto para o integral quanto para o semi-desnatado.

No anexo II desse regulamento estão estabelecidos os seguinte requisitos para o leite cru tipo B integral:

- Teor de lipídios deve ser no mínimo de 3,0 g/100 g,
- Acidez deve estar entre (0,14 e 0,18) g de ácido láctico/100 g,
- Teor de proteínas totais deve ser no mínimo de 2,9 g/100 g.

Para o leite humano, os Bancos de Leite Humano (BLHs) possuem padrões para garantir a qualidade do leite doado, sendo o controle da acidez (°D) um deles, expressa como acidez titulável (BRASIL, 2008). Nos BLHs, as amostras tituladas que apresentam acidez inferior a 8 °D são classificadas como adequadas para consumo e as que encontram-se acima desse valor são descartadas (BRASIL, 2008).

A cada 0,1 mL de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação corresponde a 1 °D, considerando uma amostra de 10 mL. Neste trabalho, o valor médio encontrado da acidez de 0,04 g de ácido láctico/100 g, correspondente a 4 °D, atende ao padrão de qualidade estabelecido pelos BLHs.

Os resultados obtidos para a acidez titulável dos leites foram similares aos obtidos por Sunaric et al. (2016), que encontraram valores entre (0,02 e 0,13) g de ácido láctico/100 g para o leite humano e entre (0,15 a 0,17) g de ácido láctico/100 g para o leite de vaca.

Para as fórmulas infantis reconstituídas e leite humano os teores de proteínas foram inferiores, entre (1,25 a 1,95) g/100 g, do que os encontrados no leite de vaca, entre (2,97 e 3,13) g/100 g. Isso ocorre porque as fórmulas infantis devem apresentar composição nutricional próxima a do leite humano para atender as exigências nutricionais em cada fase do desenvolvimento da criança. Geralmente as proteínas do leite de vaca são compostas por 20 % de proteínas do soro e 80 % de caseína, entretanto, nas fórmulas infantis, essa proporção deve estar entre (50 e 60) % de proteínas do soro e (50 e 40) % de caseína, para facilitar o processo digestivo e reduzir o risco de alergia nos lactentes.

O leite de vaca contém alto teor de cinzas, entre (0,68 e 0,86) g/100 g, quando comparado com as fórmulas infantis reconstituídas, entre (0,34 e 0,52) g/100 g e leite humano (0,21 g/100 g), o que pode provocar um aumento da carga de soluto renal na criança alimentada com esse tipo de leite. O alimento ideal, principalmente no primeiro ano de vida, é o leite humano, porém se não for possível, é preferível ofertar as fórmulas infantis ao invés do leite de vaca (LEUNG; SAUVE, 2003).

Os teores de carboidratos, calculados por diferença, das fórmulas infantis reconstituídas variaram de (8,35 a 9,02) g/100 g, superiores aos encontrados para o leite de vaca, entre (4,86 e 6,97) g/100 g. A fórmula infantil é derivada principalmente do leite de vaca que contém um menor teor de oligossacarídeos quando comparado ao leite humano; assim, para alcançar a função prebiótica do leite humano são adicionados oligossacarídeos (galacto e fruto) na formulação, que aumentam o teor de carboidratos quando comparado ao leite de vaca (NEESER et al., 1991).

O conteúdo dos lipídios das fórmulas infantis reconstituídas, variou de (3,1 a 3,3) g/100 g, nível desejado para um alimento que substitui ou complementa o leite humano (JENSEN et al., 1992). O consumo de leite de vaca semi-desnatado por crianças contribui para uma dieta com baixo teor de lipídios e ao surgimento de diarreia crônica inespecífica (KOOPMAN et al., 1984).

4.2 Etapa 1 – Determinação das propriedades dielétricas e condutividade elétrica

Os valores da permissividade elétrica relativa (ϵ') e do fator de perda dielétrica (ϵ'') dos três tipos de leite de vaca (cru tipo B, integral e semi-desnatado tipo A), das três fórmulas infantis (FI1, FI2 e FI3) e do leite humano, nas frequências de (500 a 3000) MHz e nas temperaturas de (5 a 90) °C estão apresentados na Figura 4.1. Em toda a faixa de frequência estudada foi observado o decréscimo da permissividade elétrica relativa (ϵ') com o aumento da frequência e da temperatura. Segundo Datta, Sumnu e Raghavan (2005) na medida em que ocorre um aumento da frequência de oscilação do campo ou da temperatura, os valores da ϵ' diminuem devido a dificuldade dos dipolos em acompanhar o campo elétrico. O decréscimo da ϵ' foi mais acentuado em baixas temperaturas, como por exemplo, para o leite humano (Figura 4.1G), o valor de ϵ' diminuiu de 64,9 a 500 MHz para 56,7 a 3 GHz (redução de 12,6

%) a temperatura de 5 °C e a temperatura de 90 °C os valores encontrados foram de 36,7 na frequência de 500 MHz e 35,2 na frequência de 3 GHz (redução de 3,9 %). Zhu, Guo e Jia (2014) também observaram esse decréscimo mais acentuado da ϵ' em baixas temperaturas quando mediram as propriedades dielétricas dos leites cru de cabra e vaca na faixa de frequência de (10 a 4500) MHz.

Em relação ao fator de perda dielétrica (ϵ''), Mudgett (1985) notou que o valor do ϵ'' do leite desnatado aumentou com a temperatura entre (300 e 1000) MHz, seguido do decréscimo até a frequência de 3000 MHz. Uma explicação para esse resultado é que o fator de perda dielétrica (ϵ'') está relacionado com a resposta das perdas por dipolo e iônica do alimento com o campo elétrico aplicado. A perda por dipolo decresce com o aumento da temperatura a uma dada frequência. No caso da perda iônica, esta aumenta com a temperatura e diminui com o aumento da frequência (WANG et al., 2003).

Segundo Datta, Sumnu e Raghavan (2005), em frequências superiores a 2000 MHz, o ϵ'' diminui na medida em que a temperatura aumenta, devido ao aumento da frequência de relaxação da molécula de água em função da temperatura.

Nelson e Bartley (2000) atribuíram o aumento do fator de perda (ϵ'') com o aumento da temperatura, na frequência de 27 MHz, ao aumento da condução iônica. Segundo esses autores o fator de perda (ϵ'') é mais influenciado, no aquecimento dielétrico por micro-ondas, do que a permissividade elétrica relativa (ϵ'), e o ϵ'' é mais dependente da temperatura nas frequências entre (0,3 e 1) GHz.

Coronel, Simunovic e Sandeep (2003) estudaram os efeitos da temperatura e da frequência do campo eletromagnético sobre as propriedades dielétricas de leite contendo diferentes concentrações de lipídios. Na frequência de 915 MHz e na temperatura de 20 °C o leite com (4,0 e 1,5) % de lipídios apresentou valores similares de permissividade elétrica relativa (ϵ'), 68,9 e 68,7, respectivamente, e fator de perda dielétrica (ϵ''), 15,5 e 15,1, respectivamente. Neste trabalho, para o leite integral (3,3 % de lipídios) e semi-desnatado (1,5 % de lipídios), na frequência de 915 MHz e na temperatura de 20 °C, foram obtidos resultados próximos aos apresentados por Coronel et al. (2003), com valores médios de permissividade elétrica relativa de $70,8 \pm 0,55$ e $72,7 \pm 0,16$, respectivamente, e fator de perda dielétrica de $14,3 \pm 0,12$ e $15,2 \pm 0,12$, respectivamente.

Figura 4.1 – Permissividade elétrica relativa (ϵ') e fator de perda (ϵ'') em função da frequência e da temperatura para o leite de vaca cru tipo B (A), integral tipo A pasteurizado (B), semi-desnatado tipo A pasteurizado (C), fórmulas infantis FI1 (D), FI2 (E) e FI3 (F) e leite humano (G)

Fonte: A autora (2017)

O gráfico de Cole-Cole da permissividade elétrica relativa (ϵ') em função do fator de perda (ϵ'') no intervalo de frequência de (500 a 3000) MHz e da temperatura (5 a 90) °C, para o leite humano, está apresentado na Figura 4.2, que permite melhor visualização da transição entre a perda por condução iônica e perda dipolar. Nota-se que há um ponto mínimo, dependente da temperatura, que corresponde a transição entre a perda por rotação dipolar e a perda por condução iônica. O mecanismo dominante do fator de perda a 5 °C é a rotação dipolar e a 90 °C a condução iônica. Comportamento similar, nas mesmas condições, foi encontrado para as fórmulas infantis (FI1, FI2 e FI3) e leite de vaca (cru, integral e semi-desnatado).

Figura 4.2 – Gráfico Cole-Cole da permissividade complexa do leite humano na faixa de frequência entre (500 e 3000) MHz e temperaturas de (5 a 90) °C

Fonte: A autora (2017)

Na Figura 4.3 é apresentada a diferença no mecanismo dominante do fator de perda da fórmula infantil FI1, na faixa de frequência de (500 a 3000) MHz e nas temperaturas de (5 e 90) °C, sendo que o componente iônico (ϵ''_{σ}) foi calculado a partir da eq. (17) e o componente dipolar (ϵ''_d) da eq. (19). Nota-se que a perda iônica decai com o aumento da frequência (redução do movimento iônico) e a perda por rotação de dipolo aumenta conforme o aumento da frequência (aproximando-se do pico de relaxação da água). No entanto, o principal efeito da frequência sobre o fator de perda depende da temperatura. A 5 °C, a perda devido à rotação de dipolo é dominante e a 90 °C, prevalece o mecanismo de perda por conta da condução iônica, devido ao aumento da condutividade elétrica. Comportamento similar foi

observado para os outros alimentos estudados.

Figura 4.3 – Contribuição da condutividade elétrica sobre a perda por condução iônica (ϵ''_{σ}) e a perda por dipolos (ϵ''_d) sobre o fator de perda da FI1 em temperaturas de (5 e 90) °C

Fonte: A autora (2016)

Na Figura 4.4 são apresentadas as contribuições dos componentes iônicos (C''_{σ}) e dipolar (C''_d) sobre o fator de perda da FI1, que foram calculadas de acordo com as equações (20) e (21), respectivamente.

Observa-se que a contribuição do componente iônico (C''_{σ}) sobre o fator de perda foi maior na frequência de 915 MHz e aumentou com o aumento da temperatura, enquanto o dipolar (C''_d) apresentou um comportamento inverso. Comportamento similar foi obtido para outros alimentos (FRANCO et al., 2015; SIGUEMOTO; GUT, 2016).

Segundo Zhang (2005), é importante conhecer a condutividade elétrica do alimento que será processado termicamente assistido por micro-ondas, pois o seu aquecimento também ocorre devido a resistência elétrica. Na Figura 4.5, observa-se que para todos os alimentos, a condutividade elétrica aumentou com o aumento da temperatura de (5 a 90) °C, devido à diminuição da resistência na movimentação dos íons.

Figura 4.4 – Contribuição dos componentes iônicos (ϵ''_{σ}) e dipolar (ϵ''_d) sobre o fator de perda da FI1 nas temperaturas de (5 a 90) °C a frequência de (915 e 2450) MHz

Fonte: A autora (2016)

Figura 4.5 – Condutividade elétrica (σ) em função da temperatura de (5 a 90) °C para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs)

Fonte: A autora (2017)

Na Tabela 4.2, são apresentados os parâmetros de ajuste das correlações, de acordo com a eq. (23), da condutividade elétrica dos alimentos estudados.

$$\sigma = \alpha_1 \cdot T + \alpha_2 \quad (23)$$

Tabela 4.2 - Parâmetros das regressões lineares e coeficientes de determinação da condutividade elétrica para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs)

Alimento	α_1 (mS/cm °C)	α_2 (mS/cm)	r^2
LV cru tipo B	$0,0984 \pm 0,0012$	$2,637 \pm 0,066$	0,9954
LV integral tipo A	$0,0913 \pm 0,0005$	$2,117 \pm 0,027$	0,9991
LV semi-desnatado tipo A	$0,0947 \pm 0,0010$	$2,119 \pm 0,056$	0,9967
LH	$0,0437 \pm 0,0608$	$0,762 \pm 0,001$	0,9912
F11	$0,0421 \pm 0,0003$	$1,151 \pm 0,015$	0,9987
F12	$0,0634 \pm 0,0008$	$1,371 \pm 0,042$	0,9955
F13	$0,0566 \pm 0,0005$	$1,211 \pm 0,025$	0,9980

As equações de regressão são válidas para temperaturas entre (5 e 90) °C

Fonte: A autora (2017)

Os valores da profundidade de penetração (d_p), calculados nas frequências comerciais de (915 e 2450) MHz em função da temperatura, estão apresentados na Figura 4.6 para todos os alimentos estudados.

Nota-se que, na frequência de 915 MHz e após a temperatura entre (10 e 40) °C, dependendo do alimento, a profundidade de penetração decresceu com o aumento da temperatura, enquanto que, na frequência de 2450 MHz, o comportamento foi inverso, para todos os alimentos estudados. Além disso, observa-se uma maior penetração das micro-ondas na frequência de 915 MHz, como descrito por Zhu, Guo e Jia (2014), Franco et al. (2015) e Siguemoto e Gut (2016).

