

Ana Claudia Berenhauer

**POTENCIAL DE TECNOLOGIAS EMERGENTES PARA A
CONSERVAÇÃO E AUMENTO DO VALOR NUTRICIONAL DE
LEITE HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, área de concentração Ciência dos Alimentos, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^{ra}. Dr^a Jane Mara Block.

Florianópolis/SC
2017

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

Berenhauser, Ana Claudia
POTENCIAL DE TECNOLOGIAS EMERGENTES PARA A
CONSERVAÇÃO E AUMENTO DO VALOR NUTRICIONAL DE LEITE
HUMANO / Ana Claudia Berenhauser ; orientadora,
Jane Mara Block , 2017.
115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Leite humano. 3.
CO2 supercrítico. 4. pasteurização. 5.
crioconcentração. I. , Jane Mara Block. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Folha aprovacao

Dedico este trabalho aos meus
filhos,
Bárbara, Raphael e Júlia,
meu esposo, Marcus,
e aos meus pais, Gabriel e Carmen.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus filhos, Bárbara, Raphael e Júlia, razão maior da minha existência. Por me permitirem experimentar o amor incondicional e pela oportunidade de lhes presentear com o alimento mais precioso e perfeito que possa existir: o leite materno.

Ao meu esposo, Marcus, pelo apoio, carinho e compreensão, em todos os momentos da minha trajetória.

Aos meus pais, por me ensinarem a viver a vida com dignidade, amor e dedicação.

À professora Dra. Jane Mara Block pela oportunidade concedida e pela orientação.

Ao professor Dr. José Vladimir de Oliveira, por acreditar na aplicação do tratamento com CO₂ supercrítico no leite humano e pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Juliano de Dea Lindner, pela orientação quanto aos procedimentos microbiológicos.

À Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pelas orientações quanto ao processo de concentração do leite humano, pelo apoio, incentivo e carinho em todas as horas.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade concedida e pelo apoio.

Às colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, por estarem apoio e carinho.

Aos colegas do Latesc, especialmente Douglas Soares, pela disponibilidade e auxílio nos processamentos com dióxido de carbono.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, especialmente Norton Komora, que pacientemente ensinou a parte prática das análises microbiológicas.

Às colegas do Laboratório de Leite e Derivados, especialmente Maria Helena, Isabela e Silvani, tão importantes em todas as etapas relacionadas à crioc concentração do leite humano.

Às minhas amigas da CIAM, especialmente Orcélia, pelo apoio durante a etapa de coleta de leite.

Às nutrizes que participaram do estudo, por entenderem a importância de estudar as características do leite humano e por sua disponibilidade em doar as amostras de leite.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a

realização deste trabalho e não estão aqui mencionados, muito obrigada!

“A mama prepara em silêncio e lentamente
O leite que o bebê vai precisar para crescer
Como um segredo guardado dentro da gente
Que um dia todo mundo vai conhecer”
(Luis Alberto Mussa Tavares, pediatra)

RESUMO

O leite humano proveniente de bancos de leite necessita ser seguro do ponto de vista nutricional, imunológico e microbiológico, garantindo assim o crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos pré-termo e de baixo peso. O estudo de tecnologias alternativas à pasteurização, que é o tratamento térmico atualmente utilizado nos bancos de leite, é importante para minimizar as degradações ocorridas com processos térmicos. Tecnologias alternativas que possam agregar valor nutricional ao leite humano também são de interesse. Na primeira etapa do presente estudo foi investigada a inativação microbiana de mesófilos aeróbios naturalmente presentes e, *Escherichia coli* ATCC 25922 inoculada artificialmente ao leite humano através da aplicação do CO₂ supercrítico. Foram estudados o efeito da razão entre a massa de amostra (leite humano cru) e CO₂ (1:0,2; 1:0,6 e 1:1 m/m); taxa de despressurização (1; 5,5 e 10 MPa/min), e ciclos de pressão (1, 3 e 5). As melhores reduções em mesófilos aeróbicos e *E. coli* ATCC 25922 (6,0 e 5,7 log, respectivamente) foram obtidas com uma razão de 1:1, taxa de despressurização de 10 MPa/min, e 1 ciclo de pressurização/despressurização. Os resultados obtidos na primeira etapa do estudo sugerem que o processamento com CO₂ supercrítico poderia ser aplicado ao leite humano como uma alternativa segura ao processo de pasteurização. Na segunda etapa do estudo o leite humano foi concentrado por meio da técnica de crioc Concentração em bloco. Foram avaliados os efeitos crioc Concentração sobre as propriedades físico-químicas, eficiência do processo, parâmetros de cor, densidade e viscosidade dinâmica do leite humano. A tecnologia de crioc Concentração foi utilizada para concentrar com sucesso o leite humano a um fator igual a 180,48% e 72% de retenção de sólidos totais no segundo estágio de crioc Concentração. Os valores observados nos concentrados para as propriedades bioquímicas demonstraram que a segunda fração concentrada (C2) apresentou valores de carboidratos (17,35 g/100g), proteínas (3,34 g/100g) e energia (85,91 Kcal/100g) elevados. O valor calórico elevado observado na primeira fração de gelo (I1) relacionou-se à retenção de lipídios (4,6 g/100g) na mesma. Se adicionados ao leite humano, o C2 e I1 poderiam atender aos requisitos especiais de nutrientes e energia para garantir o crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos pré termo.

Palavras-chave: Leite humano, CO₂ supercrítico, pasteurização, inativação de microrganismos, crioconcentração, fortificante de leite humano, recém-nascido pré- termo.

ABSTRACT

Human milk from milk banks should be nutritionally, immunologically and microbiologically safe, ensuring the growth and development of preterm and low weight newborns. The study of alternative technologies to pasteurization, which is the heat treatment currently used in milk banks, is important to minimize the degradations that occur with thermal processes. Alternative technologies that may add nutritional value to human milk are also of interest. In the first step of this study the microbial inactivation of naturally occurring aerobic mesophilic and *Escherichia coli* ATCC 25922 artificially inoculated to human milk through the application of supercritical CO₂ has been investigated. The effect of the ratio between sample mass (raw human milk) and CO₂ (1: 0.2, 1: 0.6 and 1:1 m/m); depressurization rate (1, 5.5 and 10 MPa/min), and pressure cycling (1, 3 and 5) was studied. The best reductions in aerobic mesophilic and *E. coli* ATCC 25922 (6.0 and 5.7 log, respectively) were obtained with a ratio of 1:1, depressurization rate of 10 MPa/min, and 1 pressurization/depressurization cycle. The results obtained suggest that the processing with supercritical CO₂ could be applied to human milk as a safe alternative to the pasteurization. In the second stage of the study, the human milk was concentrated using the block freeze cryoconcentration technique. The effects of cryoconcentration on the physico-chemical properties, process efficiency, color parameters, density and dynamic viscosity of human milk were evaluated. The human milk was successfully concentrated at a factor equal to 180.48% and 72% of total solids retention in the second stage of cryoconcentration. The values observed in the concentrates for the biochemical properties showed that the fraction of concentrated fluid human milk of the second stage (C2) presented elevated amounts of carbohydrates, protein and energy. The elevated caloric value observed in the ice fraction of the first stage (I1) refers to the retention of lipids in it. When added to human milk, C2 and I1 may satisfy the special requisites of nutrients and energy to guarantee the growth and development of preterm neonates.

Key words: Human milk, supercritical CO₂, pasteurization, inactivation of microorganisms, cryoconcentration, human milk fortifier, preterm newborn

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados.. 36

Figura 1. 2. (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO₂ puro a 35 °C. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \geq T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c ... 48

Figure 2. 1. Experimental apparatus for human milk processing with supercritical carbon dioxide. 78

Figure 2. 2. (a) Variable volume equilibrium cell of the experimental apparatus for human milk processing with supercritical carbon dioxide (b) a front view of the cell. 78

Figure 2. 3. Pareto chart showing the effects of independent variables on aerobic mesophilic bacteria reduction after high-pressure carbon dioxide processing obtained in the central composite design (CCD). 81

Figure 2. 4. Pareto chart showing the effects of independent variables on microbial survivals after high-pressure carbon dioxide processing of *E. coli* ATCC 25922 obtained in the central composite design (CCD). 82

Figure 3. 1. Human milk concentration using the block freeze concentration process. 93

Figure 3. 2. Titratable acidity (g/100 g) of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages. 97

Figure 3. 3. pH values of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages. 98

Figure 3. 4. Human milk mass balance resulting from the block freeze concentration process. 101