A profundidade de penetração foi mais fortemente influenciada pela frequência do que pela temperatura. Por exemplo, para o leite de vaca semi-desnatado, na frequência de 915 MHz, as profundidades de penetração obtidas foram (31,60 e 16,12) mm na temperatura de (5 e 90) °C, respectivamente; já na frequência de 2450 MHz, os valores foram (8,61 e 11,64) mm, nas temperatura de (5 e 90) °C, respectivamente. Este comportamento está associado com a diminuição do comprimento de onda eletromagnética na medida em que a frequência de oscilação do campo aumenta. Resultados similares foram obtidos para a proteína do soro de leite (WANG et al., 2003) e para leite de vaca e cabra (ZHU; GUO; JIA, 2014).

Figura 4.6 – Profundidade de penetração (d_p) nas frequências de (915 e 2450) MHz e temperaturas de (5 a 90) °C para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs)

Fonte: A autora (2017)

Para facilitar a aplicação dos resultados obtidos, foi realizada uma regressão múltipla para descrever a dependência das propriedades dielétricas (ϵ' e ϵ'') sobre a temperatura (T) e frequência (f) do leite de vaca (cru tipo B, integral e semi-desnatado tipo A), fórmulas infantis (FI1, FI2 e FI3) e leite humano. As correlações obtidas, apresentadas na Tabela 4.3, são válidas para temperaturas entre (5 e 50) °C e frequências entre (2000 a 3000) MHz. Esses intervalos de temperatura e frequência foram escolhidos porque a temperatura de 5 °C representa uma condição inferior a temperatura média de armazenamento do leite na geladeira dos consumidores e a de 50 °C representa a temperatura de aquecimento do alimento no micro-ondas doméstico para posterior consumo. O intervalo de frequência utilizado é suficiente para determinar as propriedades dielétricas na frequência dos micro-ondas domésticos (2450 MHz).

Conhecer as propriedades dielétricas do leite é necessário para entender como elas interagem com o campo elétrico oscilante e assim determinar as dimensões adequadas do recipiente (tubo) que será utilizado no processamento térmico assistido por micro-ondas, obtendo-se um aquecimento uniforme (DATTA ; SUMNU; RAGHAVA, 2005; SALVI et al., 2011).

Tabela 4.3 – Regressões múltiplas obtidas das propriedades dielétricas (ϵ' e ϵ'') no intervalo de (5 a 50) °C e frequência de (2 a 3) GHz para os leites de vaca (LV), leite humano (LH) e fórmulas infantis (FIs)

Alimento	Equação		r^2
LV cru tipo B	$\epsilon' = (70,43 - 0,46T - 0,59f^2 - 1,34 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,041Tf)$	$\pm 0,37$	0,9878
	$\epsilon'' = (13,85 - 0,07T + 0,74f^2 + 3,25 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,10Tf)$	$\pm 0,43$	0,9813
LV integral tipo A	$\epsilon' = (74,23 - 0,22T - 0,67f^2 - 2,62 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,061Tf)$	$\pm 0,46$	0,9827
	$\epsilon'' = (15,44 - 0,12T + 0,90f^2 + 3,84 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,11Tf)$	$\pm 0,32$	0,9893
LV semi-desnatado tipo A	$\epsilon' = (76,99 - 0,25T - 0,66f^2 - 1,46 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,064Tf)$	$\pm 0,37$	0,9852
	$\epsilon'' = (15,60 - 0,13T + 0,87f^2 + 4,26 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,11Tf)$	$\pm 0,38$	0,9821
LH	$\epsilon' = (63,82 - 0,36T - 0,62f^2 - 1,78 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,052Tf)$	$\pm 0,21$	0,9923
	$\epsilon'' = (12,67 - 0,22T + 0,77f^2 + 4,30 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,081Tf)$	$\pm 0,29$	0,9902
FI1	$\epsilon' = (75,29 - 0,24T - 0,68f^2 - 1,91 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,062Tf)$	$\pm 0,37$	0,9858
	$\epsilon'' = (13,47 - 0,19T + 0,95f^2 + 3,75 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,094Tf)$	$\pm 0,39$	0,9863
FI2	$\epsilon' = (72,39 - 0,18T - 0,71f^2 - 2,61 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,062Tf)$	$\pm 0,33$	0,9823
	$\epsilon'' = (14,19 - 0,14T + 0,95f^2 + 3,18 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,091Tf)$	$\pm 0,28$	0,9926
FI3	$\epsilon' = (76,27 - 0,21T - 0,65f^2 - 2,31 \cdot 10^{-3}T^2 + 0,064Tf)$	$\pm 0,43$	0,9871
	$\epsilon'' = (13,55 - 0,12T + 0,89f^2 + 2,88 \cdot 10^{-3}T^2 - 0,093Tf)$	$\pm 0,52$	0,9805

Fonte: A autora (2017)

4.3 Etapa 2 – Estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP) em leite humano e de vaca por aquecimento por micro-ondas

Após estudar as propriedades dielétricas, em uma ampla faixa de temperatura, nessa seção, inicia-se a discussão sobre os resultados do estudo da cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP) em leite humano e de vaca submetidos ao processamento térmico assistido por micro-ondas.

A Figura 4.7 mostra o histórico da temperatura, a 70 °C, em diversos tempos de processo (5 a 300) s para o leite humano submetido ao processamento térmico assistido por micro-ondas. Observa-se que foi possível obter a temperatura constante durante o processamento devido à agitação constante das amostras, que foi garantida pelo agitador magnético do equipamento.

A atividade residual da enzima ALP, após ser processada termicamente assistida por micro-ondas, diminuiu com aumento do tempo de tratamento e temperatura (Figura 4.8). Nota-se que, para o leite humano (Figura 4.8A), a partir da temperatura de 60 °C e tempo de processamento de 15 s, já é possível obter uma inativação enzimática de 55 %, que corresponde a atividade residual de 0,45. Para temperaturas acima de 65 °C e após 15 s de processamento foi possível reduzir

consideravelmente a atividade da ALP. Comportamento similar foi obtido para o leite de vaca (Figura 4.8B).

Lin e Ramaswamy (2011) avaliaram o efeito do tratamento térmico contínuo assistido por micro-ondas sobre a atividade da enzima ALP em leite de vaca e observaram uma inativação de 36 % a temperatura de 65 °C e tempo de processo de 25 s.

Figura 4.7 – Histórico da temperatura do leite humano durante o aquecimento por micro-ondas a temperatura de 70 °C e nos tempos de processo de (5 a 300) s

Fonte: A autora (2017)

Figura 4.8 – Redução da atividade da enzima ALP após o aquecimento por micro-ondas na faixa de temperatura de (50 a 80) °C e nos tempos de processo de (15 a 300) s para o leite humano (A) e leite de vaca (B)

Fonte: A autora (2017)

Com base na redução da atividade enzimática e nos históricos de temperatura, foram ajustados os parâmetros cinéticos ao modelo de primeira ordem (eq. 5) utilizando a temperatura de referência de 70 °C. Na Tabela 4.4 os parâmetros ajustados (D e z) e o valor minimizado do somatório do erro quadrático entre os valores experimentais e calculados da atividade residual (SEQ), são apresentados.

Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos (D e z) para a ALP em leite humano e de vaca tipo B submetidos ao aquecimento por micro-ondas a temperatura de referência de 70 °C

Alimento	D_{ref} (s)	z (°C)	SEQ	r^2
Leite humano	1,1	4,4	0,16	0,98
Leite de vaca tipo B	44,3	7,4	0,13	0,99

O valor de z é válido para o intervalo de temperatura de (50 a 80) °C

Fonte: A autora (2017)

Comparando os valores de D_{ref} nota-se uma diferença entre as resistências térmicas, pois para uma redução de 10 % na atividade enzimática a 70 °C foram necessários 1,1 s para o leite humano e 44,3 s para o leite de vaca. Segundo Wilinska et al. (2007) esta diferença pode ser atribuída à interação de compostos presentes em cada tipo de leite com a enzima.

Levieux, Geneix e Levieux (2007) submeteram amostras de leite de vaca em aquecimento em banho termostatzado e avaliaram o efeito da temperatura e do tempo de exposição sobre a atividade da ALP. O tratamento térmico foi conduzido na faixa de temperatura de (50 a 60) °C por períodos de (5 a 60) min. A taxa de inativação variou com a temperatura e também seguiu a cinética de primeira ordem. No intervalo de (50 a 60) °C o valor de z determinado foi de 6,7 °C para $D_{50\text{ °C}} = 552,9$ min e $D_{60\text{ °C}} = 23,9$ min. Claeys et al. (2001) determinaram os parâmetros cinéticos para inativação da ALP, em leite de vaca, de $D_{60\text{ °C}} = 24,6$ min e $z = 5,3$ °C utilizando aquecimento térmico em banho termostatzado.

Lin e Ramaswamy (2011) estudaram a cinética de inativação da enzima ALP em leite de vaca submetido ao aquecimento convencional variando a temperatura de (60 a 75) °C e por aquecimento contínuo por micro-ondas nas temperaturas de (65 e 70) °C. Os citados autores determinaram valores de D de 182,7 s a 65 °C e 16,6 s a 70 °C e um valor de z de 5,2 °C para o aquecimento convencional e de 17,6 s a 65 °C e 1,7 s a 70 °C com valor de z de 4,9 °C para o leite de vaca processado de modo contínuo assistido por micro-ondas. Os autores concluíram que a inativação da

enzima ALP ocorreu mais rápido no processo assistido por micro-ondas quando comparado ao processo convencional em banho termostatizado de água. Nesse estudo, os resultados obtidos para o leite de humano ($D_{70^{\circ}\text{C}} = 1,1 \text{ s}$ e $z = 4,4^{\circ}\text{C}$) foram similares aos obtidos por Lin e Ramaswamy (2011) para o leite de vaca ($D_{70^{\circ}\text{C}} = 1,7 \text{ s}$ e $z = 4,9^{\circ}\text{C}$) aquecido de modo contínuo por micro-ondas.

A Figura 4.9 apresenta as curvas de inativação térmica da ALP, em leite humano (Figura 4.9A) e leite de vaca (Figura 4.9C), obtidas do ajuste dos dados experimentais para diferentes temperaturas de referência em função do tempo equivalente do processo. Além disso, o gráfico de paridade (Figura 4.9B para leite humano e Figura 4.9D para o leite de vaca) da atividade residual calculada em função da experimental, indicam um bom ajuste, com espalhamento dos pontos ao redor da linha de 45° .

Nota-se que a atividade residual calculada, curva pontilhada, da enzima ALP atingiu níveis não detectáveis para tempos equivalentes de processo acima de 400 s e temperaturas acima de 60°C para o leite humano (Figura 4.9A) e 65°C para o leite de vaca (Figura 4.9C). Por outro lado, a 50°C , a resistência térmica da ALP nos dois tipos de leite foi similar e constante ao longo de todo o processo.

Ao comparar os dois tipos de leite, para obter uma inativação de 99 % da enzima ALP ($A/A_0 = 0,01$), a temperatura de 60°C , foi necessária uma exposição 4,9 vezes maior para o leite de vaca: tempo equivalente de 1960 s para o leite de vaca e de 400 s para o leite humano, segundo a curva de inativação obtida do ajuste dos dados experimentais.

Obtidos os parâmetros cinéticos de inativação da enzima ALP, as condições ótimas para processamento assistido por micro-ondas dos dois tipos de leite foram determinadas com base no estudo de Murthy (1992), que afirma que concentrações superiores a $1 \mu\text{g}$ de fenol/mL, produto resultante da atividade enzimática, indicam pasteurização insuficiente ou uma contaminação por leite cru.

Figura 4.9 – Curvas de inativação térmica da enzima ALP em leite humano (A), e respectivo gráfico de paridade entre a atividade enzimática residual predita e experimental (B), e leite de vaca tipo B (C), e respectivo gráfico de paridade entre a atividade enzimática residual predita e a experimental (D), submetidos ao aquecimento por micro-ondas

Fonte: A autora (2017)

A Figura 4.10 apresenta as concentrações de fenol em amostras de leite, que foram calculadas a partir da equação, $A = 0,371c + 0,092$ (Figura 3.4A) para o leite de

humano e $A = 0,381c + 0,099$ (Figura 3.4B) para o leite de vaca, juntamente com os respectivos desvios padrão.

Comparando as Figuras 4.10A e B, observa-se que o leite de vaca possui maior concentração de fenol do que o leite humano, (29,15 e 1,55) μg de fenol/mL de leite, respectivamente, na temperatura de 50 °C e tempo de processo de 15 s. Segundo Ur-Rehman et al. (2006) esta diferença ocorre porque a enzima ALP encontra-se ligada à outras proteínas, em particular a caseína, que está presente em maior concentração no leite de vaca.