LISTA DE TABELAS

Table 2. 1 Factors and their respective levels of the experimental design.	77
Table 2. 2. Total count of viable aerobic mesophilic bacteria and E. coli ATCC 25922 in human milk after high-pressure carbon dioxide processing using different process conditions.....	79
Table 3. 1. Total solids content of the human milk, concentrated fluid human milk the mass transfer in relation to total solids content for the two freeze concentration stages.....	99
Table 3. 2. Physicochemical properties of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.	100
Table 3. 3. Physical properties and color parameters (L^* , a^* , b^* , C^* , h^*) of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AW - Atividade água
BGBL - Caldo bile verde brilhante
BLH - Banco de Leite Humano
C1 - Fração concentrada do primeiro estágio de concentração do leite humano
C2 - Fração concentrada do segundo estágio de concentração do leite humano
CO₂ - Dióxido de carbono
CO₃⁻²⁻ - Carbonato
C12:0 - Ácido láurico
C18:1n-9 - Ácido oléico
C18:2 n-9c11t (CLA) - Ácido rumênico
C18:2n-6 - Ácido linoléico
C18:3n-3 - Ácido alfa-linolênico
C20:4n-6 (AA) - Ácido araquidônico
C20:5n-3 (EPA) - Ácido eicosapentaenóico
C22:6n-3 (DHA) - Ácido docosaheptaenóico
ECN - Enterocolite necrosante
H⁺ - Hidrogênio
H₂CO₃ - Ácido carbônico
HCO₃⁻ - Bicarbonato
HPCD - Processamento por dióxido de carbono pressurizado
I1 - Fração de gelo do primeiro estágio de concentração do leite humano
I2 - Fração de gelo do segundo estágio de concentração do leite humano
IgA - Imunoglobulina A
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
LCPUFAs - Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
n-3 - Ômega 3
n-6 - Ômega 6
n-9 - Ômega 9
NMP - Número Mais Provável
P_c - Pressão crítica
PG2 - Prostaglandinas da série 2
PG3 - Prostaglandinas da série 3
REDEBLH - Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
RN - Recém nascido
T_c - Temperatura crítica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
OBJETIVOS.....	29
Objetivo Geral	29
Objetivos específicos	29
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
1.1 LEITE HUMANO.....	31
1.1.1 Composição Nutricional do Leite Humano.....	33
1.1.2 Microbiota do Leite Humano	38
1.1.3 Bancos de Leite Humano	40
1.1.4 Efeitos da Pasteurização Sobre Componentes do Leite Humano.....	43
1.2 PROCESSAMENTO NÃO TÉRMICO DE ALIMENTOS.....	46
1.2.1 Processamento por Dióxido de Carbono Pressurizado.....	47
1.2.1.1 Mecanismo de Ação Bactericida do Dióxido de Carbono	48
1.2.1.2 Inativação Microbiana Utilizando Dióxido de Carbono Pressurizado	51
1.3 CRIOCONCENTRAÇÃO	53

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO 2	71
2.1 EFFECT OF HIGH-PRESSURE CARBON DIOXIDE PROCESSING ON THE INACTIVATION OF AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA AND ESCHERICHIA COLI IN HUMAN MILK*	71
2.2 INTRODUCTION	74
2.3 EXPERIMENTAL	75
2.3.1 Selection of voluntary lactating donors.....	75
2.3.2 Samples	75
2.3.3 Inoculum preparation.....	76
2.3.4 Contamination of the milk samples	76
2.3.5 Microbiological analyses.....	76
2.3.6 Experimental design and apparatus.....	76
2.3.7 Statistical analysis	78
2.4 . RESULTS AND DISCUSSION	79
2.5. CONCLUSIONS.....	83
2.6 REFERENCES	84
CAPÍTULO 3	89

3.1 The impact of the block freeze concentration process on human milk properties intended to feeding newborns.....	89
3.2 INTRODUCTION.....	90
3.3 Material and methods.....	92
3.3.1 Human milk sampling.....	92
3.3.2 Freeze concentration procedure.....	92
3.3.3 Physicochemical analysis	93
3.3.4 Freeze concentration performance	94
3.3.5 Color analysis.....	95
3.3.6 Density.....	95
3.3.7 Dynamic viscosity	96
3.3.8 Statistical analyses.....	96
3.4 RESULTS AND DISCUSSION	96
3.5 Conclusion.....	106
3.6 REFERENCES.....	106
ANEXO A	113
ANEXO B.....	115

INTRODUÇÃO

A literatura científica é categórica ao afirmar que o leite humano é inegavelmente o alimento mais completo a ser oferecido de modo exclusivo para recém-nascidos (RNs) pré termo (nascidos até 36 semanas e 6 dias de gestação), a termo (nascidos entre 37 semanas e 41 semanas e 6 dias de gestação) e pós termo (acima de 42 semanas de gestação). Recomenda-se que o aleitamento seja exclusivo até os seis primeiros meses de vida e de forma complementada até os dois anos de idade ou mais (BERTAGNON; SEGRE, 2002; LIPPI et al., 2002; BERTINO et al., 2009, BRASIL, 2015). Este alimento é considerado espécie-específico, visto que contém todos os nutrientes, conteúdo energético e fatores imunológicos que asseguram o crescimento e desenvolvimento dos lactentes por ele alimentados (BEIJERS; SCHAAFSMA, 1996; ALMEIDA, 1999; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002; LIMA et al., 2004; CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007).

Em situações normais, logo após o nascimento o RN é alimentado diretamente ao seio materno. No entanto algumas condições tais como em casos de RNs pré termo, de baixo peso e de bebês doentes impedem que os mesmos possam ser alimentados diretamente ao seio materno. O leite fornecido deve então ter sua qualidade preservada para que possa atender às necessidades dos lactentes em questão. Para tanto é imperativo a submissão do leite humano ordenhado a um rigoroso processo de controle de qualidade que abrange desde as atividades de coleta, passando pelo processamento, até a distribuição do produto de forma que sua segurança seja garantida (BRASIL, 2008). A preocupação com a segurança deve-se ao fato que o leite humano, devido a ampla variedade de nutrientes, atividade água (A_w) elevada e pH aproximadamente neutro (BRASIL, 2012), serve também de meio de cultura para uma ampla variedade de contaminantes a partir do momento em que se esgotam seus fatores de defesa antimicrobianos intrínsecos (NOVAK, 1999; ROZOLEN; GOULART; KOPELMAN, 2006; IMIANOVSKY, 2007). Os serviços responsáveis por assegurar a qualidade do leite humano ordenhado são os Bancos de Leite Humano (BLHs). Os BLHs, por sua vez, utilizam a pasteurização lenta (62,5°C por 30 minutos) como forma de inativar os microrganismos potencialmente patogênicos que possam estar presentes. No entanto Arslanoglu et al. (2010) reportam que o processamento do leite humano, especialmente a pasteurização, pode comprometer alguns componentes nutricionais e biológicos do mesmo. São encontrados na literatura científica diversos estudos relativos aos efeitos da pasteurização

nos variados componentes do leite humano.

Outra importante questão com relação a alimentação de RNs pré termo e de baixo peso diz respeito às necessidades nutricionais e de proteção imunológica especializadas. Esses bebês apresentam imaturidade digestiva, metabólica e imunológica, tornando um desafio garantir seu crescimento e desenvolvimento sem expô-los aos riscos aumentados devido à alimentação com fórmulas lácteas, como enterocolite necrosante (ECN) e sepse tardia (SULLIVAN et al., 2010; CRISTOFALO et al.; 2013; UNDERWOOD, 2013). De acordo com Underwood (2013) quanto menor a idade gestacional ao nascimento, maiores são os riscos apresentados em relação a falhas de crescimento, atrasos no desenvolvimento, enterocolite e sepse de início tardio.

A melhor forma de alimentar RNs pré termo e de baixo peso é com o leite da própria mãe, visto que atende suas necessidades de crescimento e desenvolvimento. No entanto apenas 30% das lactantes de RNs de peso extremamente baixo consegue suprir 100% do volume de leite necessário para atender a essas necessidades. Nos casos em que um volume de leite adequado não é alcançado, a melhor alternativa é a alimentação com leite humano proveniente de doadoras (BERTINO, 2009; SULLIVAN, 2010; AHRABI; SCHANLER, 2013). Apesar de fornecerem um leite com nutrientes de origem homóloga, que resultam em digestão e absorção facilitada, a maior parte das doadoras são lactantes de bebês nascidos a termo, cuja produção láctea diferencia-se consideravelmente e apresenta menor teor de proteínas, ácidos graxos e moléculas bioativas (UNDERWOOD, 2013). Somado a isso, as perdas ocorridas ao longo do processo de pasteurização, podem resultar em déficits nutricionais e ganho de peso reduzido nos RNs alimentados com o leite de doadoras (AHRABI; SCHANLER, 2013; CRISTOFALO et al., 2013). Alguns nutrientes podem ainda ficar retidos no tubo de alimentação enteral, como no caso da gordura do leite. Tal fato leva à necessidade de suplementação do leite humano a ser fornecido a esses RNs, garantindo assim a adequação às suas necessidades nutricionais (HEIMAN; SCHANLER, 2006; GRANCE et al., 2015).

Com o intuito de minimizar as modificações ocorridas durante o processamento térmico nos alimentos, como por exemplo, componentes do sistema imune, ferro, cobre, zinco, proteínas totais, ácido ascórbico, tocoferol, e ao mesmo tempo propiciar produtos que sejam seguros do ponto de vista microbiológico, novas tecnologias como o processamento com dióxido de carbono (CO₂) pressurizado têm sido desenvolvidas e estudadas.

A tecnologia do CO₂ pressurizado surgiu há alguns anos como uma

alternativa promissora para processamento não térmico em alimentos (GARCIA-GONZALEZ, 2007). O CO₂ é inerte, não tóxico, não inflamável (ZHANG et al., 2006), além de ser de baixo custo, pode ser utilizado em temperaturas abaixo de 50°C, possui densidade elevada, baixa viscosidade, encontra-se disponível com elevado grau de pureza, não deixa resíduos e não cria problemas ambientais (CHOI et al.; 2008). Ao longo deste processamento o alimento entra em contato com o CO₂ pressurizado (sub ou supercrítico) por um determinado período de tempo, em sistema contínuo ou semi contínuo, promovendo um efeito bactericida (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). Em alimentos, esse processamento tem sido empregado em sua maior parte em produtos líquidos, particularmente em sucos de frutas e leite de outras espécies, todos com resultados positivos no que diz respeito à inativação microbiana. No entanto até o presente momento não foram encontrados registros na literatura científica referentes a sua aplicação no leite humano, bem como as consequências do processamento sobre sua qualidade microbiológica.

Outro desafio enfrentado pelos BLHs é atender as necessidades nutricionais de RNs pré termo A suplementação do leite humano é realizada para melhorar os parâmetros bioquímicos, as taxas de ganho de peso, crescimento e perímetro cefálico de RNs internados (HEIMAN; SCHANLER, 2006). Na grande maioria das unidades de cuidado neonatal intensivo, a suplementação é feita por meio da adição de aditivos à base de proteína de leite de vaca, tendo em vista sua maior disponibilidade (GRANCE et al., 2015). Nayak (2015), em estudo de revisão, reporta que esta proteína, no entanto, pode resultar no desenvolvimento de alergia em até 15% dos bebês. A proteína do leite de vaca é constituída por caseína e proteínas de soro de leite, sendo a caseína seu principal componente (80%). A caseína, por sua vez, é constituída pelas frações α -s₁, α -s₂, β e κ , que têm uma homologia sequencial fraca. A sensibilização a muitas caseínas, como a caseína α e κ -caseína é comum, provavelmente devido a sensibilização cruzada que ocorre devido a epítomos partilhados. Nayak (2015) menciona ainda que a β -lacto-globulina, uma proteína encontrada abundantemente no soro de leite de vaca, porém ausente no leite humano, é responsável por causar alergia em 13-76% dos casos. Consequentemente o RN alimentado com preparações à base de leite de vaca não estaria protegido de forma adequada (SULLIVAN et al., 2010; AHRABI; SCHANLER, 2013). O uso de uma alimentação exclusivamente à base de leite humano, pode reduzir ou até mesmo eliminar o desenvolvimento de ECN que necessite ou não de intervenção cirúrgica (SULLIVAN, 2010; SCHANLER, 2015). Dessa forma, visto

que a qualidade da proteína e dos ácidos graxos do leite humano é ideal para RNs, o uso de aditivos à base de leite humano é considerado mais adequado (GRANCE, et al., 2015). Algumas técnicas de concentração do leite humano vêm sendo estudadas, entre elas a centrifugação seguida da liofilização (LUCAS et al., 1980); evaporação (SANTOS et al., 1997); extração de gordura seguida da evaporação e extração de lactose, com ou sem liofilização (THOMAZ et al., 2012); e extração da lactose seguida da liofilização (GRANCE, et al., 2015). Também são utilizados aditivos comerciais à base de leite humano como o Prolact+ H²MF[®] +4, +6, +8, +10 (Prolacta Bioscience, Monrovia, California), não disponíveis no Brasil. Tanto as técnicas de concentração como os aditivos atualmente disponíveis apresentam custo elevado, limitando sua utilização (THOMAZ et al., 2012; UNDERWOOD, 2013).

A crioconcentração é uma técnica de concentração de alimentos líquidos que ocorre por meio do congelamento do conteúdo de água e subsequente remoção dos cristais de gelo formados a partir do alimento, permitindo a recuperação de alguns solutos no concentrado (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; SÁNCHEZ et al., 2011a,b; AIDER; OUNIS, 2012; BELÉN et al., 2012; PETZOLD et al., 2015). Por utilizarem baixas temperaturas, nestes processos não ocorrem as alterações provocadas pelo calor (HARTEL; ESPINEL, 1993). Sendo assim, a crioconcentração protege as vitaminas, proteínas e compostos bioativos do alimento (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; OUNIS, 2012), resultando na obtenção de produtos com qualidade nutricional e biológica preservada (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2009a).

Estudos relatam que crioconcentração tem obtido grande êxito na concentração de sucos, vinho, cerveja, extratos de café e chá, e laticínios (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2008, 2009 a,b; SÁNCHEZ et al., 2011a,b; AIDER; OUNIS, 2012; PETZOLD, et al., 2015). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos relativos à crioconcentração em leite humano. Por se tratar de um processo simples e de baixo custo quando comparado a outras tecnologias de concentração, a adição das fases obtidas na crioconcentração poderia proporcionar o aumento das propriedades nutritivas do leite humano.

No presente trabalho foram estudadas novas formas de processamento com o objetivo de reduzir os possíveis efeitos negativos do processamento térmico e de concentrar o leite humano para atender às necessidades de recém-nascidos pré termo.

Na primeira etapa do estudo, investigou-se a inativação microbiana

de mesófilos aeróbios presentes e *Escherichia coli* ATCC 25922 artificialmente inoculada no leite humano através da aplicação do CO₂ supercrítico no leite coletado de lactantes doadoras com o intuito de verificar a eficácia desse processamento no leite humano. Na segunda etapa do trabalho foi realizada a crioconcentração do leite pasteurizado com o objetivo de se obter frações de leite com nutrientes concentrados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o potencial do uso do CO₂ supercrítico e da crioconcentração para a conservação e aumento do valor nutricional de leite humano.

Objetivos específicos

- Determinar a carga microbiana de mesófilos aeróbios e *E. coli* ATCC 25922 em leite humano cru coletado de lactantes antes e após a contaminação artificial;
- Submeter as amostras de leite humano cru obtidas (após a contaminação) ao processamento com CO₂ supercrítico;
- Avaliar os efeitos do CO₂ supercrítico sobre a carga microbiana de mesófilos aeróbios e *E. coli* ATCC 25922 após o processamento;
- Submeter amostras de leite humano pasteurizado obtidas de Bancos de Leite Humano ao processo de crioconcentração em bloco;
- Avaliar os efeitos da crioconcentração em bloco sobre as propriedades físico-químicas, performance da crioconcentração, parâmetros de cor, densidade e viscosidade dinâmica do leite humano pasteurizado.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 LEITE HUMANO

O leite humano é indubitavelmente o alimento mais completo a ser oferecido de forma exclusiva a RNs pré termo (nascidos até 36 semanas e seis dias de gestação), a termo (nascidos entre 37 semanas e 41 semanas e seis dias de gestação) e pós termo (acima de 41 semanas de gestação) (BERTAGNON; SEGRE, 2002; LIPPI et al., 2002, BRASIL, 2015) durante os seis primeiros meses de vida e de forma complementada até dois anos de idade ou mais. É um alimento espécie-específico que é modificado de forma dinâmica, garantindo ao lactente todos os nutrientes necessários para assegurar seu crescimento e desenvolvimento, assim como energia e fatores imunológicos (BEIJERS; SCHAAFSMA, 1996; ALMEIDA, 1999; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002; LIMA et al., 2004; CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007). Os benefícios atribuídos ao leite humano incluem, além dos nutricionais, proteção contra infecções, alergias, problemas ortodônticos e fonoaudiológicos, digestibilidade facilitada, bem como o favorecimento do desenvolvimento neuropsicomotor, emocional, social e cognitivo (VOIGHT et al., 2002; BRASIL, 2003; SILVA et al., 2007).

Vários fatores estão relacionados às mudanças na composição do leite, entre os quais destacam-se: idade gestacional ao nascimento, período de lactação, fase de uma mesma mamada e alimentação materna (BRASIL, 2003; CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007).

Com relação à idade gestacional, o leite produzido por lactantes de RNs pré termo diferencia-se das que pariram a termo, apresentando características específicas, que o torna perfeitamente adequado às necessidades desses RNs (BRASIL, 2003). O leite pré termo fornece maior quantidade de proteína, imunoglobulina A (IgA) e lactoferrina que o leite maduro (BRASIL, 2003). Barros et al. (1984) afirmam que sua concentração mais elevada de proteínas, nitrogênio total, cálcio e energia proporcionam a estes RNs suplemento nutricional efetivo ao longo do primeiro mês de lactação. Calvano (2005) acrescenta que, tanto o colostro quanto o leite maduro pré termo, apresentam elevadas concentrações de agentes antimicrobianos, que estimulam a maturação imune e intestinal,

além de serem eficientes na proteção contra ECN e sepse tardia em RNs pré termo.

Quanto ao período de lactação, após o nascimento o leite passa por três estágios distintos: colostro, leite de transição e leite maduro (LAWRENCE, 1996; SALA-VILA et al., 2005). O colostro é um fluido de cor amarelada, com sabor ligeiramente salgado e de aparência “aguada”. A mama gravídica inicia sua secreção a partir das últimas semanas de gestação, continuando até os primeiros dias após o nascimento, com produção máxima entre o primeiro e quinto dia (VIANNA et al., 2005). Ao longo dos três primeiros dias após o parto, a mama é capaz de produzir de 2 a 20 mL a cada mamada, sendo que especialmente mulheres que já amamentaram podem manifestar maior facilidade de produção, podendo atingir um volume de até 40 mL (LAURINDO et al., 1991; LAWRENCE, 1996; CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007).

A composição do colostro oportuniza uma adaptação fisiológica do RN à vida fora do útero materno. Em comparação ao leite de transição e maduro, o colostro possui maior quantidade de proteínas, vitaminas lipossolúveis, minerais e menor quantidade de gorduras. Todavia essas quantias vão ao encontro das necessidades e reservas do RN (LAWRENCE, 1996). Seu valor calórico aproxima-se de 54 Kcal/100 mL, distribuídos em cerca de 5,7 g/100 mL de lactose, 2,9 g/100 mL de lipídios e 2,3 g/100 mL de proteínas. Sua coloração amarelada, por sua vez, deve-se à elevada concentração de betacaroteno (VALDÉS; SÁNCHEZ; LABBOK, 1996). Por meio da transmissão de anticorpos maternos, o colostro oferece ao RN imunização passiva, protegendo dessa forma seu sistema imune ainda imaturo (VIANNA et al., 2005). É também um importante facilitador do estabelecimento da microbiota do trato digestivo, bem como da expulsão do mecônio (LAWRENCE, 1996), auxiliando assim na prevenção da icterícia neonatal (BRASIL, 2003).