Para o leite de vaca (Figura 4.10A), observa-se que o tempo de retenção de 300 s e a temperatura de 60 °C não foram suficientes (1,99 μg de fenol/mL de leite) para inativar a ALP ao nível desejado, porém na condição de 65 °C por 45 s a inativação da ALP foi efetiva (0,75 μg de fenol/mL de leite), apresentando concentração menor que 1 μg de fenol/mL de leite, atendendo ao padrão de qualidade estabelecido por Marshall (1992). Para o leite humano (Figura 4.10B) a condição ótima obtida foi a 60 °C por 30 s. Não foi considerado como condição ótima a temperatura de 55 °C por 300 s (1,02 μg de fenol/mL de leite) ou a de 60 °C por 15 s (0,98 μg de fenol/mL de leite), porque as concentrações de fenol ficaram muito próximas do limite máximo estabelecido (1 μg de fenol/mL de leite).

Após a determinação das condições ótimas para processamento do leite de vaca (65 °C por 45 s) e leite humano (60 °C por 30 s) foram calculados os valores de esterização (SV), através da eq. (12), de 5,2 para o leite de vaca tipo B e de 3,7 para o leite humano. Com esses valores, que representam os números de reduções decimais necessários para manter a atividade da enzima ALP em um nível desejado, foi possível obter os novos binômios tempo-temperatura, de 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s para o leite humano e 70 °C por 10 s para o leite de vaca, e assim avaliar o efeito do processamento térmico assistido por micro-ondas, nessas condições, sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais e compostos bioativos, para o leite humano.

Figura 4.10 – Concentrações de fenol (μg de fenol/mL de leite) presentes em leite de vaca tipo B (A) e leite humano (B), submetidos a diferentes temperaturas e tempos de processo

Fonte: A autora (2017)

4.4 Etapa 3 – Avaliação do efeito do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a letalidade microbiana, perfil de ácidos graxos, de minerais, de proteínas e compostos bioativos em comparação com o processo convencional (*Holder*)

4.4.1 Letalidade microbiana

O leite humano foi analisado quanto às populações de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, *Staphylococcus aureus* e presença/ausência de *Salmonella* spp. antes e após o processamento térmico assistido por micro-ondas a 60 °C por 30 s (condição ótima) e a 62,5 °C por 30 min, pasteurização *Holder* utilizada nos BLHs. Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 4.5.

Como pode ser observado na Tabela 4.5 não foi detectado *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em leite humano cru e processado termicamente pelos dois métodos; entretanto, as bactérias mesófilas e os coliformes totais, inicialmente com população de (4 e 2) log UFC/mL, respectivamente, apresentaram baixo nível de detecção, < 10 UFC/mL para as bactérias mesófilas e < 0,03 NMP/g para coliformes

totais, após o leite humano ter sido processado termicamente assistido por micro-ondas e pelo método *Holder*.

Tabela 4.5 - População de micro-organismos em leite humano (LH) cru e submetido ao processamento térmico assistido por micro-ondas (60 °C por 30 s) e *Holder* (62,5 °C por 30 min)

Micro-organismos	LH cru	LH processado por	
		Micro-ondas	<i>Holder</i>
Bactérias mesófilas (UFC/mL)	4 log	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	Ausência	Ausência	Ausência
Coliformes totais (NMP/mL)	2 log	< 0,03	< 0,03
<i>Salmonella spp.</i> (em 25 mL)	Ausência	Ausência	Ausência

Fonte: A autora (2017)

Segundo Franco e Landgraf (2008), a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, por isso, é importante determinar a contagem desses micro-organismos porque eles funcionam como indicador da qualidade sanitária do leite. Valores elevados desta contagem, acima de 2 log UFC/mL (BRASIL, 2001), indicam de forma indireta, que a qualidade microbiológica do leite analisado não é satisfatória.

Staphylococcus aureus é o agente mais comum causador de infecções e é facilmente encontrado na orofaringe e na boca e saliva dos seres humanos, com prevalência de (35 a 40) % e de (10 a 35) %, respectivamente (SERAFINI et al., 2003). A maior preocupação quanto a presença de *Staphylococcus aureus* em leite incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de enterotoxinas, que são resistentes ao calor e em quantidades suficientes podem levar a um quadro de intoxicação (JAY, 2005).

Giribaldi et al. (2016) estudaram o efeito da pasteurização HTST (*High-Temperature-Short-Time*) sob a letalidade da bactéria *Staphylococcus aureus* em leite humano. Os autores inocularam a bactéria a uma concentração de $3,0 \times 10^6$ UFC/mL e encontraram um resultado menor que 100 UFC/mL após o aquecimento térmico a 72 °C por 15 s. Os autores também analisaram o leite humano cru, sem o inoculado, e encontraram uma população média de $1,3 \times 10^5$ UFC/mL, muito maior do que a encontrada nesse estudo, ausente.

No estudo realizado por Novak e Almeida (2002) foram avaliadas 343 amostras de leite humano, obtidas a partir de frascos oriundos de coleta domiciliar e recebidas pelo BLH do Instituto Fernandez Figueira do Rio de Janeiro, e os micro-organismos do grupo coliformes totais foram detectados em 31,2 % das amostras analisadas, com populações variando de (1 a 4) log NMP/mL. Neste trabalho, o resultado encontrado de 2 log NMP/mL para a população de coliformes totais em *pool* de leite humano cru, está de acordo com o descrito por Novak e Almeida (2002) e reflete as condições higiênico-sanitárias a que o produto foi submetido, afinal, a presença de coliformes totais em leite humano, indica contaminação fecal (ALMEIDA, 1986). A ANVISA (BRASIL, 2001) determina que a população de coliformes a 35 °C/mL deve ser ausente em leite humano para evitar o risco da presença de patógenos intestinais.

Um outro estudo também foi realizado nesse trabalho, afim de verificar a eficiência do processamento térmico assistido por micro-ondas na condição ótima de 60 °C por 30 s. Foram escolhidos os dois micro-organismos mais termoresistentes, dentre os utilizados nesse estudo, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., para serem inoculados em leite humano, separadamente, a uma concentração de 6 log UFC/mL e depois o leite humano contendo o inoculado foi processado.

O resultado mostrou ausência desses micro-organismos patogênicos após terem sido submetidos ao processamento térmico assistido por micro-ondas, atendendo ao padrão de qualidade estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001) e confirmando a eficiência desse processo na condição de 60 °C por 30 s.

É importante ressaltar que, o leite humano é um líquido rico em fatores anti-infecciosos que protegem o lactente, por isso, durante o aleitamento materno, não há transferência dos micro-organismos estudados nesse trabalho para a criança, pois eles são contaminantes secundários, isto é, a sua presença é indicativa de contaminantes externos provenientes de manipuladores, utensílios e equipamentos (PONTES; IVASAKI; OLIVEIRA, 2003).

4.4.2 Perfil de ácidos graxos em leite humano

A Tabela 4.6 mostra o perfil de ácidos graxos em leite humano cru, pasteurizado pelo método convencional (*Holder*) e processado termicamente

assistido por micro-ondas (60 °C por 30 s). Foi possível identificar nove ácidos graxos no leite humano e não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os teores após o leite humano ter sido processado termicamente pelos dois métodos (*Holder* e micro-ondas).

Dentre os nove ácidos graxos encontrados, os ácidos oleico, palmítico e linoleico apresentam maior teor, representando (28, 25 e 20) % dos ácidos graxos totais presentes no leite humano cru e processado termicamente pelos dois métodos (Tabela 4.6).

Não foram encontrados estudos sobre o efeito do aquecimento por micro-ondas sobre os teores de ácido graxos em leite humano, apenas em leite de vaca, e os autores também relataram que o perfil de ácidos graxos não foi afetado após pasteurização, esterilização e aquecimento por micro-ondas (CAPPOZZO; KOUTCHMA; BARNES, 2015; LYNCH et al., 2005; PESTANA et al., 2015).

Azeredo (2013) avaliou o perfil de ácidos graxos em leite humano cru e encontrou 43 g/100 g de ácidos graxos saturados, 34 g/100 g de ácidos graxos monoinsaturados e 23 g/100 g de ácidos graxos poli-insaturados, sendo que nesse estudo foi encontrado (49, 30 e 21) g/100 g, respectivamente.

Yuhas, Pramuk e Lien (2006) encontraram maior proporção de ácido oleico no leite humano de nutrizes da China (36 g/100 g) e do Canadá (35 g/100 g) em comparação com as nutrizes do Chile (26 g/100 g) e Filipinas (22 g/100 g). Segundo os autores, o alto teor de ácido oleico verificado no leite das nutrizes da China e do Canadá está associada ao elevado consumo de óleo de canola por essa população. Nesse estudo, foi obtido um teor médio de 28 g/100 g de ácido oleico em leite humano cru.

Tabela 4.6 – Composição de ácidos graxos em leite humano (LH) cru e submetido ao processamento térmico assistido por micro-ondas e convencional (*Holder*)

Ácidos graxos	LH cru (g/100 g)	LH processado termicamente pelo método:		DMS
		Holder (g/100 g)	Micro-ondas (g/100 g)	
Saturados				
C10:0 (cáprico)	1,7 ± 0,33 ^a	1,8 ± 0,24 ^a	1,8 ± 0,4 ^a	0,38
C12:0 (láurico)	8,0 ± 1,5 ^a	8,3 ± 1,6 ^a	8,1 ± 1,6 ^a	1,91
C14:0 (mirístico)	8,5 ± 2,3 ^a	8,4 ± 2,1 ^a	8,5 ± 2,1 ^a	2,65
C16:0 (palmítico)	25 ± 2,6 ^a	24 ± 2,1 ^a	25 ± 2,5 ^a	2,94
C18:0 (esteárico)	6,6 ± 1,0 ^a	6,5 ± 0,7 ^a	7,1 ± 0,8 ^a	1,04
Monoinsaturados				
C16:1 (palmitoleico)	1,8 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,2 ^a	0,32
C18:1 n-9 (oleico)	28 ± 4,3 ^a	28 ± 3,8 ^a	28 ± 4,0 ^a	4,99
Poli-insaturados				
C18:2 n-6 (linoleico)	20 ± 3,7 ^a	20 ± 3,7 ^a	19 ± 4,0 ^a	4,72
C18:3 n-3 (α-linolênico)	1,4 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,03 ^a	1,4 ± 0,10 ^a	0,09

Os resultados são médias de três repetições ± desvio padrão. Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$); DMS = Diferença Mínima Significativa

Fonte: A autora (2017)

4.4.3 Perfil de minerais em leite humano

O perfil de minerais em leite humano cru e processado termicamente pelo método *Holder* (62,5 °C por 30 min) e assistido por micro-ondas (60 °C por 30 s) é apresentado na Tabela 4.7. Nota-se que, dentre os sete minerais estudados, o Zn foi o único mineral que apresentou diferença estatisticamente significativa entre o teor do leite humano processado pelo método *Holder* (5,3 ± 0,32) mg/L e o assistido por micro-ondas (3,4 ± 0,14) mg/L. Os outros minerais ou não apresentaram diferença estatisticamente significativa ou apresentaram entre o leite humano cru e os processados termicamente pelos dois métodos.

Góes et al. (2002) estudaram a influencia do processamento térmico convencional (*Holder*) sobre a distribuição do Zn entre três frações (lipídios, soro e caseína) do leite humano. Apesar do teor de Zn não ter sido alterado significativamente pelo processamento térmico (1,5 ± 1,02 para 1,5 ± 0,96) mg/L, os autores observaram uma variação na distribuição de Zn entre as frações do leite, com um aumento significativo do teor de Zn na fração de lipídios (0,19 ± 0,10 para

0,28 ± 0,12) mg/L e uma diminuição (0,73 ± 0,70 para 0,48 ± 0,31) mg/L na fração do soro do leite. Segundo os autores, a troca de Zn entre as frações do leite possivelmente ocorreu devido ao congelamento do leite antes da pasteurização, que provocou quebra das membranas de lipídios, levando a exposição de novos locais para a ligação do Zn, como por exemplo, nos grupos carboxílicos de ácidos graxos livres, e a pasteurização *Holder*, que proporcionou um ambiente adequado devido a desnaturação de proteínas do soro do leite.

Os teores do Ca, Na e P apresentaram diferença significativa entre os valores do leite humano cru e o processado termicamente pelos dois métodos. Observando a Tabela 4.7, nota-se que o teor desses minerais diminuiu após os processamentos térmicos, com exceção do Ca que apresentou teor de 341 mg/L no leite humano cru e de (460 e 389) mg/L, após ter sido submetido ao processamento térmico *Holder* e assistido por micro-ondas, respectivamente.

Segundo Patel et al. (1986), 60 % do cálcio presente no leite está ligado à caseína. O tratamento térmico promove a desnaturação dessa proteína e consequentemente, a remoção do cálcio da micela para a fase aquosa, que passa a se apresentar livre em solução, por isso, há uma maior concentração desse nutriente no leite processado termicamente quando comparado com o leite cru.