Aproximadamente entre o sétimo e o décimo quarto dia após o parto a lactante produz o leite de transição, assim chamado devido à sua composição intermediária entre colostro e leite maduro (LAURINDO et al., 1991; LAWRENCE, 1996). Nesse período ocorre uma redução progressiva no teor de proteínas e imunoglobulinas, com consequente aumento nas concentrações de lactose, gorduras e calorias totais do leite (LAWRENCE, 1996).

A produção do leite maduro inicia-se a partir de duas semanas após o nascimento. A exemplo do que ocorre com o colostro e leite de transição, sua composição varia amplamente e está relacionada a diversos fatores, tais como: de mulher para mulher, do horário do dia, início e final

da produção de cada mama, necessidades do bebê, condições de saúde materna, condições socioeconômicas, alimentação materna, idade gestacional e paridade (BRASIL, 2003; CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007). Ao longo dos seis primeiros meses de amamentação, a lactante produz de 700 a 900 mL/dia de leite maduro e a partir desse período a produção pode atingir 600 mL/dia. Visto que é composto por uma quantidade maior de lipídios ($\cong 4,2$ g/100 mL), o leite maduro proporciona ao lactente um valor calórico mais elevado, qual seja, aproximadamente 70 Kcal/100 mL. A quantidade de lactose e proteínas fornecidas por esse leite alcançam valores médios de 7,3 g/100 mL e 0,9 g/100 mL, respectivamente (VALDÉS; SÁNCHEZ; LABBOK, 1996).

Considerando as modificações ocorridas na composição do leite humano ao longo de uma mesma mamada, observa-se que na fase inicial predomina a fração hidrossolúvel do leite. Devido à grande quantidade de componentes hidrossolúveis presentes nessa fase, este tende a exibir coloração do tipo “água de coco”, porém sendo considerado normal uma coloração azulada ou esverdeada, dependendo da dieta materna. À medida em que a mama é esvaziada, o leite passa por um segundo estágio, com aumento da concentração de caseína, manifestando uma coloração mais branca e opaca. No final da mamada, os constituintes lipossolúveis agregam-se em maior quantidade ao leite, resultando num leite de cor mais intensa e amarelada, devido à presença de pigmentos no mesmo (BRASIL, 2008).

1.1.1 Composição Nutricional do Leite Humano

Considerando a composição química, define-se leite humano como uma mistura complexa, constituída por proteínas, açúcares e sais minerais, nos quais estão suspensos diversos compostos gordurosos (WORTHINGTON-ROBERTS, 1986; LAWRENCE, R.A., 1996; CALIL, V.M.L.T; VAZ, F.A.C., 2008). O componente do leite maduro presente em maior quantidade é a água (aproximadamente 87%), a qual preenche todas as suas necessidades hídricas do lactente desde o nascimento até 6 meses de idade. Porém, os componentes nutricionais que perfazem os 13% restantes, formam uma combinação de elementos que se mostram fundamentais para o crescimento e desenvolvimento infantil (CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007).

As vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis presentes no leite humano suprem todas as necessidades do lactente (WORTHINGTON-ROBERTS, 1986; MOURA, 2005). Mudanças na dieta materna podem,

no entanto, alterar o teor de vitaminas do leite (WORTHINGTON-ROBERTS, 1986; CARMO et al., 2004; SILVA, 2008).

Os minerais encontrados no leite maduro, de modo geral apresentam-se em quantidades inferiores aos do leite de vaca, podendo essa diferença estar associada à menor velocidade de crescimento da espécie humana (WORTHINGTON-ROBERTS, 1986). Carmo et al. (2004), afirmam que embora em quantidades menores, os minerais encontram-se em uma forma altamente biodisponível. Salientam ainda que os minerais possuem importante função, visto que atuam como componentes estruturais em tecidos, bem como cofatores essenciais de diversas enzimas e moléculas fisiológicas.

Dentre os carboidratos presentes no leite humano, a lactose, um dissacarídeo composto por galactose e glicose, é o componente que se encontra em maior quantidade (80%), seguida por oligossacarídeos nitrogenados (15 a 20%) (WORTHINGTON-ROBERTS, 1986; MOURA, 2005). Além de fornecer energia, a lactose auxilia na absorção de cálcio e a galactose é um dos açúcares encontrados nos glicolípídios localizados no encéfalo, tecidos nervosos e na bainha de mielina (Moura, 2005). Já os oligossacarídeos, em função de sua ligação ao ácido siálico, estimulam o desenvolvimento neurológico. Calvano (2005), afirma ainda que os oligossacarídeos auxiliam na proteção da saúde por meio da seleção de lactobacilos e bifidobactérias, os quais são benéficos ao organismo humano.

As proteínas, embora estejam presentes em quantidades inferiores ao leite de outras espécies, asseguram o crescimento dos bebês sem acarretar em sobrecarga renal aos mesmos na excreção de solutos hidrogenados (CAMELO JÚNIOR; HECK, 2007). Sua composição é bastante variada, incluindo caseínas e proteínas do soro do leite, numa proporção de cerca de 40:60, que ao serem digeridas proporcionam balanceamento adequado de aminoácidos para o bebê em crescimento. A digestão e utilização de micronutrientes e macronutrientes do leite é auxiliada por algumas proteínas, como a lipase estimulada pelo sal biliar, amilase, caseína, lactoferrina, haptocorrina e 1-antitripsina. Com relação à função de proteção, diversas proteínas tais como imunoglobulinas, caseína, lisozima, lactoferrina, haptocorrina, lactalbumina e lactoperoxidase possuem atividade antimicrobiana, contribuindo para a defesa de lactentes amamentados contra bactérias e vírus patogênicos. As proteínas também exercem atividade prebiótica por meio do estímulo ao crescimento de bactérias benéficas à saúde, tais como lactobacilos e bifidobactérias, que reduzem o pH intestinal, consequentemente limitando o crescimento de bactérias patogênicas. Algumas proteínas e

peptídeos como citocinas e lactoferrina têm atividades imunomoduladoras, enquanto outras (por exemplo, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento epidérmico e lactoferrina) encontram-se provavelmente envolvidas no desenvolvimento da mucosa intestinal e de outros órgãos de recém-nascidos (LÖNNERDAL, 2003).

Os lipídios constituem a maior fonte de energia para o lactente (LAURINDO et al., 1991). De acordo com Valdés, Sánchez e Labbok (1996); Sala-Vila et al. (2005) e Silva et al. (2007), a concentração de lipídios no leite maduro supre aproximadamente 50% das necessidades energéticas dos lactentes. Durante os primeiros meses após o nascimento, o bebê enfrenta um período de rápido crescimento e desenvolvimento, acumulando aproximadamente 1,4 a 1,7 kg de gordura corporal, que serve não apenas como estoque de energia, mas também como isolante térmico, além de importante função estrutural em todas as membranas plasmáticas das células do corpo e das organelas (KOLETZKO; MROTZEK; BREMER, 1988). Laurindo et al. (1991) afirmam que o leite maduro apresenta valores que variam entre 3 e 4 g/100 mL, enquanto que no colostro e no leite de transição essa quantidade varia de 1,8 a 2,9 g/100 mL e 2,9 a 3,6 g/100 mL, respectivamente.

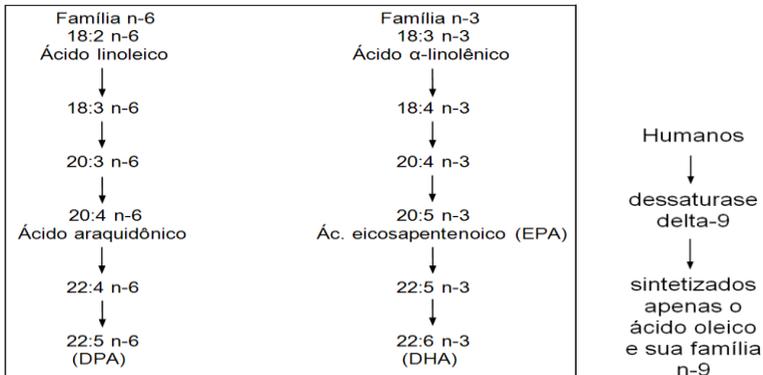
O conteúdo de lipídios presentes no leite humano é relativamente constante (CHULEI et al., 1995), porém sua composição em ácidos graxos pode variar amplamente e é influenciada por diversos fatores, dentre os quais, a duração da gestação, estágio de lactação, paridade, diabetes materna, e outros fatores individuais (FIDLER; KOLETZKO, 2000; KOVÁKS et al., 2005). Fidler, Salobir e Stibilj (2001) acrescentam que além da dieta materna, as gorduras do leite podem ser originadas por via endógena ou através da mobilização de estoques corporais. No entanto, a dieta consumida pela mãe parece ser a variável mais importante na mudança da composição lipídica do leite e pode ter grande impacto sobre a qualidade e a disponibilidade das mesmas (FIDLER; KOLETZKO, 2000; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002; TINOCO et al., 2007, 2008). Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados favorecem o aumento desses ácidos graxos no leite, ao passo que a dieta materna rica em carboidratos e pobre em lipídios, pode estimular a síntese de ácidos graxos de cadeia média pela síntese *de novo*, que ocorre na glândula mamária, a partir da glicose (BOERSMA et al., 1991; LAWRENCE, 1996; SILVA et al., 2005).

A organização do glóbulo de gordura, a composição em ácidos graxos, bem como o comprimento de suas cadeias, a distribuição dos ácidos graxos nas moléculas dos triglicérides e atividades enzimáticas

complementares são fatores que, por ação combinada, promovem a boa digestibilidade dos lipídios do leite humano (LAURINDO et al., 1991; CALIL; FALCÃO, 2003). Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs) da série n-3 e n-6 contidos no leite humano, correspondem de 15 a 20% do total de ácidos graxos presentes (SILVA; MIRANDA JR; SOARES, 2007).

O fígado pode sintetizar ácidos graxos insaturados a partir de ácidos graxos saturados através de um processo enzimático catalisado por enzimas dessaturases. Porém os animais, por possuírem unicamente a dessaturase-9, são capazes de sintetizar apenas o ácido oléico (C18:1n-9) e sua família (BORGGO, 2011). Sendo assim, ácidos graxos linoleico (C18:2n-6), da família n-6 e alfa-linolênico (C18:3n-3), da família n-3, são considerados essenciais ao organismo. Por meio de alongação e dessaturação, é possível sintetizar os ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3), docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3) e araquidônico (AA, C20:4n-6) (ANDRADE; CARMO, 2006), como pode ser observado na Figura 1.1 .

Figura 1. 1. As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados.



Fonte: Borgo (2011).

Porém, devido à imaturidade hepática de RNs, especialmente pré-termo, e sua incapacidade em dessaturar e alongar ácidos graxos precursores de LCPUFAs como o EPA e o DHA, esses também são considerados essenciais para os mesmos (RAMÍREZ-CORRIA, 2001; SILVA; MIRANDA JR; SOARES, 2007).

O DHA, devido ao seu alto grau de insaturação, proporciona grande fluidez à membrana, permitindo às proteínas mobilidade

necessária para desempenhar suas funções na camada bilipídica. A fluidez da membrana, por sua vez, é de elevada importância para favorecer o desenvolvimento do tecido visual e cerebral. O DHA é também componente estrutural dos fosfolipídios das membranas celulares, em especial da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (SILVA; MIRANDA JR; SOARES, 2007).

De acordo com Borgo (2011) o EPA é considerado um ácido graxo de grande importância na família n-3. Ele é constituinte dos fosfolipídios, especialmente do cérebro, e é precursor das prostaglandinas da série 3 (PG3). Os ácidos graxos n-3, em conjunto com outras substâncias antioxidantes, tais como vitamina E, β -caroteno e taurina, podem ser responsáveis pela prevenção da retinopatia associada à prematuridade (NASCIMENTO; ISSLER, 2004).

Entre os n-6, o AA encontra-se em abundância na fração de fosfolipídios. Esse ácido graxo é precursor de diversas famílias de eicosanóides, a exemplo das prostaglandinas da série 2 (PG2), tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (BORG, 2011).

Ácidos graxos monoinsaturados são importantes componentes de membrana, particularmente do tecido nervoso (LUNN, 2007). Sua ingestão a partir de alimentos pode ter efeitos fisiológicos em função de sua influência na fluidez da membrana e no metabolismo de colesterol (KOLETZKO; MROTZEK; BREMER, 1988). Apesar disso, de acordo com Fidler, Salobir e Stibilj (2001), os ácidos graxos monoinsaturados não são considerados essenciais, podendo ser sintetizados na glândula mamária a partir de ácidos graxos saturados, por dessaturação.

Ácidos graxos saturados contendo 10 e 12 carbonos são mais facilmente absorvidos por RNs pré termo do que triglicérides de cadeia longa. Isso pode ser vantajoso ao RN pré termo alimentado com o leite de sua própria mãe, já que eles podem ser benéficos para o balanço de cálcio (GENZEL-BOROVICZEÂNY; WAHLE; KOLETZKO, 1997).

A composição em ácidos graxos *trans* encontrados no leite humano vem ganhando atenção da comunidade científica. O ácido rumênico (C18:2 n-9c11t – CLA) está presente em produtos lácteos e carnes de animais ruminantes (WHIGHAM; COOK; ATKINSON, 2000; RIST et al., 2007; MOUTSIOLIS et al., 2008). Esse ácido graxo desempenha papel positivo sobre a saúde, possuindo efeitos sobre a expressão do gene em diversos tecidos, formação óssea e sobre o sistema imunológico (BELURY, 2002). Além disso, exerce outros efeitos benéficos incluindo atividade anticarcinogênica, redução de doenças cardíacas e diabetes (WHIGHAM; COOK; ATKINSON, 2000; MASTERS et al., 2002). Em

contrapartida alguns ácidos graxos *trans* formados a partir da hidrogenação parcial de óleos e gorduras apresentam vários efeitos negativos sobre a saúde (LESSA, 2007). Esses ácidos graxos agem produzindo efeitos adversos sobre o desenvolvimento fetal e infantil, bem como sobre ácidos graxos essenciais, metabolismo de LCPUFAs, níveis de lipoproteínas, além de favorecerem o estresse oxidativo (LESSA, 2007; MUELLER et al., 2010).

1.1.2 Microbiota do Leite Humano

O leite humano que necessita ser ordenhado e manipulado não possui nenhum tipo de barreira física que seja capaz de impedir a presença de microrganismos no mesmo (NOVAK et al., 2008). BRASIL (2008), classifica a microbiota do leite humano de acordo com sua origem (primária ou secundária) e quanto à patogenicidade (saprófito ou patogênica). Estes autores reportaram que a microbiota primária, constituída de vírus, é originária diretamente da corrente sanguínea materna e a microbiota secundária origina-se da pele, mamilo, ductos galactíferos ou mesmo da manipulação do leite sem a observância de condições adequadas de higiene. Pesquisas recentes sugerem que determinadas bactérias do trato gastrointestinal materno também poderiam translocar por meio de um mecanismo com envolvimento de células imunológicas mononucleares e migrar para as glândulas mamárias no final da gestação e na lactação (PEREZ et al., 2007; FERNÁNDEZ, et al., 2013; RODRÍGUEZ, 2014). Por meio da análise molecular do microbioma do leite humano é possível detectar a microbiota do intestino da mãe neste leite (JEURINK, 2013). O debate científico a respeito é estimulado tendo em vista a identificação no leite de células bacterianas vivas e/ou o DNA de espécies anaeróbias que normalmente relacionam-se com ambientes intestinais e que não podem sobreviver em ambientes aeróbios. Bactérias usualmente isoladas da pele (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*), também são frequentemente encontradas no leite humano, nas superfícies mucosas humanas, em amostras de corioamônio e líquido amniótico de mulheres grávidas, e ainda em sangue de cordão umbilical obtido de recém-nascidos saudáveis nascidos por via vaginal ou cesariana (RODRÍGUEZ, 2014). Isso sugere que elas podem colonizar a pele fetal e o trato digestivo no útero e aumenta a possibilidade de que a presença de bactérias no corioamônio, líquido amniótico, colostro e leite possa compartilhar um mecanismo comum ou semelhante em hospedeiros saudáveis (AAGAARD et al., 2014; RODRÍGUEZ, 2014). A translocação de bactérias intestinais é

usualmente associada a condições patogênicas e, portanto, tem sido principalmente estudada em pacientes nos quais as bactérias patogênicas disseminam-se por todo o corpo causando sepse, insuficiência de órgãos e às vezes levando à morte. Porém, sabe-se que uma baixa taxa de translocação bacteriana também ocorre em indivíduos saudáveis sem resultar em efeitos prejudiciais no hospedeiro (RODRÍGUEZ, 2014). Tem-se sugerido que a translocação bacteriana para tecidos extra-intestinais é, inclusive, um evento fisiológico benéfico em hospedeiros saudáveis, pois pode estar associada à imunomodulação, incluindo a maturação inicial do sistema imunológico neonatal (PEREZ et al., 2007; FITZSTEVENS et al., 2016).

Algumas bactérias contidas no leite são de grande importância para iniciar e desenvolver a microbiota intestinal de RNs. Essas bactérias, juntamente com os lactobacilos, denominados probióticos, ao serem ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde, tais como maturação do sistema imune e proteção contra a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos (COSTA, 2012; KATSUNAKA, KIMURA e TAKAHASHI, 2012). Isso se deve ao fato de a microbiota bífida ser capaz de reduzir o pH intestinal (através da produção de ácido láctico e acético), resultando num meio inapropriado para o desenvolvimento de bactérias patogênicas sensíveis à acidez e ainda produzir ácidos carboxílicos e ésteres de cadeia curta, os quais possuem ação bactericida (NOVAK, 1999; ALMEIDA, 2008). Almeida et al. (1998) e Novak (1999), afirmam que mesmo o leite humano sendo fonte de bactérias benéficas à saúde, e de outros fatores de proteção intrínsecos, tais como imunoglobulinas, macrófagos, linfócitos, lactoferrina, lisozima, entre outros, isso não pode ser considerado como um fator absoluto de segurança. O leite humano possui elevada Atividade Água (A_w) e quantidade de nutrientes, bem como pH proximamente a neutro, também servindo de meio de cultura para uma ampla variedade de contaminantes a partir do momento que se esgotam os referidos fatores de defesa (NOVAK, 1999; IMIANOVSKY, 2007; BRASIL, 2012). Por conseguinte, o valor imunológico e a capacidade de proteção ao organismo do lactente tornam-se reduzidos, ficando este mais suscetível ao desenvolvimento de infecções ou toxiinfecções. A contaminação do leite por bactérias pertencentes ao grupo de coliformes, como por exemplo, *E. coli*, e de bolores e leveduras podem indicar ocorrência de contaminação fecal, de bactérias patogênicas, estágio de deterioração do leite, ou ainda condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento ou armazenamento (IMIANOVSKY, 2007; ALMEIDA,