Tabela 4.7 – Perfil de minerais em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelo método convencional (*Holder*) e assistido por micro-ondas

	LH cru	LH processado termicamente pelo método:		DMS
		<i>Holder</i>	Micro-ondas	
Ca (mg/L)	341 ± 20 ^a	460 ± 18 ^b	389 ± 3,2 ^b	49,9
K (mg/L)	509 ± 33 ^a	501 ± 51 ^a	475 ± 74 ^a	75,9
Na (mg/L)	294 ± 9,2 ^a	205 ± 4,6 ^b	174 ± 24 ^b	47,8
P (mg/L)	296 ± 17 ^a	203 ± 15 ^b	156 ± 22 ^b	78,9
Zn (mg/L)	5,4 ± 0,52 ^a	5,3 ± 0,32 ^a	3,4 ± 0,14 ^b	1,1
Fe (mg/L)	3,4 ± 0,11 ^a	2,5 ± 0,51 ^a	2,3 ± 0,33 ^a	1,1
Cu (mg/L)	0,7 ± 0,03 ^a	0,7 ± 0,04 ^a	0,7 ± 0,12 ^a	0,3

Os resultados são médias de triplicatas independentes ± desvio padrão. Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$); DMS = Diferença Mínima Significativa

Fonte: A autora (2017)

Na Tabela 4.8 estão apresentados os teores de minerais obtidos nesse estudo e em outros trabalhos. Observa-se que há variações entre os teores minerais

encontrados, que pode ter ocorrido devido as variações longitudinais, circadianas e interindividuais das doadoras. Variações na dieta, no procedimento de coleta e nos ciclos de congelamento e descongelamento do leite humano também podem afetar a composição desses nutrientes.

Tabela 4.8 – Comparação do perfil de minerais em leite humano cru obtido nesse trabalho (Leite, 2017) com o de outros autores

	Leite (2017)	Yasar et al. (2013)	Li et al. (2017)	Góes et al. (2002)
Ca (mg/L)	341 ± 20	278 ± 1,2	280 ± 34	237 ± 53
K (mg/L)	509 ± 33	-	-	-
Na (mg/L)	294 ± 9,2	-	-	-
P (mg/L)	296 ± 17	-	152 ± 22	132 ± 31
Zn (mg/L)	5,4 ± 0,52	2,4 ± 0,05	3,6 ± 0,13	1,5 ± 1,02
Fe (mg/L)	3,4 ± 0,11	2,6 ± 0,11	1,1 ± 0,85	0,7 ± 0,31
Cu (mg/L)	0,7 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,12

Fonte: A autora (2017)

Segundo Góes et al. (2002), os minerais Ca, K, Fe, Cu e Zn estão entre os nutrientes que podem ser deficientes em lactentes prematuros, portanto, é importante compreender como os processamentos térmicos afetam os teores desses micro e macro-nutrientes, para assim estabelecer níveis para possíveis fortificações ou suplementações do leite humano processado nos BLHs.

4.4.4 Compostos bioativos (oligossacarídeos) e Proteínas (imunoglobulinas e lactoferrina)

Nesta etapa foram determinados os oligossacarídeos, lactoferrina e imunoglobulinas em amostras de leite humano cru e processadas termicamente pelo método convencional (*Holder*, 62,5 °C por 30 min) e assistidas por micro-ondas em diferentes condições de processo (60 °C por 30 s, 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s).

4.4.4.1 Oligossacarídeos

A Tabela 4.9 mostra o perfil qualitativo dos oligossacarídeos e a abundância relativa, expressa em %, em relação a quantidade total de oligossacarídeos detectados em leite humano por meio da cromatografia em equipamento Q-ToF

(HPLC-chip/TOF MS). A Tabela 4.10 mostra os oligossacarídeos que foram quantificados com precisão por Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance (HPAEC-PAD) em sistema Dionex.

Analisando a Tabela 4.9 observa-se que foram encontradas fórmulas moleculares iguais com diferentes tempos de retenção (t_r), indicando a detecção de isômeros pelo equipamento. As fórmulas moleculares em negrito e sublinhadas correspondem aos oligossacarídeos que foram quantificados com precisão por HPAEC-PAD.

A quantificação de compostos por cromatografia em sistema Dionex geralmente é limitada a algumas estruturas devido à escassez de padrões comerciais. No presente estudo, dos 90 compostos encontrados pela técnica em equipamento Q-ToF (Tabela 4.9), incluindo isômeros e anômeros, apenas 7 foram quantificados com precisão pela técnica em sistema Dionex (Tabela 4.10).

Nos resultados obtidos por cromatografia em equipamento Q-ToF, diferenças estatisticamente significativas entre os oligossacarídeos do leite humano cru e do leite processado termicamente pelo método *Holder* e assistido por micro-ondas, em diferentes condições de processo, não foram observadas; entretanto, por cromatografia em sistema Dionex, foram detectadas alterações nos teores de dois oligossacarídeos (LNH e LNFPI) após os processamentos térmicos. O LNH apresentou diferença estatisticamente significativa entre o teor do leite humano cru e o tratado termicamente pelos dois métodos e o LNFPI entre o leite humano cru e o processado termicamente assistido por micro-ondas a 70 °C por 10 s.

Apesar das diferenças estatisticamente significativas encontradas para os compostos LNH e LNFPI, nota-se que o teor total de oligossacarídeos em leite humano não foi afetado significativamente pelos dois métodos de processamento térmico (Tabela 4.10).

Bertino et al. (2008) e Giuliani et al. (2008) estudaram o efeito da pasteurização *Holder* sobre os oligossacarídeos em leite humano e também não encontraram variações estatisticamente significativas no teor total de oligossacarídeos após o processamento térmico.

Tabela 4.9 – Perfil qualitativo e abundância relativa (%) dos oligossacarídeos (OS) em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelos dois tratamentos térmicos (*Holder* e assistido por micro-ondas)

				Abundância relativa (%) dos OS em LH processado termicamente pelo método:				
				<i>Holder</i>	Micro-ondas			LH cru
	Fórmula	Massa	t_r		60°C/30s	65°C/15s	70°C/10s	
1	C ₁₇ H ₂₉ NO ₁₄	471,16	24,32	1,86	1,86	2,21	2,32	2,63
2	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₅ (2-FL)	488,18	11,05	6,71	6,57	5,99	6,25	7,50
3	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504,17	8,80	0,15	0,16	0,11	0,08	0,15
4	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504,17	12,73	0,95	1,01	0,94	0,92	1,12
5	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504,17	14,95	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06
6	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504,17	15,80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05
7	C ₂₀ H ₃₅ NO ₁₆	545,20	12,14	0,62	0,63	0,55	0,56	0,72
8	C ₂₀ H ₃₅ NO ₁₆	545,20	16,33	0,18	0,19	0,21	0,20	0,22
9	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉ (3-SL/6-SL)	633,21	17,62	6,42	6,31	6,46	6,32	7,41
10	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉ (3-SL/6-SL)	633,21	16,32	1,50	1,56	1,41	1,57	1,60
11	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₉	634,23	10,16	5,21	5,21	4,61	4,76	5,95
12	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666,22	14,48	0,24	0,26	0,28	0,24	0,32
13	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666,22	12,84	0,19	0,21	0,21	0,16	0,21
14	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁	707,25	14,72	1,66	1,79	1,45	1,23	1,18
15	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₅ (LNFPI)	853,31	10,33	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
16	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₆ (LNFPI)	869,30	20,60	0,24	0,23	0,21	0,18	0,23
17	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₆ (LNFPI)	869,30	19,54	0,22	0,24	0,21	0,21	0,25
18	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₆ (LNFPI)	869,31	21,65	0,12	0,11	0,11	0,11	0,15
19	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁ (LNNt/LNT)	707,25	12,28	1,15	1,19	1,33	1,44	1,46
20	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁ (LNNt/LNT)	707,25	16,95	29,41	29,27	30,32	29,32	33,87
21	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₅ (LNFPI)	853,31	12,23	6,57	6,32	6,44	6,49	7,09
22	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂₅ (LNFPI)	853,31	15,43	6,81	6,57	6,42	6,67	7,47
23	C ₃₇ H ₆₂ N ₂ O ₂₉	998,35	25,07	3,66	3,52	3,77	3,76	3,56
24	C ₄₀ H ₆₈ N ₂ O ₃₁ (LNH)	1072,39	19,75	0,88	0,92	0,91	0,89	0,69
25	C ₄₀ H ₆₈ N ₂ O ₃₁ (LNH)	1072,39	18,04	0,42	0,45	0,46	0,47	0,33
26	C ₄₀ H ₆₈ N ₂ O ₃₁ (LNH)	1072,38	21,83	5,83	5,87	5,68	5,67	5,63
27	C ₄₅ H ₇₅ N ₃ O ₃₄	1201,43	26,90	0,25	0,25	0,26	0,26	0,15
28	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₃₅	1218,44	19,10	3,22	2,98	3,14	3,02	2,48
29	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₃₅	1218,44	18,04	1,25	1,21	1,31	1,30	0,90
30	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₃₅	1218,44	23,89	0,97	1,01	0,86	0,80	0,78
31	C ₅₁ H ₈₅ N ₃ O ₃₉	1363,48	26,71	3,85	3,79	3,89	3,76	1,57
32	C ₅₂ H ₈₈ N ₂ O ₃₉	1364,49	18,60	0,46	0,45	0,51	0,51	0,37
33	C ₅₂ H ₈₈ N ₂ O ₃₉	1364,49	17,39	0,24	0,26	0,28	0,27	0,13
34	C ₅₂ H ₈₈ N ₂ O ₃₉	1364,50	15,66	0,24	0,22	0,29	0,32	0,13
35	C ₅₄ H ₉₁ N ₃ O ₄₁	1437,52	26,88	0,18	0,19	0,17	0,15	0,16
36	C ₅₄ H ₉₁ N ₃ O ₄₁	1437,51	30,35	0,07	0,06	0,07	0,05	0,01
37	C ₅₇ H ₉₅ N ₃ O ₄₃	1509,54	29,39	0,07	0,08	0,09	0,09	0,02
38	C ₅₇ H ₉₅ N ₃ O ₄₃	1509,54	27,76	0,49	0,49	0,43	0,45	0,16
39	C ₅₈ H ₉₈ N ₂ O ₄₃	1510,54	23,56	0,20	0,20	0,24	0,22	0,07
40	C ₅₈ H ₉₈ N ₂ O ₄₃	1510,55	20,48	0,07	0,07	0,08	0,09	0,04
41	C ₅₈ H ₉₈ N ₂ O ₄₃	1510,55	18,59	0,09	0,08	0,11	0,09	0,05
42	C ₅₈ H ₉₈ N ₂ O ₄₃	1510,54	25,96	1,03	0,95	1,13	1,10	0,27
43	C ₆₀ H ₁₀₁ N ₃ O ₄₅	1583,57	24,55	0,19	0,18	0,21	0,22	0,08
44	C ₆₀ H ₁₀₁ N ₃ O ₄₅	1583,57	22,48	0,50	0,55	0,57	0,53	0,19
45	C ₆₃ H ₁₀₅ N ₃ O ₄₇	1655,58	29,67	0,07	0,07	0,06	0,05	0,02
46	C ₆₃ H ₁₀₅ N ₃ O ₄₇	1655,58	32,71	0,52	0,52	0,62	0,55	0,09