2008). Os coliformes 35 °C são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, gram negativas, não esporuladas, com capacidade de fermentar lactose e produzir ácido e gás, as quais crescem em faixa de temperatura entre 32 e 35 °C. Como membros desse grupo cita-se bactérias do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia* e *Citrobacter*. Como um subgrupo dos coliformes 35 °C existem os coliformes 45 °C. Esses, por sua vez, possuem a mesma capacidade de fermentar a lactose com subsequente produção de gás, porém conseguem desenvolver-se numa temperatura entre 44 e 45,5 °C. Novak e Almeida (2002) referem que ao proceder o isolamento de microrganismos a partir de coliformes fecais, encontra-se com grande frequência a *E. coli*, sendo esta considerada um indicador clássico de uma presença presumível de microrganismos enteropatogênicos. A *E. coli* é normalmente encontrada no intestino humano e de animais de sangue quente. Quando confinada ao lúmen intestinal, é geralmente inofensiva. No entanto, em indivíduos debilitados, imunossuprimidos ou ainda quando as barreiras gastrointestinais são violadas, linhagens de *E. coli* não patogênicas podem causar infecções (FORSYTHE, 2002). Os mesófilos aeróbios são um grupo de grande importância, uma vez que a maioria dos contaminantes que podem estar presentes no leite, deteriorantes ou patogênicos, pertencem a este grupo (JAY, 2005). Embora possam avaliar a qualidade sanitária e a adesão de boas práticas, são pobres indicadores de segurança, posto que não estão diretamente relacionados à presença de patógenos ou toxinas (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001). Sendo assim, para evitar a exposição do RN vulnerável a riscos que podem comprometer sua saúde, a Resolução RDC nº 171 (BRASIL, 2006) destaca a necessidade de atenção às ações de proteção do leite humano ordenhado. Salienta ainda a importância de assegurar que o leite oferecido a RNs que dele necessitam, não sofra alterações que possam vir a comprometer sua qualidade química, imunológica, sensorial e estrutural.

1.1.3 Bancos de Leite Humano

Algumas situações impedem que lactentes possam ser alimentados diretamente ao seio materno após o nascimento. Em determinadas condições, como em casos de prematuridade, baixo peso e de lactentes doentes, o leite fornecido deve ter sua qualidade preservada para que possa atender às necessidades dos lactentes em questão. Para tanto é imperativo a submissão do leite humano ordenhado a um rigoroso processo de controle de qualidade que abrange desde as atividades de

coleta, processamento, até a distribuição do produto de forma que sua segurança seja garantida (BRASIL, 2008). Os serviços responsáveis por assegurar a qualidade do leite humano ordenhado são os Bancos de Leite Humano (BLH).

De acordo com Brasil (2008), BLH é “um serviço especializado vinculado a um hospital de atenção materna e/ou infantil. O BLH é responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea, seleção, classificação, processamento, controle de qualidade e distribuição, sendo proibida a comercialização dos produtos por ele distribuídos”.

O primeiro BLH do Brasil foi criado no Rio de Janeiro em 1943, visando coletar e distribuir leite para atender situações especiais como prematuridade, distúrbios nutricionais, bem como alergias a proteínas heterólogas (BRASIL, 2008; VIECZOREK, 2010). Segundo Brasil (2008), até o ano de 1985 a doação de leite não era decorrente de um processo voluntário e consciente. Muitas vezes os BLHs ofereciam benefícios às doadoras que incluíam desde assistência médica especializada, distribuição de cestas básicas ou até mesmo financeiros, cuja remuneração variava de acordo com o volume de leite produzido. O leite era distribuído aos lactentes sem ser submetido a nenhum tipo de tratamento. No entanto, com o aumento do volume de leite coletado e doado aos BLHs, iniciou-se um tratamento térmico que consistia em submetê-lo a um banho-maria por 20 minutos.

A partir de 1985, em decorrência do incremento de trabalhos de pesquisa e desenvolvimento tecnológico que tinham como princípio otimizar as condições operacionais dos BLHs, foi possível certificar a qualidade microbiológica do leite humano ordenhado, resultando então numa grande expansão do número de BLHs no país (BRASIL, 2008). Em 26 de maio de 1988 foi publicado o primeiro documento destinado a regular a instalação e funcionamento dos BLHs no Brasil (BRASIL, 1988), sendo sobreposto em 04 de setembro de 2006 pela Resolução RDC nº 171 (BRASIL, 2006).

Em 1998 foi lançada a Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, posteriormente chamada Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (REDEBLH), com a incumbência de promover a saúde da mulher e da criança, objetivando reduzir a mortalidade neonatal e melhorar os indicadores de aleitamento materno em nosso país. Tal fato expressou uma decisão de grande importância em políticas públicas no campo da saúde, além de sedimentar um modelo de gestão mais adequado à realidade de expansão experimentada na ocasião. O êxito dessa nova

lógica operacional oportunizou uma expansão natural da REDEBLH para além das fronteiras brasileiras, atuando inicialmente em países sul americanos.

A REDEBLH possui um Centro de Referência Nacional em Bancos de Leite (com sede no Rio de Janeiro/RJ) e Centros de Referência e Comissões Estaduais. Fica a cargo do Centro de Referência Nacional repassar aos estados instruções normativas que regem o funcionamento dos BLHs bem como os avanços em pesquisas científicas e ainda resolver problemas passíveis de ocorrer no dia a dia dos serviços (MAIA et al., 2006; BRASIL, 2008). Atualmente o Brasil conta com 213 bancos de leite, constituindo-se a maior rede de bancos de leite do mundo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2014).

Os BLHs operam suas atividades obedecendo a um sistemático controle de qualidade durante todo o processo, o qual utiliza a pasteurização a 62,5 °C por 30 minutos como forma de garantir um produto seguro e livre de microrganismos patogênicos. O controle de qualidade inicia antes mesmo da coleta, por meio da paramentação da doadora (uso de gorro, máscara e avental fenestrado) e dos profissionais de saúde envolvidos (avental, gorro, luvas de procedimento, óculos de proteção e máscara), além de um rigoroso processo de higienização de mãos e antebraços. Após a coleta, o leite deve ser imediatamente submetido a uma cadeia de frio (resfriamento ou congelamento), visando impedir degradações químicas, físico-químicas, microbiológicas e imunológicas. Quando a coleta do leite não obedece aos padrões determinados, o mesmo pode apresentar sujidades, odores estranhos, entre outros, que desqualificam sua utilização (BRASIL, 2008).

Ao longo do processo de pasteurização outros fatores são considerados primordiais para garantir a qualidade do leite a ser processado, a saber, a seleção e classificação do leite. Durante a seleção são verificadas as condições da embalagem, presença de sujidades, cor do leite, *off-flavor* e acidez titulável (Acidez Dornic), face à sua maior sensibilidade para detectar a acidez desenvolvida do leite humano. A classificação envolve a verificação do período de lactação que se encontra a doadora, acidez Dornic, bem como o conteúdo energético do leite, pela técnica do crematócrito (BRASIL, 2008).

Após o degelo, seleção e classificação, o leite a ser pasteurizado deve ser reenvasado, visando a uniformização dos volumes e embalagens. Deve-se proceder esse processo com técnica microbiológica, em campo de chama ou cabine de segurança biológica. Os passos seguintes incluem a pasteurização, resfriamento imediato e, em seguida, análise microbiológica do leite (BRASIL, 2008).

Visto que o leite humano não é misturado, não é possível pasteurizá-lo em lotes (como aplicado em indústria de laticínios). Sendo assim todos os frascos contendo leite doado aos BLHs, necessitam obrigatoriamente ser analisados sob o ponto de vista microbiológico (NOVAK; ALMEIDA, 2002). O controle de qualidade microbiológica exercido pela REDEBLH baseia-se na utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária, notadamente o grupo de coliformes (BRASIL, 2008). Diante de tal necessidade, e ainda considerando a demanda elevada de mão de obra e meios de cultura, os BLHs adotam um teste alternativo para detecção de coliformes 45 °C no leite, o qual não quantifica o número de coliformes no leite após sua pasteurização, indicando apenas a presença ou ausência dos mesmos, ou seja, resultando em testes positivos ou negativos (NOVAK; ALMEIDA, 2002). O método clássico, em contrapartida, adota o Número Mais Provável (NMP) de coliformes presentes (BRASIL, 2008). Todavia Novak e Almeida (2002), afirmam que a simples presença de coliformes no leite, independentemente do tipo e quantidade presentes, inviabiliza irrefutavelmente a alimentação de RNs pré termo com o mesmo.

O teste alternativo acima citado consiste na inoculação, sob campo de chama ou em cabine de segurança biológica, de quatro alíquotas de 1 mL de leite pasteurizado, coletadas em pontos diferentes do frasco (total 4 mL) em tubos de 10 mL de caldo bile verde brilhante (BGBL) a 50 g/L (5% p/v), contendo em seu interior tubos de Durhan e posteriormente incubados por um período de 24 a 48 horas, a 36 ± 1 °C. Os resultados positivos, determinados a partir da presença de gás nos tubos de Durhan, são submetidos a uma prova confirmatória com auxílio de uma alça bacteriológica calibrada (0,05 mL) em tubos de BGBL numa concentração de 40 g/L (4% p/v) sob as mesmas condições de tempo e temperatura. A presença de gás após esse segundo teste confirma a existência de microrganismos do grupo coliforme no leite, revelando-se inapto para consumo (BRASIL, 2008).