continuação

conclusão								
Abundância relativa (%) dos OS em LH processado termicamente pelo método:								
Fórmula	Massa	t_r	Holder		Micro-ondas			LH cru
					60°C/30s	65°C/15s	70°C/10s	
47	C ₆₄ H ₁₀₈ N ₂ O ₄₇	1656,60	23,83	0,05	0,04	0,05	0,05	0,02
48	C ₆₅ H ₁₀₈ N ₄ O ₄₉	1728,61	31,37	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01
49	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₃ O ₄₉	1729,63	23,88	0,17	0,17	0,18	0,17	0,08
50	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₃ O ₄₉	1729,63	22,34	0,09	0,08	0,10	0,11	0,04
51	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₃ O ₄₉	1729,62	28,31	0,18	0,18	0,18	0,17	0,04
52	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₃ O ₄₉	1729,62	27,16	0,06	0,06	0,05	0,05	0,02
53	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₃ O ₄₉	1729,63	20,44	0,27	0,25	0,27	0,29	0,12
54	C ₆₈ H ₁₁₄ N ₄ O ₅₁	1802,64	28,55	0,15	0,16	0,19	0,19	0,05
55	C ₇₁ H ₁₁₈ N ₄ O ₅₃	1874,63	31,13	0,17	0,17	0,19	0,20	0,08
56	C ₇₁ H ₁₁₈ N ₄ O ₅₃	1874,63	32,43	0,20	0,18	0,23	0,23	0,08
57	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₃ O ₅₃	1875,68	24,68	0,03	0,04	0,04	0,03	0,01
58	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₃ O ₅₃	1875,67	26,22	0,14	0,12	0,12	0,12	0,03
59	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₃ O ₅₃	1875,69	20,62	0,16	0,13	0,16	0,15	0,03
60	C ₇₄ H ₁₂₄ N ₄ O ₅₅	1948,71	25,04	0,33	0,33	0,35	0,36	0,04
61	C ₇₇ H ₁₂₈ N ₄ O ₅₇	2020,71	33,74	0,08	0,09	0,08	0,06	0,01
62	C ₇₇ H ₁₂₈ N ₄ O ₅₇	2020,73	26,20	0,10	0,10	0,10	0,11	0,02
63	C ₇₇ H ₁₂₈ N ₄ O ₅₇	2020,72	29,44	0,06	0,05	0,07	0,06	0,01
64	C ₇₈ H ₁₃₁ N ₃ O ₅₇	2021,73	22,35	0,05	0,06	0,07	0,06	0,01
65	C ₇₉ H ₁₃₁ N ₅ O ₅₉	2093,74	30,78	0,02	0,02	0,02	0,03	0,00
66	C ₈₀ H ₁₃₄ N ₄ O ₅₉	2094,75	28,55	0,05	0,05	0,04	0,04	0,01
67	C ₈₀ H ₁₃₄ N ₄ O ₅₉	2094,76	23,66	0,19	0,16	0,20	0,20	0,03
68	C ₈₃ H ₁₃₈ N ₄ O ₆₁	2166,77	30,50	0,04	0,03	0,05	0,04	0,01
69	C ₈₃ H ₁₃₈ N ₄ O ₆₁	2166,77	29,18	0,08	0,08	0,09	0,07	0,01
70	C ₈₂ H ₁₃₇ N ₅ O ₆₁	2167,78	27,14	0,04	0,05	0,04	0,04	0,00
71	C ₈₂ H ₁₃₇ N ₅ O ₆₁	2167,77	29,18	0,06	0,06	0,07	0,07	0,01
72	C ₈₄ H ₁₄₁ N ₃ O ₆₁	2167,78	21,80	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08
73	C ₈₅ H ₁₄₁ N ₅ O ₆₃	2239,80	29,99	0,03	0,03	0,04	0,04	0,00
74	C ₈₆ H ₁₄₄ N ₄ O ₆₃	2240,80	28,12	0,10	0,10	0,10	0,10	0,01
75	C ₆₀ H ₁₀₁ N ₃ O ₄₅	1583,57	26,18	0,14	0,16	0,14	0,13	0,08
76	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₃₅	1218,44	16,49	0,37	0,33	0,42	0,44	0,31
77	C ₅₁ H ₈₅ N ₃ O ₃₉	1363,48	26,78	0,00	1,05	0,00	1,03	0,51
78	C ₅₂ H ₈₈ N ₂ O ₃₉	1364,50	20,71	0,18	0,20	0,20	0,19	0,12
79	C ₅₂ H ₈₈ N ₂ O ₃₉	1364,50	14,00	0,50	0,44	0,58	0,59	0,27
80	C ₆₈ H ₁₁₄ N ₄ O ₅₁	1802,65	26,20	0,23	0,26	0,26	0,24	0,07
81	C ₆₈ H ₁₁₄ N ₄ O ₅₁	1802,64	30,31	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04
82	C ₇₁ H ₁₁₈ N ₄ O ₅₃	1874,65	28,90	0,07	0,06	0,05	0,06	0,04
83	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₃ O ₅₃	1875,68	18,13	0,11	0,10	0,12	0,08	0,03
84	C ₇₄ H ₁₂₄ N ₄ O ₅₅	1948,71	26,26	0,06	0,06	0,06	0,05	0,02
85	C ₇₇ H ₁₂₈ N ₄ O ₅₇	2020,72	27,29	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02
86	C ₉₁ H ₁₅₁ N ₅ O ₆₇	2385,85	30,08	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01
87	C ₉₂ H ₁₅₄ N ₄ O ₆₇	2386,86	20,72	0,04	0,04	0,05	0,04	0,01
88	C ₇₈ H ₁₃₁ N ₃ O ₅₇	2021,74	20,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,01
89	C ₇₈ H ₁₃₁ N ₃ O ₅₇	2021,74	18,49	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01
90	C ₈₄ H ₁₄₁ N ₃ O ₆₁	2167,78	27,14	0,03	0,04	0,03	0,04	0,00

O resultado da abundância relativa é média de três experimentos independentes. Os dados expressam a quantidade relativa de um específico oligossacarídeos em relação ao total detectado em cada amostra; t_r = tempo de retenção.

Fonte: A autora (2017)

Tabela 4.10 – Comparação dos oligossacarídeos (OS) em leite humano (LH) cru e processado termicamente pelo método *Holder* e assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo

Grupo	OS	LH cru (g/L)	LH pasteurizado pelo método	LH processado termicamente assistido por micro-ondas na condição de:			DMS
			<i>Holder</i> (g/L)	60 °C por 30 s (g/L)	65 °C por 15 s (g/L)	70 °C por 10 s (g/L)	
Neutros	LNnT	0,19 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,03
	LNT	1,7 ± 0,14 ^a	1,7 ± 0,21 ^a	1,6 ± 0,12 ^a	1,8 ± 0,09 ^a	1,6 ± 0,08 ^a	0,25
	LNH	0,04 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,00 ^b	0,01
Sialilados	3-SL	0,09 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	0,01
	6-SL	0,13 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,02
Fucosilados	LNFP1	0,17 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,02
	2-FL	1,0 ± 0,10 ^a	1,0 ± 0,12 ^a	0,98 ± 0,08 ^a	0,91 ± 0,15 ^a	0,92 ± 0,02 ^a	0,19
Total		3,4 ± 0,29 ^a	3,3 ± 0,41 ^a	3,3 ± 0,25 ^a	3,3 ± 0,15 ^a	3,1 ± 0,12 ^a	0,48

Os resultados são médias de triplicatas independentes ± desvio padrão. Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$); DMS = Diferença Mínima Significativa; LNnT (lacto-N-neotetraose), LNT (lacto-N-tetraose), LNH (lacto-N-hexaose), 3-SL (3-sialyllactose), 6-SL (6-sialyllactose), LNFP1 (lacto-N-fucopentaose I), 2-FL (2'-fucosyllactose).

Fonte: A autora (2017)

Segundo Smilowitz et al. (2014), o leite humano na fase maduro apresenta teor de oligossacarídeos entre (1 e 10) g/L e cerca de (42 a 55) % dos oligossacarídeos são classificados como neutros, (35 a 50) % como fucosilados e (12 a 14) % como sialilados. Nesse trabalho, foi encontrado um teor total de oligossacarídeos de 3,38 g/L para o leite humano cru em estágio maduro.

A fucosilação dos oligossacarídeos é medida por duas fucosiltransferases, FUT2 (gene secretor) e FUT3 (gene Lewis). As mães não secretoras, que não apresentam enzima FUT2 funcional e que representam cerca de 30 % das mulheres de todo mundo, produzem leite sem oligossacarídeos α 1-2-fucosilados, como o 2'-FL e o LNFP1 (KUNZ et al., 2017). A ausência desses componentes pode apresentar consequências funcionais, como por exemplo, colonização tardia de *Bifidobacteria*, maior abundância de *Streptococcus* e diferenças funcionais na atividade metabólica da microbiota (THURL et al., 2010). Por essa razão, é importante que o processamento térmico não afete a composição dos oligossacarídeos no leite humano, pois eles funcionam como agentes prebióticos que estimulam seletivamente o crescimento de organismos benéficos (probióticos).

Visando proporcionar maior confiabilidade nos resultados afim de afirmar que determinado grupo de oligossacarídeos se apresenta em maior concentração no leite

humano, os resultados obtidos por cromatografia em equipamento Q-ToF (Tabela 4.9), foram separados em três grupos (neutros, fucosilados e sialilados) (Figura 4.11). Dessa forma, foi possível avaliar se o grupo que apresenta maior abundância relativa, segundo a técnica por cromatografia em equipamento Q-ToF, corresponde ao grupo com maior teor de oligossacarídeos, segundo a técnica por cromatografia em equipamento Dionex (Tabela 4.10).

A Figura 4.11 mostra que os oligossacarídeos do grupo neutros apresentam maior abundância relativa e representam, em média, 44 % dos oligossacarídeos encontrados no leite humano cru e processado termicamente pelos dois métodos, seguido do grupo fucosilados que corresponde a 38 % e o grupo sialilados, 18 %. Esses resultados estão em acordo com os reportados por Smilowitz et al. (2014) e correspondem aos encontrados por cromatografia em equipamento Dionex, pois somando todos os oligossacarídeos que pertencem ao grupo neutros (LNnT, LNT e LNH), Tabela 4.10, encontra-se um teor médio de 1,94 g/L, que corresponde ao grupo com maior teor de oligossacarídeos (57 %) quando comparado aos grupos fucosilados, 1,18 g/L (LNFPI e 2-FL) (35 %) e sialilados, 0,22 g/L (3-SL e 6-SL) (7 %).

Segundo Amir-Mohammad et al. (2016), os oligossacarídeos do grupo neutros proporcionam rápido crescimento de colônias benéficas de *Lactobacillus* e diminuem o número de micro-organismos patogênicos, como por exemplo, coliformes, no intestino de lactentes pré-termo alimentados com leite humano.

Apesar das lactantes produzirem leite com diferentes estruturas de oligossacarídeos, como resultado de diferenças genéticas, esta variante na composição, ao contrário dos tipos de grupos sanguíneos, não cria incompatibilidade para que todas as mães possam ser considerados doadores universais. Ao contrário, existe uma linha de pensamento que afirma que a variação na composição de oligossacarídeos entre as mães promove a sobrevivência humana, uma vez que os patógenos diferem em sua afinidade pela ligação a oligossacarídeos específicos (GRABARICS et al, 2017). A proteção por algumas estruturas de oligossacarídeos em leite humano foi demonstrada em relação à diarreia, causada por patógenos específicos, e HIV (ORLOFF; WALLINGFORD; MCDOUGAL, 1993).

Figura 4.11 – Distribuição de oligossacarídeos em leite humano cru e processado termicamente pelo método *Holder* e assistido por micro-ondas em diferentes condições de processo

Fonte: A autora (2017)

4.4.4.2 Imunoglobulinas e lactoferrina

Existem várias classes de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG, IgE e IgD), e a IgA, IgM e IgG são as principais encontradas em leite humano. Estas imunoglobulinas específicas se ligam diretamente a antígenos microbianos específicos, bloqueando a ligação e adesão de agentes patogênicos, aumentando a fagocitose e contribuindo para o desenvolvimento do sistema imunológico da criança. A IgA representa a fração predominante (> 90 %) entre as imunoglobulinas presentes em leite humano (SOUSA; DELGADILLO; SARAIVA, 2014).

Neste trabalho, os teores das imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) e da lactoferrina em leite humano cru e aquecido pelo método *Holder* e por micro-ondas, em diferentes condições de processo, estão apresentados na Tabela 4.11. Nota-se que para a IgA não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o leite humano cru ($0,82 \pm 0,22$) mg/mL e o aquecido por micro-ondas nas condições de 60 °C por 30 s ($0,68 \pm 0,06$) mg/mL, 65 °C por 30 s ($0,68 \pm 0,12$) mg/mL e 70 °C por 10 s ($0,64 \pm 0,09$) mg/mL; entretanto foi encontrada diferença significativa entre o leite humano cru e o pasteurizado pelo método *Holder* ($0,50 \pm 0,03$) mg/mL.

Tabela 4.11 – Teores de IgA, IgG, IgM e lactoferrina em leite humano (LH) cru e aquecido termicamente pelo método *Holder* e por micro-ondas nas condições de 60 °C por 30 s, 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s

	IgA (mg/mL)	IgG (mg/mL)	IgM (mg/mL)	Lactoferrina (mg/mL)
LH cru	0,82 ± 0,22 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	2,56 ± 0,56 ^a
<i>Holder</i>	0,50 ± 0,03 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,38 ± 0,03 ^b
Micro-ondas - 60 °C por 30 s	0,68 ± 0,06 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	2,23 ± 0,23 ^a
Micro-ondas - 65 °C por 15 s	0,68 ± 0,12 ^a	0,04 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,01 ^a	2,19 ± 0,10 ^a
Micro-ondas - 70 °C por 10 s	0,64 ± 0,09 ^a	0,03 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,00 ^c	0,62 ± 0,19 ^b
DMS	0,22	0,01	0,01	0,52

Os resultados são médias de triplicatas independentes ± desvio padrão. Médias na mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$); DMS = Diferença Mínima Significativa

Fonte: A autora (2017)

Resultados similares foram encontrados por muitos autores (ESPINOZA-MARTOS et al., 2013; GOLDSMITH et al., 1983; LIEBHABER et al., 1977; SHI et al., 2011; VIAZIS; FARKAS; ALLEN, 2007) que estudaram o efeito da pasteurização *Holder* sobre imunoglobulinas. Os autores encontraram reduções no teor da IgA que variaram entre (20 e 62) % após o processamento térmico. Nesse trabalho, em relação ao leite humano cru, a pasteurização *Holder* provocou uma redução média de 39 % no teor da imunoglobulina IgA e o processamento térmico assistido por micro-ondas, em diferentes condições de processo, uma redução média de 18 %.

O teor de IgM encontrado neste trabalho, para o leite humano cru ($0,10 \pm 0,01$) mg/mL, foi similar ao encontrado no estudo de Shi et al. (2011), 0,12 mg/mL, e inferior ao relatado por Sousa, Delgadillo e Saraiva (2014), 0,28 mg/mL. Foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa entre o teor de IgM do leite humano cru e o do processado termicamente pelo método *Holder* e assistido por micro-ondas na condição de 70 °C por 10 s. A IgM apresentou uma redução no seu teor de 70 % após a pasteurização *Holder* e de 50 % após aquecimento por micro-ondas a 70 °C por 10 s. A baixa resistência da IgM à pasteurização *Holder* também foi confirmada no leite humano na fase colostro pelos autores Koenig et al. (2005) e Espinosa-Martos et al. (2013).

Para a imunoglobulina IgG, a maioria dos outros estudos encontraram uma redução no teor, que variou de (23 a 100) %, após o leite humano ter sido processado pelo método *Holder* (EVANS et al., 1978; FORD et al., 1977; HEIMAN;

SCHALER, 2007; SOUSA; DELGADILLO; SARAIVA, 2014). Nesse trabalho, foi obtida uma redução de aproximadamente 40 % após a pasteurização *Holder* e de aproximadamente (20 e 40) % após o aquecimento por micro-ondas nas condições de 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o leite humano cru e o processado termicamente por micro-ondas a 60 °C por 30 s.

A concentração de lactoferrina em leite humano na fase colostro é de aproximadamente 7 mg/mL e essa quantidade diminui para (1 a 3) mg/mL na fase maduro. A lactoferrina exibe atividade antibacteriana devido à sua capacidade de sequestro de ferro, impedindo assim que este nutriente seja utilizado por agentes patogênicos (FARNAUD; EVANS, 2005). Além disso, a lactoferrina também está envolvida em outras funções biológicas, como a modulação do sistema imunológico e atividade antitumoral (WARD; PAZ; CONNEELY, 2005).

Alguns autores (CHRISTEN et al., 2013; DANIELS et al., 2017, MATA et al., 1998; PEILA et al., 2016) investigaram o efeito da pasteurização *Holder* sobre o teor de lactoferrina em leite humano e todos relataram redução no teor, com porcentagens que variaram de (35 a 90) %, após a pasteurização. Neste estudo também foi observada redução, que chegou a (85 e 76) % após a pasteurização *Holder* e aquecimento por micro-ondas a 70 °C por 10 s, respectivamente, porém a redução não foi significativa após aquecimento por micro-ondas nas condições de 60 °C por 30 s e 65 °C por 15 s.

O aquecimento por micro-ondas se mostrou uma alternativa eficaz para preservar as imunoglobulinas e lactoferrina presentes em leite humano, porque apesar da redução de alguns teores, essa foi menor se comparada a pasteurização *Holder* empregada nos BLHs.

5 CONCLUSÃO

A permissividade elétrica relativa (ϵ') de todos os tipos de leite e fórmulas infantis decresceu com o aumento da temperatura e da frequência do campo eletromagnético, pois as moléculas de água foram perdendo progressivamente a habilidade de alinhar-se ao campo elétrico com o aumento da frequência e agitação térmica. Além disso, a técnica do cabo coaxial de ponta aberta permitiu avaliar como as contribuições dos mecanismos de condução iônica e rotação dipolar influenciam as propriedades dielétricas dos tipos de leite e formulações infantis estudadas. Com o aumento da frequência a perda iônica decaiu devido a redução do movimento iônico e a perda por rotação dipolar aumentou, aproximando-se do pico de relaxação da água.

Para todos os tipos de leite e formulações infantis, na frequência de 915 MHz, a profundidade de penetração diminuiu com o aumento da temperatura enquanto que na frequência de 2450 MHz, o comportamento foi inverso. Além disso, foi obtida maior penetração das micro-ondas na frequência comercial de 915 MHz quando comparada a frequência de 2450 MHz.

Foi obtida boa correlação ($r^2 > 0,98$) para descrever a dependência das propriedades dielétricas sobre a temperatura e frequência de todos os tipos de leite e fórmulas infantis. As correlações são válidas para temperaturas entre (5 e 50) °C e frequências entre (2000 e 3000) MHz, e são úteis no desenho e avaliação de equipamentos de aquecimento por micro-ondas.

Com relação aos ensaios descontínuos conduzidos no reator de micro-ondas focalizadas, o sensor de fibra óptica permitiu a obtenção de perfis precisos de temperatura em função do tempo.

A inativação da enzima fosfatase alcalina (ALP), presente no leite de vaca e humano, foi avaliada quando submetida ao aquecimento térmico por micro-ondas e o modelo cinético de primeira ordem foi ajustado, com base no histórico de temperatura de cada ensaio, e considerado adequado para avaliar a eficiência do processamento térmico. Os parâmetros cinéticos determinados para a ALP foram: $z = 4,4$ °C e $D_{70\text{ °C}} = 1,1$ s para o leite humano e $z = 7,4$ °C e $D_{70\text{ °C}} = 44,3$ s para o leite de vaca tipo B.

O efeito dos tratamentos térmicos, *Holder* (62,5 °C por 30 min) e micro-ondas (60 °C por 30 s), sobre a letalidade microbiana revelou que os dois processos térmicos inativaram, em nível considerado como adequado pela ANVISA, os patógenos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* ssp. Além disso, esses processos térmicos não influenciaram significativamente o perfil de ácidos graxos em leite humano.

Em relação ao perfil de minerais, alguns micronutrientes foram influenciados significativamente pelos dois processamentos térmicos, porém a pasteurização convencional (*Holder*) causou menores perdas quando comparado ao processamento térmico assistido por micro-ondas a 60 °C por 30 s.

O teor de alguns oligossacarídeos sofreu variação estaticamente significativa após os dois processamentos térmicos, porém o tratamento térmico *Holder* e o assistido por micro-ondas a 60 °C por 30 s, causaram menores perdas desses carboidratos, do que os processamentos térmicos assistidos por micro-ondas a 65 °C por 15 s e 70 °C por 10 s. Para as imunoglobulinas e lactoferrina, foi observado que os tratamentos térmicos assistidos por micro-ondas, em todas as condições, preservaram melhor esses compostos bioativos do que a pasteurização *Holder*.

Em geral, os resultados deste estudo apontam que os dois tratamentos térmicos foram eficientes para a inativação da enzima ALP e micro-organismos patogênicos e que o processamento assistido por micro-ondas pode ser uma boa alternativa no processo de conservação de alimentos líquidos, podendo até substituir a pasteurização convencional utilizada nos BLHs.

5.1 Sugestão de trabalhos futuros

Como continuação desse trabalho, sugere-se a construção de um protótipo que permita o aquecimento por micro-ondas a 60 °C por 30 s, com resfriamento rápido, e que atenda as necessidades dos BLHs processando vários frascos de leite humano de uma só vez. Após a construção do protótipo, sugere-se a realização de uma avaliação *in vivo*, do estímulo e inibição do leite humano processado termicamente assistido por micro-ondas, na microbiota intestinal de recém-nascidos, para estudar a alteração dos grupos microbianos principais.

REFERÊNCIAS¹

A.O.A.C. **Official Methods of analysis**. 18th ed. Maryland, USA: 2005.

ABRAMS, S. A.; GRIFFIN, I.; DAVILA, P. M. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 442-446, 2002.

AGANGA, A. A.; AMARTEIFO, J. O.; NKILE, N. Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 5, p. 533-543, 2002.

AGGETT, P. J. et al. Symptomatic zinc deficiency in a breast-fed preterm infant. **Archives of Disease in Childhood**, v. 55, n. 7, p. 547-550, 1980.

AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S. Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers. **Nutrition**, v.16, n. 11-12, p. 1068-1073, 2000.

ALFAIFI, A. Y. et al. Microwave-assisted graft copolymerization of amino acid based monomers onto starch and their use as drug carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n.15, p. 440-452, 2014.

ALMEIDA, J. A. G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em Bancos de Leite**. 1986. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1986.

AMIR-MOHAMMAD et al. The effect of neutral oligosaccharides on fecal microbiota in premature infants fed exclusively with breast milk: A randomized clinical trial. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v. 5, n. 1, p. 27-34, 2016.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; REMLEY, D. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 525-535, 1999.

ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: APHA Press, 2001, p. 357-380.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: APHA Press, 2001, 676 p.

AWUAH, G. et al. Inactivation of *Escherichia coli* K-12 and *Listeria innocua* in milk using radio frequency (RF) heating. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 396–402, 2005.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

AZEREDO, L. M. **Composição de ácidos graxos do leite humano e aspectos dietéticos, antropométricos e bioquímicos de nutrízes adolescentes e adultas.** 2013. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG, 2013.

BAKER, M.; MILLIGAN, K. Maternal employment, breastfeeding, and health: Evidence from maternity leave mandates. **Journal of Health Economics**, v. 27, p. 871-887, 2008.

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

BATES, C. J; PRENTICE, A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 1-2, p. 193-220, 1994.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações – produção, industrialização e análise.** 15 ed. São Paulo, SP: Nobel, 1991,322 p.

BEN-SHOSHAN, M. et al. Eradication of cytomegavirus from human milk by microwave irradiation: A pilot study. **Breastfeeding Medicine**, v. 11, p. 186-187, 2016.

BENEMARIYA, H.; ROBBERECHT, H.; DEELSTRA, H. Copper, zinc and selenium concentrations in milk from middle class women in Burundi (Africa) throughout the first 10 months of lactation. **Science of The Total Environment**, v. 164, n. 2, p. 161-174, 1995.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism**, v.6, p. 1-13, 2009.

BERTINO, E. et al. Effects of holder pasteurization on human milk oligosaccharides. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 381-385, 2008.

BJÖRKSTÉN, B. The environmental influence on childhood asthma. **Allergy**, v. 54, p. 17-23, 1999.

BOGDAL, D.; PROCIAK, A. Fundamentals of microwaves. In:___**Microwave-enhanced polymer chemistry and technology.** Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007, p. 1-32.

BOURLIEU, C. et al. The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. **Food Chemistry**, v. 182, n. 182, p. 224-235, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos.** Brasília, DF: ANVISA, 2008 160 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 977 de 05 de dezembro de 1998. Aprova regulamento técnico referente às Fórmula Infantis para lactentes e às Fórmulas Infantis de segmento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 dez. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde da criança: nutrição infantil: Aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, 2009, 112 p.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

CALHOUN, D. A. et al. Granulocyte colony-stimulating factor is present in human milk and its receptor is present in human fetal intestine. **Pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 7, 2000.

CAMELO, J. S.; HECK, A. Alimentação do recém-nascido a termo: Apologia da amamentação. In: MONTEIRO, J. P.; CAMELO, J. S. **Caminhos da nutrição e terapia nutricional da concepção à adolescência**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2007, p. 109-131.

CAPPOZZO, J.; KOUTCHMA, T.; BARNES, G. Chemical characterization of milk after treatment with thermal (HTST and UHT) and nonthermal (turbulent flow ultraviolet) processing technologies. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-12, 2015.

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, 2009.

CEM. Discover. In: **Operation manual**. North Carolina: CEM corporation, 2005.

CHANG, M. K.; ABRAHAM, G.; JOHN, V. T. Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, p. 832-834, 1990.

CHRISTEN, L. et al. The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. E85867, 2013.

CLAEYS, W. L. et al. Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of b-lactoglobulin in raw milk under

isothermal and dynamic temperature conditions. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 1, p. 95-107, 2001.

CLARE, D. A. et al. Comparison of sensory, microbiological and biochemical parameters of microwave versus indirect UHT fluid skin milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4172-4182, 2005.

CONTADOR, R. et al. Effect of thermal pasteurization or high-pressure processing on immunoglobulin and leucocyte contents of human milk. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2013.

CORONEL, P.; SIMUNOVIC, J.; SANDEEP. K. P. Temperature profiles within milk after heating in a continuous-flow tubular microwave system operating at 915 MHz. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 6, p. 1976-1981, 2003.

DANIELS, B. et al. The effect of simulated flash-heat pasteurization on immune components of human milk. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 178 p., 2017.

D'AURIA, E. et al. Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk. **Acta Paediatric**, v. 94, n. 12, p. 1708-1713, 2005.

DATTA, A. K.; SUMNU, G.; RAGHAVAN, G. S. V. Dielectric properties of food. In: RAO, M. A.; RIZVI, S.S.H.; DATTA, A. K. (Ed). **Engineering properties of foods**. 3rd. Boca Ratón, FL: CRC Press, 2005, cap. 11, p. 101-147.

DEAN, J. Microwave extraction. In: PAWLISZYN, J. (Ed.). **Comprehensive sampling and sample preparation: Analytical techniques for scientists**. London, UK: Elsevier, 2012, p. 135-149.

DOREA, J. G. Iron and coppes in human milk. **Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 209-220, 2000.

DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Vitamin e deficiency in developing countries. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 32, p. 124-143, 2011.

EMBA. European Milk Bank Association. Disponível em: <<http://europeanmilkbanking.com/map/>>. Acesso em: 08 Dez. 2017.

EMMETT, P. M.; ROGERS, I. S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. **Early Human Development**, v. 49, p. s7-s28, 1997.

ESPINOZA-MARTOS, I. et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurization. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 560-568, 2013.

EVANS, T. J. et al. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. **Archives of Disease in Childhood**, v. 53, p. 239-241, 1978.

EWASCHUK, J. B. et al. Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. **Applied Physiology, Nutrition, and**

Metabolism, v. 36, p. 175-182, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma, Italy: FAO, 2013.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin: the conductor of the immunological system?. In: VESKLER, B. A. (Ed.). **New research on immunology**. New York, NY: Nova Science Publishers, 2005, p. 47-76.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk. **American Dairy Science Association**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FELLOWS, P. J. **Food processing technology: Principles and practice**. 4. ed. India: Woodhead Publishing, 2017. 1109 p.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Tradução: Florência Cladera Oliveira. 2. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2006, 602 p.