1.1.4 Efeitos da Pasteurização Sobre Componentes do Leite Humano

Embora seja incontestável a superioridade do leite humano pasteurizado em relação às fórmulas lácteas na alimentação de lactentes pré termo e doentes, há que se considerar que processos térmicos destinados a possibilitar a administração do leite doado a tais lactentes podem comprometer alguns componentes do mesmo. São encontrados na

literatura científica diversos estudos relativos aos efeitos da pasteurização nos variados componentes do leite humano, alguns deles com resultados divergentes.

Ford et al. (1997) estudaram o efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre o teor imunoglobulinas e enzimas de leite humano aplicando temperaturas de 56 °C por 30 minutos, 62,5 °C por 30 minutos e 65, 70, 75, 80 85, 90, 95 e 100 °C por 15 minutos. Observaram que a pasteurização lenta resultou numa redução de 20% de IgA, suprimiu o conteúdo de IgM e a maior parte de lactoferrina, no entanto a lisozima ficou estável. O aumento das temperaturas de tratamento resultou numa redução progressiva, próxima a 100%, a 100 °C. O mesmo aconteceu com a capacidade do leite de proteger o ácido fólico contra a absorção bacteriana.

Os efeitos da pasteurização lenta e do armazenamento por até 90 dias sobre os teores de gordura e L-lactato, bem como da composição lipídica de um *pool* de leite humano, foram estudados por Lepri et al. (1997). Estes autores observaram que a pasteurização reduziu o teor de gorduras em 6% e o L-lactato em pelo menos 7%. Constataram também que a pasteurização e armazenamento induziram hidrólise de triglicérides. A quantidade absoluta de ácidos graxos livres, que após a coleta foi de 0,5%, duplicou após a pasteurização e aumentou ainda mais após o armazenamento.

Em estudo conduzido por Costa et al. (2003), o qual investigou os efeitos da pasteurização de colostro de lactantes de RNs pré termo e a termo referentes aos teores ferro, cobre e zinco, os autores observaram redução significativa destes elementos após esse processamento.

Koenig et al. (2005) avaliaram o efeito da pasteurização lenta (62,5 °C por 30 minutos) sobre os teores de proteína total, lisozima e imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) em colostro de mães de RNs pré termo e a termo antes e após a pasteurização. Os resultados mostraram que a pasteurização diminuiu significativamente todos os fatores analisados.

Braga e Palhares (2007) ao estudarem os efeitos da pasteurização e evaporação do leite humano sobre sua composição bioquímica, imunológica e osmolaridade, observaram que tanto gordura quanto sódio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio, proteína, lactose, além da osmolaridade, não apresentaram alterações estatisticamente significativas em sua dosagem. Todavia constataram uma redução significativa no teor de IgA.

Os efeitos da pasteurização lenta (a 62,5 °C por 30 minutos) e rápida (a 100 °C por 5 minutos) sobre as concentrações de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, tocoferóis e ácidos graxos foi avaliado

por Romeu-Nadal et al. (2008). Foi observado uma redução significativa por meio de ambos os métodos nos teores de ácido ascórbico, dehidroascórbico, α -tocoferol e γ -tocoferol. No entanto os ácidos graxos, incluindo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa não foram afetados.

A comparação de pasteurização lenta (a 62,5 °C por 30 minutos) e rápida (a 72 °C por 15 segundos) também foi utilizada por Baro et al. (2011), para avaliar os efeitos sobre o perfil de proteínas. Ao utilizar a pasteurização lenta foram observadas modificações nos teores de lipase (redução), lactoferrina e de componentes do sistema imune. A pasteurização rápida, em contrapartida, preservou a integridade da lipase, da lactoferrina e, até certo ponto, das IgAs. Os autores relataram ainda que a pasteurização resulta no aumento de lisina disponível.

Silvestre et al. (2008) também compararam a pasteurização lenta (a 63 °C por 30 minutos) e rápida (a 75 °C por 15 segundos) em relação ao leite fresco, considerando marcadores de estresse oxidativo (glutaciona, atividade da glutaciona peroxidase, malondialdeído e capacidade antioxidante total). Observaram que não houve alteração da concentração de malondialdeído, porém observaram redução na concentração de glutaciona e capacidade antioxidante total nas amostras de leite submetidas aos processamentos térmicos. No entanto, a queda destes parâmetros foi considerada significativamente maior quando se aplicou a pasteurização lenta. Verificaram ainda que ambos os tratamentos térmicos induziram perda considerável e semelhante da atividade da glutaciona peroxidase.

Bertino et al. (2008), ao investigarem os efeitos da pasteurização lenta sobre os teores de oligossacarídeos do leite humano pré termo, concluíram que a pasteurização não comprometeu a concentração ou o padrão de oligossacarídeos das amostras analisadas.

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, vitamina C e vitamina E do leite humano. Observaram que não houve variação nas proporções de ácidos graxos e dos níveis de delta, gama e alfa tocoferóis com nenhum dos tratamentos. Com relação aos níveis totais de vitamina C e ácido ascórbico, verificaram que, após o HPP, foram mantidos. No entanto, a pasteurização resultou numa redução de 20% e 16% nos teores de vitamina C total e ácido ascórbico, respectivamente, em relação ao leite não tratado.

Borgo (2011), em estudo que avaliou os efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano, observou considerável variação na concentração de ácidos graxos da gordura do leite. Concluiu que as perdas ocorridas podem levar a equívocos no aporte energético, nutricional e de componentes imprescindíveis para o desenvolvimento fisiológico dos lactentes que dele necessitam. Além disso, deduziu que outros nutrientes lipossolúveis tais como vitaminas e elementos traço podem ser destruídos durante as etapas de pasteurização, descongelamento e congelamento do leite. Depreendeu ainda que a absorção reduzida de lipídios por lactentes pré termo pode resultar em crescimento e ganho de peso reduzido.

Considerando a responsabilidade dos bancos de leite humano em fornecer aos lactentes pré termo e doentes um leite cujas características favoreçam seu crescimento e desenvolvimento fora do útero, faz-se necessário que pesquisas busquem constantemente por processamentos que visem reduzir as perdas ocorridas e, ao mesmo tempo, garantam que o teor de nutrientes e energia possa preencher suas necessidades aumentadas, sem expô-los aos riscos causados por uma alimentação com fórmulas lácteas ou com fortificantes de leite humano à base de leite de vaca.

1.2 PROCESSAMENTO NÃO TÉRMICO DE ALIMENTOS

A crescente exigência do mercado consumidor por produtos alimentícios que mantenham seus atributos nutricionais e sensoriais preservados e sejam, ao mesmo tempo, seguros do ponto de vista microbiológico e com vida de prateleira aumentada, tem estimulado a busca por novas tecnologias que minimizem as perdas ocorridas durante o processamento térmico (LEISTNER; GORRIS, 1995; COSTA; DELIZA; ROSENTHAL, 1999; BINOTI, M.L.; RAMOS, A.M., 2015). Essas novas tecnologias, também denominadas “tecnologias não convencionais”, “tecnologias emergentes”, “tecnologias limpas” ou “tecnologias de baixo impacto ambiental”, visam, por sua vez, desenvolver técnicas de processamento/preservação que não resultem em alterações indesejáveis nos alimentos e não acarretem em impactos negativos ao meio ambiente (COSTA; DELIZA; ROSENTHAL, 1999; SOARES, 2012). Como exemplos dessas novas tecnologias, Costa, Deliza e Rosenthal (1999) citam os pulsos elétricos, o tratamento ôhmico, a irradiação, a engenharia genética, a biotecnologia e, em particular, a alta-pressão. Dentre essas novas tecnologias para o processamento não

térmico de alimentos a nível industrial, a alta pressão hidrostática tem sido aplicada para produzir alimentos como sucos, guacamole e presunto, e a irradiação tem sido aplicada em especiarias (DE MATOS, 2013).

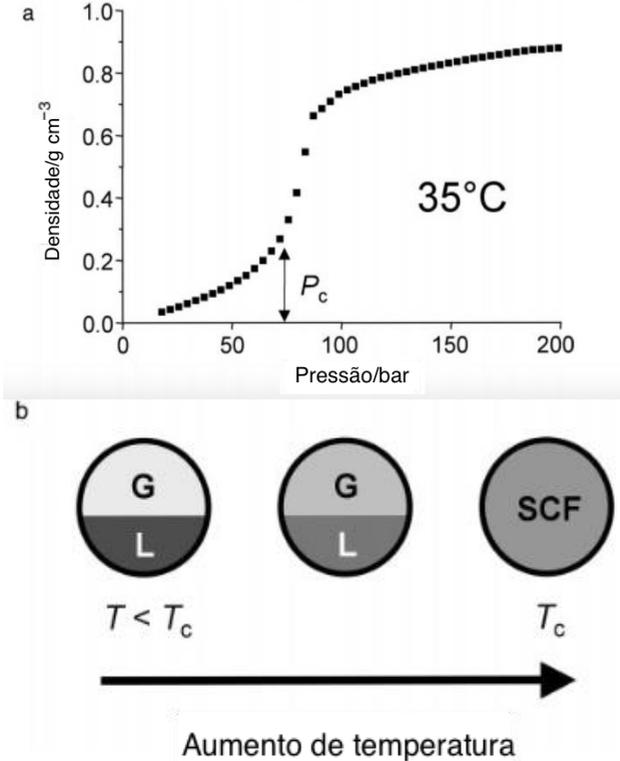
Visto que o processamento do leite humano envolve a aplicação de um processo térmico, e considerando a importância da preservação dos componentes nutricionais, fatores de proteção, conteúdo energético, além da ausência de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos para atender as necessidades especiais de RNs pré termo, de baixo peso e doentes, buscou-se estudar os efeitos de uma tecnologia não térmica (processamento por dióxido de carbono pressurizado), na inativação microbiana em leite humano de doadoras.