FERREIRA, S. L. Bancos de leite humano: duas décadas de políticas públicas no Brasil. **Gota de Leite**, v. 1, 2005.

FORD, J. E. et al. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **Journal Pediatrics**, v. 90, p. 29-35, 1977.

FRANCO, A. P. et al. Dielectric properties of green coconut water relevant to microwave processing: Effect of temperature and field frequency. **Journal of Food Engineering**, v. 15, p. 69-78, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, p. 93-98.

FUNK, M. A. et al. Milk Selenium of rural African women: Influence of maternal nutrition, parity, and length of lactation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 220-224, 1990.

GARG, M.; THIRUPURAM, S. SAHA, K. Colostrum composition, maternal diet and nutrition in north India. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 34, p. 79-87, 1988.

GIRIBALDI, M. et al. Pasteurization of human milk by benchtop High-Temperature Short-Time device. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 228-233, 2016.

GIULIANI, F. et al. Human milk oligosaccharides: Effects of holder pasteurization. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 84, p. S105, 2008.

GODFREY, J. R.; LAWRENCE, R. A. Toward optimal health: The maternal benefits of breastfeeding. **Journal of Women's Health**, v. 19, p. 1597-1602, 2010.

GOELZ, R. et al. Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. **Pediatric Research**, v. 65, p. 458-461, 2009.

GÓES, H. C. et al. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 580-594, 2002.

GOLDSMITH, S. J. et al. IgA, IgG, IgM and lactoferrin contents of human milk during early lactation and the effect of processing and storage. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 4-7, 1983.

GOMES, A. T. **Telecomunicações: transmissão e recepção**. 21º ed. São Paulo, SP: Editora Érica, 2002, 432 p.

GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. S69-S74, 2000.

GRABARICS, M. et al. Analytical characterization of human milk oligosaccharides – potential applications in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 146, p. 168-178, 2017.

GUAN, W. et al. Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8289-8293, 2011.

GUT, J. A. W.; TADINI, C. C. Processamento térmico de alimentos. In: TADINI, C. C. et al. **Operações unitárias na indústria de alimentos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

HALL, W. G. Weaning and growth of artificially reared rats. **Science**, v. 190, p. 1313-1315, 1975.

HARZER, G. et al. Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. **The American Journal of the Clinical Nutrition**, v. 37, p. 612-621, 1983.

HAUG, R. T. **The practical handbook of compost engineering**. Boca Raton: CRC press, 1993, 757 p.

HECK, A. R. Banco de Leite Humano. In: MONTEIRO, J. P.; CARNELO, Jr., J. S. **Nutrição e metabolismo** – Caminhos da nutrição e terapia nutricional da concepção à adolescência. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2007, 155 p.

HEDDLESON, N. R. A.; DOORES, S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 11, p.1025-1037, 1994.

HEIMAN, H.; SCHANLER, R. J. Enteral nutrition for premature infants: The role of human milk. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 26-34, 2007.

HERNELL, O. Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. In: CLEMENS, R. A.; HERNELL, O.; MICHAELSEN, K.F. **Milk and milk products in human nutrition**. Marrakech: Karger, 2011, p. 17-28.

HMBANA. Human Milk Banking Association of North America. **Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank**. Raleigh, NC: 2013.

HOU, L.; JOHNSON, J. A.; WANG, S. Radio frequency heating for postharvest control of pests in agricultural products: A review. **Postharvest Biology Technology**, v.113, p. 106–118, 2016.

HUEBNER, R. J.; JELLISON, W. L.; BECK, M. D.; WILCOX, F. P. Q fever studies in southern California: III. Effects of pasteurization on survival of *C. burnetti* in naturally infected milk. **Public Health Reports**, v.64, p. 499-511, 1949.

IGUAL, M. et al. Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. **Food Chemistry**, v. 118, p. 291-299, 2010.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, SP: Instituto Adolf Lutz, 2008, 1020 p.

ISO 14146/IDF 172. International Organization for Standardization. **Milk and milk products – Extraction methods for lipids and liposoluble compounds**. Switzerland: ISO, 2001, p. 1-5.

ISO 15884. International Organization for Standardization. **Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters**. Switzerland: ISO, 2002.

ISO 15885/IDF184. International Organization for Standardization. **Milk fat – Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography**. Switzerland: ISO, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6º ed. Porto Alegre, Brazil: Artmed, 2005, 771 p.

JENSEN, R. G. et al. Effect of dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids on the fatty acid composition of human milk in North America. **Journal of Pediatric**, v. 120, p. S87-S92, 1992.

JENSEN, R. G. et al. Lipids of bovine and human milks: A comparison. **Dairy Science**, v. 73, p. 223-240, 1990.

JENSEN, R. G.; HAGERTY, M. M.; MCMAHON, K. E. Lipids of human milk and infant formulas: a review, The American **Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, p. 990-1016, 1978.

JIANG, H. et al. Effect of different dielectric drying methods on the physic-chemical properties of a starch–water model system. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 192–200, 2016.

KALLIOMAKI, M. et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 357, p. 1076-1079, 2001.

KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 6250-6284, 2004.

KIRMACI, B.; SINGH, R. K. Quality of chicken breast meat cooked in a pilot-scale radio frequency oven. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.14, p.77–84, 2012.

KOENIG, A. et al. Immunologic factors in human milk: The effects of gestational age and pasteurization. **Journal of Lactation**, v. 21, p. 439-443, 2005.

KOLETZKO, B.; THIEL, I.; ABIODUN, P. O. The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. **The Journal of Pediatrics**, v. 120, p. S62-S70, 1992.

KOOPMAN, J. S. et al. Milk fat and gastrointestinal illness. **American Journal of Public Health**, v. 74, p. 1371-1373, 1984.

KORNACHI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC:APHA Press, 2001, p.69-82.

KOWALSKA, H.; LENART, A.; LESZCZYK, D. The effect of blanching and freezing on osmotic dehydration of pumpkin. **Journal of Food Engineering**, v. 86 p. 30–38, 2008.

KRISHNASWAMY, K. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*vitis vinífera*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 441-455, 2013.

KUMAR, P. et al. Overcoming issues associated with scale-up of a continuous flow microwave system for aseptic processing of vegetables purees. **Food Research International**, v. 41, p. 454-461, 2008.

KUNZ, C. et al. Influence of gestational age, secretor and Lewis blood group status on the oligosaccharides content of human milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 789-798, 2017.

LANCETTE, G. A.; BENETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and *staphylococcal enterotoxins*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K.(Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: APHA Press, 2001, p. 387-400.

LEITE, C. C. et al. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n, 1, p. 21-25, 2002.

LEUNG, K. C.; SAUVE, R. S. Whole cow's milk in infancy. **Paediatric Child Health**, v. 8, p. 419-421, 2003.

LEVIEUX, D.; GENEIX, N.; LEVIEUX, A. Inactivation denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. **Journal Dairy Research**. p. 296-301, 2007.

LEWIS, M. HEPPELL, N. **Continuous thermal processing of foods: Pasteurization and UHT sterilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000, 447 p.

LI, C. et al. Subclinical mastitis (SCM) and proinflammatory cytokines are associated with mineral and trace element concentrations in human breast milk. **Journal of trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, p. 55-61, 2017.

LIEBHABER, M. et al. Alterations of lymphocytes and antibody content of human milk after processing. **The Journal of Pediatrics**, v. 91, p. 897-900, 1977.

LIN, M.; RAMASWAMY, H. S. Evaluation of phosphatase inactivation kinetics in milk under continuous flow microwave and conventional heating conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 110-123, 2011.

LLAVE, Y. et al. Dielectric properties of frozen tuna and analysis of defrosting using a radio-frequency system at low frequencies. **Journal of Food Engineering**, v. 139, p. 1-9, 2014.

LOBATO, V. Tecnologia de fabricação de derivados do leite na propriedade rural. **Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras**. Lavras, MG: 2000, 36 p.

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

LÖNNERDAL, B.; FORSUM, E.; HAMBRAEUS, L. A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, p. 1127-1133, 1976.

LOPES-FANDINO, R. et al. Assessment of the thermal treatment of milk during continuous microwave and convectional heating. **Journal of Food Protection**, v. 59, n.8, p. 889-892, 1996.

LOPES, R. P. et al. Pasteurization: Effect on sensory quality and nutrient composition. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 246-263, 2016.

LOVE, W. Magnetrons. In: KORYU ISHII, T. (Ed.). **Handbook of microwave technology**. San Diego, CA: Academic Press, 1995, p. 33-35.

LYNCH, J. M. et al. Flavor and stability of pasteurized milk with elevated levels of conjugated linoleic acid and vaccenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 489-498, 2005.

MAI, I. **Utilizando um forno de micro-ondas e um disco rígido de computador como laboratório de física**. 2008. 143 p. Dissertação (Mestre Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

MATA et al. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3964-3970, 1998.

MARTIN-SOSA, S. et al. Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 52-59, 2003.

MEGRAUD, F. G. et al. Incidence of bacterial infection in infant in Western Algeria and the possible protective role of breast-feeding. **Journal Epidemiology and Infection**. v. 105, p. 73-78, 1990.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C. et al. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 116-123, 2011.

MORTON, D.R. Aerobic plate count. In:Downes, F.P.; ITO, K.(Eds.)**Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: American Public Health Association, 2001, p.63-67.

MUDD, A. T. et al. Dietary prebiotics, milk fat globule membrane, and lactoferrin affects structural neurodevelopment in the Young piglet. **Frontiers Pediatrics**, v. 4, p. 1-10, 2016.

MUDGETT, R. E. Dielectric properties of food. In: DECAREAU, R. V. **Microwave in the food processing industry**. Orlando, FL: Academic Press, 1985. Cap. 2, p.2-37.

MURTHY, G. K. et al. Chapter 14: Alkaline phosphatase methods. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington, DC: American Public Health Association, 1992.

NAGLER, C. Man the barrier! Strategic defenses in the intestinal mucosa. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 59-67, 2001.

NASCIMENTO, I. R. et al. Determination of the mineral composition of fresh bovine milk from the milk-producing areas located in the state of Sergipe in Brazil and evaluation employing exploratory analysis. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 37-41, 2010.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clinic hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. S163-S172, 2004.

NEESER, J. R. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2860-2871, 1991.

NELSON, S. O.; BARTLEY, P. G. Frequency and temperature dependent dielectric properties of food materials. **Transactions of the ASAE**, v.43, n.6, p.1733-1736, 2000.

NELSON, S. O.; DATTA, A. K. Dielectric properties of food materials and electrical fields interactions. In: DATTA, A. K.; ANANTHESWARAN, R.C. **Handbook of microwave technology for food applications**. New York, NY: Marcel Decker, 2001, cap. 3, p. 69-114.

NINONUEVO, M. R. et al. Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 15-23, 2007.

NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal of Hygiene**. v.87, p. 147-173, 1927.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para detecção de coliforms em leite humano ordenhado. **Journal de Pediatria**, v. 78, p. 193-196, 2002.

ORLOFF, J. J.; WALLINGFORD, J. C.; MCDUGAL, J. S. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: Effects of intrinsic factors in human milk pasteurization. **Journal of Human Lactation**, v. 9, p. 13-17, 1993.

ORSAT, G. S. V.; RAGHAVAN, K.; KRISHNASWAMY, K. Microwave technology for food processing: An overview of current and future applications. In: **The microwave processing of foods**. 2nd ed. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2017, p. 100-116.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. Overview of milks of minor species. In: _____. **Handbook of milk of non-bovine mammals**. Iowa: Blackwell Publishers, 2006, p. 3-10.

PATEL, G. C.; VYRAS, S. H.; UPADHYAY, K. G. Evaluation of mozzarella cheese made from buffalo milk using direct acidification technique. **International Journal of Dairy Science**, v. 39, p. 394-403, 1986.

PEILA, C. 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. 1-19, 2016.

PESTANA, J. M. et al. Effects of pasteurization and Ultra-High Temperature process on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. **American Journal of Food Technology**, v. 10, p. 265-272, 2015.

PICAUD, J. C.; BUFFIN, R. Human milk – Treatment and quality of banked human milk. **Clinics in Perinatology**, v. 44, p. 95-119, 2017.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, p. 53-67, 2001.

PONS, S. M. et al. Triacylglycerol composition in colostrum, transitional and mature human milk. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 878-882, 2000.

PONTES, M. R.; IVASAKI, Y., OLIVEIRA, Y. S. Avaliação das condições sanitárias do leite humano pasteurizado distribuído pelo banco de leite de um hospital público do Distrito Federal. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 43-49, 2003.

PRASAD, H.; SENGAR, O.P.S. Milk yield and composition of the Barbari goat breed and its cross with Jamunapari, Beetal and Black Bengal. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 79-83, 2002.

QUIGLEY, M.; MCGUIRE, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, p. 1-92, 2014.

RAIMONDO, R. F. S. **Características físico-químicas e celulares do leite de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo durante o primeiro mês de lactação: determinação dos valores de referência e das variações durante a fase colostrar**. 2006. 211 p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

RAO, M. A; RIZVI, S. S. H.; DATTA, A. K. Engineering properties of foods. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005, 768 p.

rBLH-BR. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Disponível em: https://producao.redeblh.iciet.fiocruz.br/portal_blh/blh_brasil.php. Acesso em: 08 Dez. 2017.

RODRIGUES, J. S. M.; FERREIRA, N. M. L. A. Caracterização do perfil epidemiológico do câncer em uma cidade do interior Paulista: Conhecer para intervir. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.4, p. 431-441, 2010.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; HARTE, F.; FONTECHA, J. Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high Pressure homogenization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, n.1, p. 32-36, 2009

RYYNÄNEN, S. The electromagnetic properties of food materials: a review of the basic principles. **Journal of Food Engineering**, v.26, p. 409-429, 1995.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. et al. Recent studies related to microwave processing of fluid foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p. 31-46, 2012.

SALVI, D. et al. COMSOL Multiphysics model for continuous flow microwave heating of liquids. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 3, p. 422-429, 2011.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 78 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, 2007.

- SCAMAN, C. H. et al. Combined microwave vacuum drying. In: SUN, D. W. **Emerging Technologies for food processing**. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2014, p. 427-445.
- SCHWARTZ, E. B. et al. Duration of Lactation and Risk Factors for Maternal Cardiovascular Disease. **Obstetrics Gynecology**, v. 113, p. 974-982, 2009.
- SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2563S-2567S, 2007.
- SERAFINI, A. B. et al. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em Bancos de Leite. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 775-779, 2003.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.
- SHAHEEN, M. S. et al. Microwave applications in thermal food processing. In: CAO, W. (Ed.). **The development and application of microwave heating**. United Kingdom: Intech, 2012, cap. 1, p. 1-16.
- SHI, Y. et al. The chemical composition of human milk from inner Mongolia of China. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1193-1198, 2011.
- SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C.; OLANO, A. The effects of continuous flow microwave treatment and conventional heating on the nutritional value of milk as shown by influence on vitamin B1 retention. **European Food Research Technology**, v. 209, p. 352-354, 1999.
- SIGUEMOTO, E. S. et al. Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in apple juice by microwave and conventional thermal processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 84-91, 2017.
- SIGUEMOTO, E. S.; GUT J. A. W. Dielectric properties of cloudy apple juices relevant to microwave pasteurization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 1345-1357, 2016.
- SILVA, R. C. et al. Interesterification of lard and soybean oil blends catalyzed by immobilized lipase in a continuous packed bed reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1925-1933, 2011.
- SILVA, R. C.; GIOELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano, **Química Nova**, v.32, p. 1253-1261, 2009.
- SMILOWITZ, J. T. et al. Breast milk oligosaccharides: Structure-function relationships in the neonate. **Biochemistry and Molecular Medicine, Food Science and Technology**, v. 34, p. 143-169, 2014.

SMIT, E. N. et al. Estimated biological variation of the mature human milk fatty acid composition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, p. 549-555, 2002.

SOSA-MORALES, M. E. et al. Dielectric properties of foods: reported data in the 21st century and their potential applications. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 1169-1179, 2010.

SOUSA, S. G.; DELGADILLO, L.; SARAIVA, J. A. Effect of thermal pasteurization and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. **Food Chemistry**, v. 151, p. 79-85, 2014.

STABEL, J. R. Effective methods for postharvest intervention in dairy processing. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 10-15, 2003.

STUEBE, A. M. et al. Duration of lactation and incidence of type 2 diabetes. **JAMA**, v. 294, p. 2601-2610, 2005.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing**. San Diego. American Press, 1973. 336 p.

SU, M. Y. et al. Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1895-1903, 2017.

SUNARIC, S. et al. Comparative analysis of the physicochemical parameters of breast milk, starter infant formulas and commercial cow milks in Siberia. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, v. 33, p. 101-108, 2016.

TANG, J.; HAO, F.; LAU, M. Microwave heating in food processing. In: YANG, X.; TANG, J. **Advances in bioprocessing engineering**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2002. Cap.1, p.1-44.

TAO, N. et al. Bovine milk glycome. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3768-3778, 2008.

TAO, N. et al. Structural determination and daily variations of porcine milk oligosaccharides. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 4653-4659, 2010.

TEWARY, G. **Microwave and radio-frequency heating**. In: TEWARY, G.; JUNEGA, V. **Advances in thermal and non-thermal food preservation**. Iowa: Blackwell Publishing. 2007. Cap. 5, p. 91-98.

THURL, S. et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1261-1271, 2010.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. 2.ed. New York. Chapman & Hall, 1999. 579p.

URUAKPA, F. O.; ISMOND, M. A. H.; AKOBUNDU, E. N. T. Colostrum and its benefits: A review. **Nutrition Research**, v. 22, p. 755-767, 2002.

VALDÉZ, V.; SANCHES, A. P.; LABBOK, M. Manejo clínico da lactação - assistência a nutriz e ao lactente. **Revinter**, v. 1, p. 1-128, 1996.

VALERO, E. et al. Chemical and sensorial changes in milk pasteurized by microwave and conventional systems during cold storage. **Food Chemistry**, v. 70, p. 77-81, 2000.

VAN LOEY, A. et al. Inactivation of enzymes from experimental design to kinetic modeling. In: WHITALKER, J. L.; VORAGEN, A. G. J.; WANG, D. W.S. **Handbook of Food Enzymology**. Boca Raton, FL: CRC press, p. 49- 58, 2003.

VAN LOOCK, W. Electromagnetic fields, safety and health. In: **CEEM' 2006: Asia-Pacific conference on environmental electromagnetics**. Dalian, China: Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 2006, v. 2, 916 p.

VENKATESCH, M. S.; RAGHAVAN, G. S. An overview of dielectric properties measuring techniques. **Biosystems Engineering**, v.47, p. 15-30, 2005.

VIAZIS, S.; FARKAS, B. E.; ALLEN, J. C. Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. **Journal of Human Lactation**, v. 23, p. 253-261, 2007.

WANG, S. et al. Dielectric properties of egg whites and whole eggs as influenced by thermal treatments. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1204-1212, 2009.

WANG, S. et al. Dielectric properties of fruits and insect pests as related to radio frequency and microwave treatments. **Biosystems Engineering**, v. 85, n.2, p. 4597-4605, 2003.

WANG, S. et al. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 693-700, 2007.

WARD, P. P.; PAZ, E.; CONNEELY, O. M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. **Cellular Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2540-2548, 2005.

WARNER; E. A.; KANEKANIAN, A. D.; ANDREWS, A. T. Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 151-153, 2001.

WHO. World Health Organization. 2015. Food safety: What you should know. Disponível em: <http://www.searo.who.int/entity/world_health_day/2015/whd-what-you-should-know/en/>. Acesso em: 23 Mar. 2017.

WILINSKA, A. et al. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk buffer. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 579-586, 2007.

WRAY, D.; RAMASWAMY, H. S. Microwave-osmotic/microwave-vacuum drying of whole cranberries: comparison with other methods. **Food Science**, v. 80, p. E2792-E2802, 2015.

XIN, Y. et al. Research trends in selected blanching pretreatments and quick freezing technologies as applied in fruits and vegetables: A review. **International Journal of Refrigeration**, v. 57, p.11–25, 2015.

YAM, K. L.; LAI, C.C. Microwavable frozen food or meals. In: HUI, Y. H. (Ed.) **Handbook of food science, technology and engineering**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006, p. 133.1-133.7.

YANG, T. et al. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. **Food Chemistry**, v. 80, p. 473-481, 2003.

YASAR, S. B.; BARAN, E. K.; TOKAY, F. Element fraction analysis for milk in its real matrix by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrometry Letters**, v. 46, p. 100-108, 2013.

YOLACANER, E. T.; SUMNU, G.; SAHIM, S. Microwave-assisted baking. In: REGIER, M.; KNOERZER, K.; SCHUBERT, H. **The Microwave Processing of Foods** (2 Ed.). United Kingdom: Woodhead Publishing, 2017, p. 117-141.

YUHAS, R.; PRAMUK, K.; LIEN, E. L. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. **Lipids**, v. 41, p. 851-858, 2006.

ZHANG, H. Electrical properties of foods. In: BARBOSA-CANOVAS, G. (Ed.). **Food Engineering at Encyclopedia of Life Support Systems**. Paris: EOLSS/UNESCO, 2005.

ZHANG, M.; JIANG, H.; LIM, R. Recent developments in microwave-assisted drying of vegetables, fruits, and aquatic products-drying kinetics and quality considerations. **Drying Technology**, v. 28, p. 1307–1316, 2010.

ZHU, X. et al. Dielectric properties of chestnut flour relevant to drying with radio-frequency and microwave energy. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.143–150, 2012.

ZHU, X.; GUO, W.; JIA, Y. Temperature-Dependent Dielectric Properties of Raw Cow's and Goat's Milk from 10 to 4,500 MHz Relevant to Radio-frequency and Microwave Pasteurization Process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 6, p. 1830-1839, 2014.

ZIEGLER, E. E. et al. Cow milk feeding in infancy: Further observations on blood loss from the gastrointestinal tract. **The Journal of Pediatrics**, v. 116, p. 11-18, 1990.

ZIVKOVIC, A. M.; BARILE, D. Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 284-289, 2011.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Universidade de São Paulo
Escola Politécnica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:			
Documento de Identidade nº:			
Data de Nascimento: ____ / ____ / ____			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:		

Título do Projeto de Pesquisa: **“Estudo da pasteurização do leite humano por energia de micro-ondas e seu impacto sobre as funcionalidades do leite”**

2. Duração da Pesquisa: 2 anos

3. Nome do pesquisador responsável: Profa Tit. Carmen Cecília Tadini

Cargo/ Função: Docente	Nº do Registro do Conselho Regional: 04337601 – 4ª região
------------------------	--

Instituições: Escola Politécnica/USP

Você está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa “Estudo da pasteurização do leite humano por energia de micro-ondas e seu impacto sobre as funcionalidades do leite” de responsabilidade da Professora Titular Carmen Cecília Tadini referente ao projeto de Doutorado da aluna Juliana Aparecida dos Santos Leite inserido no programa de pós graduação do Departamento de Engenharia Química da USP.

4. Descrição do projeto de pesquisa

O leite humano é sem dúvida o melhor alimento para o recém-nascido, pois além de ser fonte de nutrientes exerce importante papel na proteção contra doenças transmissíveis. A pasteurização realizada nos bancos de leite é para destruir os micro-organismos causadores de doenças e pode proporcionar melhorias na qualidade do produto final e rapidez no processamento, quando utilizada a energia de micro-ondas como fonte de aquecimento. O objetivo deste projeto será analisar a composição de macronutrientes (gorduras e proteínas), micronutrientes minerais (cálcio, potássio, sódio, zinco, magnésio e fósforo), aspectos físico-químicos (pH, densidade e acidez), propriedades dielétricas (estudar o comportamento do leite quando submetido as micro-ondas e analisar o grau de absorção desse campo no leite) e análise microbiológica (micro-organismos) do leite humano coletado em Banco de Leite, antes e após a pasteurização com aquecimento por micro-ondas. Serão realizados testes para avaliar a melhor temperatura e o melhor tempo para uma pasteurização eficiente do leite humano.

Serão incluídas para compor o grupo de amostra mães de bebês com mais de 15 dias e que estejam cadastradas no Banco de Leite do Hospital Universitário da USP, por isso você esta sendo convidada para participar dessa pesquisa como voluntária, porém sua participação não é obrigatória.

Sua participação é livre e você poderá doar o seu leite quantas vezes quiser e a

Rubrica Pesquisador

Rubrica Participante

quantidade que desejar. Para cada nova doação, você receberá um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O risco de sua participação neste estudo é mínimo, pois as amostras de leite humano que serão utilizadas no projeto já foram ordenhadas e após os experimentos essas amostras serão desprezadas. Na hora da coleta das amostras há possibilidade de um risco de constrangimento e para diminuir esse risco a coleta será feita individualmente e por um profissional da área da saúde que possua habilidade com a ordenha.

Você tem livre acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos e riscos relacionados à pesquisa e pode contar com o pesquisador para esclarecer eventuais dúvidas. Você tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Todos os dados pessoais e material coletado serão confidenciais e de uso exclusivo para a pesquisa em questão; somente o voluntário e os pesquisadores poderão ter acesso a estes dados

As doadoras de leite materno não receberão auxílio financeiro.

5. Contato em caso de dúvidas:

Pesquisador Responsável: Profa Tit. Carmen Cecília Tadini

Endereço: Rua do Lago, 250 – Edifício Semi-industrial (Engenharia Química), 2º andar – CEP 05424-970 São Paulo - SP

Telefone: (cel); e-mail: catadini@usp.br;

Pesquisadores colaboradores: Juliana Leite tel. ; e-mail: juleite@usp.br

6. Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Carmen Cecília Tadini
Laboratório de Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – São Paulo – CEP 05508-000. Fone: 3091-9457, fone-fax: 3091-9479 – e-mail: cep@hu.usp.br

Rubrica Pesquisador

Rubrica Participante