1.2.1 Processamento por Dióxido de Carbono Pressurizado

A utilização do dióxido de carbono (CO_2) pressurizado surgiu há alguns anos como uma alternativa promissora para processamento não térmico em alimentos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). De acordo com Zhang et al. (2006), o CO_2 supercrítico é inerte, não tóxico, não inflamável. Choi et al. (2008), complementam que é de baixo custo, pode ser utilizado em temperaturas abaixo de $50\text{ }^\circ\text{C}$, possui densidade elevada, baixa viscosidade, encontra-se disponível com elevado grau de pureza, não deixa resíduos e não cria problemas ambientais. Devido aos benefícios reais proporcionados pelo CO_2 , tais como redução do emprego de solventes orgânicos tóxicos, bem como a facilidade da separação do solvente, Darr e Poliakoff (1999) apoiam a extensiva utilização deste fluido supercrítico.

Ao longo do processamento com dióxido de carbono pressurizado, o alimento entra em contato com o CO_2 pressurizado (sub ou supercrítico) por um determinado período de tempo, em sistema contínuo ou semi contínuo. O CO_2 encontra-se em estado supercrítico quando sua temperatura e pressão encontram-se acima dos seus valores de ponto crítico, a saber, $T_c = 31,1\text{ }^\circ\text{C}$ e $P_c = 7,38\text{ MPa}$, e apresenta-se como uma fase única. O CO_2 supercrítico possui a capacidade de se difundir através dos sólidos, como um gás, e de dissolver materiais, como um líquido. Além disso, ele pode facilmente mudar de densidade mediante pequenas alterações na temperatura ou pressão, como pode se observado nas Figuras 1.2a e 2b (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

Figura 1. 2. (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO₂ puro a 35 °C. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \square T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c .



Legenda: G: gás. L: líquido. SCF: fluido supercrítico
 Fonte: Tradução de Cooper (2000).

1.2.1.1 Mecanismo de Ação Bactericida do Dióxido de Carbono

Há mais de 100 anos sabe-se que o CO₂ pode exercer um efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de desvendar seu mecanismo de ação bactericida. Embora o mecanismo exato de ação ainda necessite ser apurado, Garcia-Gonzalez et al. (2007), em estudo de revisão, apontam para as seguintes etapas:

- Solubilização de dióxido de carbono pressurizado na fase externa líquida: alimentos que apresentam elevado teor de água permitem que o dióxido de carbono se dissolva na água para formar o ácido carbônico (H_2CO_3). Este, por sua vez, se dissocia em bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}) e hidrogênio (H^+) buscando formar o equilíbrio. Como consequência do equilíbrio alcançado, a água entra em contato com o dióxido de carbono pressurizado, tornando os íons ácidos devido à formação e dissociação do ácido carbônico, que libera íons de hidrogênio. Este fato reduz o pH extracelular que pode inibir o crescimento microbiano e também pode diminuir a resistência microbiana à inativação por causa do aumento do consumo de energia para manter a homeostase do pH pela força motriz do próton.

- Modificação da membrana celular: quando o dióxido de carbono aquoso (não hidratado) se aproxima da superfície da célula bacteriana, pode se espalhar no plasma da membrana, podendo acumular-se na sua camada lipofílica interna (fosfolipídio). O montante de CO_2 acumulado na fase lipídica pode então, sofrer um transtorno tanto estrutural como funcional da membrana celular devido a uma perda na cadeia lipídica, o que pode aumentar a fluidez e, portanto, a permeabilidade da membrana.

- Redução pH intracelular: o aumento da permeabilidade da membrana permite que o dióxido de carbono pressurizado penetre facilmente através da membrana celular bacteriana e se acumule no interior do citoplasma das células. No citoplasma, as concentrações relativas de ambos CO_2 e HCO_3^- aquosos, estão sendo controladas pelo pH interno como resultado do pH da homeostase, visando manter o pH do citoplasma constante (o que é essencial para viabilidade celular ideal e da atividade celular).

- Inativação da enzima/inibição do metabolismo celular devido à redução do pH: ainda que muitos aspectos da estrutura e função celular sejam influenciados pelo pH, a atividade catalítica das enzimas é particularmente sensível. Enzimas

que compõem a maioria das proteínas no citosol têm atividade máxima no pH ótimo e sua atividade diminui drasticamente em ambos lados do ideal. Dessa forma, a redução do pH citosólico pode resultar na inibição e/ou inativação de enzimas essenciais para a regulação dos processos metabólicos.

- Efeito inibitório direto do CO_2 e HCO_3^- molecular no metabolismo: o regulamento de uma via metabólica pode ocorrer em diversos níveis. A taxa de reação enzimática não é apenas uma função do pH, mas também das concentrações intracelulares do substrato, produto, cofator, os quais são os elementos fundamentais na regulação da atividade enzimática. A concentração de ácido carbônico parece ser fundamental para a regulação da atividade enzimática com algumas enzimas sendo estimuladas e outras inibidas por este ânion.

- Transtorno do equilíbrio intracelular de eletrólitos: quando aplica-se pressão e acumula-se dióxido de carbono no interior do citoplasma das células bacterianas, danos letais podem ser produzidos ao sistema biológico das células. Este fato, pode converter o HCO_3^- para CO_3^{2-} , o que poderia precipitar eletrólitos inorgânicos intracelulares a partir de células e membranas celulares.

- Remoção dos componentes vitais das células e membranas celulares: os diferentes autores Kamihira et al. (1987), Lin et al. (1992a, 1993) citados por Garcia-Gonzalez et al. (2007) também sugeriram que o CO_2 acumulado pode ser devido ao seu poder de solvência relativamente alto - "extrair" constituintes vitais das células ou das membranas celulares. Neste mecanismo, sob pressão, o CO_2 primeiro penetra nas células para construir a densidade de um nível crítico no interior das mesmas, depois, remove componentes intracelulares (como fosfolípidos e compostos hidrofóbicos) para perturbar ou alterar a estrutura das membranas e/ou o equilíbrio do sistema biológico, promovendo assim a inativação.

Spilimbergo e Bertucco (2003), consideram que a indução dos

seguintes fenômenos é responsável pelos efeitos inibitórios do CO₂ em bactérias patogênicas de origem alimentar: (1) a ruptura celular explosiva devido a um aumento da pressão interna, (2) a modificação das membranas celulares e a extração de lipídios da parede celular (3), a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo celular, e (4) a extração de substâncias intracelulares. A membrana celular é, de acordo com Morita (1975), a parte do microrganismo que mais sofre ação da pressão elevada. Ela provoca mudanças na organização molecular do complexo lipídeo-peptídeo rompendo a estrutura da membrana de dupla camada de ácidos fosfatídicos. Ao ocorrer a reorganização da membrana, sucedem-se modificações nas funções das proteínas que controlam a permeabilidade de íons, resultando na perda da funcionalidade da membrana.

1.2.1.2 Inativação Microbiana Utilizando Dióxido de Carbono Pressurizado

Um grande número de trabalhos reporta a redução ou eliminação microbiana por meio da aplicação de dióxido de carbono supercrítico em culturas puras de microrganismos, tendo sido estudadas bactérias Gram positivas, Gram negativas e inativação de esporos. No que tange a sua aplicação em alimentos, poucas pesquisas têm sido conduzidas a respeito da inativação microbiana em alimentos sólidos. Damar e Balaban (2006) e Garcia-Gonzalez et al. (2007) referem que esse procedimento é aplicado em sua maior parte a alimentos líquidos, particularmente em sucos de frutas.

Visto que não foram encontrados na literatura estudos relativos à aplicação do dióxido de carbono supercrítico em leite humano, devido à proximidade da matriz alimentar, vale citar os seguintes estudos:

- Erkmen (1997) ao analisar os efeitos do dióxido de carbono pressurizado sobre *Staphylococcus aureus* em caldo nutriente, e em leite de vaca integral e desnatado, observou inativação total de *S. aureus* e mesófilos aeróbios em caldo nutriente após tratamento com CO₂ a 7 MPa durante 100 minutos, e 8 MPa durante 60 minutos. O tratamento do leite integral com 14,6 MPa por 5 horas e do leite desnatado com 9 MPa por 2 horas, ambos com temperatura fixada em 25 °C, conduziu à eliminação da quantidade inicial de

mesófilos aeróbios (aproximadamente 10^7 – 10^8 UFC/mL) e *S. aureus* (10^8 UFC/mL).

- Erkmen (2001) avaliou os efeitos do dióxido de carbono pressurizado sobre a *E. coli* em caldo nutriente, leite desnatado e integral, aplicando pressões de 10, 7,5, 5 e 2,5 MPa e temperaturas de 20 °C, 30 °C e 40 °C. Em caldo nutriente, a *E. coli* foi inativada sob tratamentos com CO₂ a 10, 7,5, 5 e 2,5 MPa durante 50, 65, 100 e 140 minutos a 30 °C, respectivamente. O tratamento com pressão de CO₂ de 10 MPa durante 6 horas resultou numa diminuição de 6,42 e 7,24 ciclos de log em leite integral e em leite desnatado, respectivamente. A menor eficácia do tratamento do leite em relação ao caldo nutriente foi atribuída aos teores de constituintes do leite, tais como proteínas e, no caso do leite integral, de gorduras.

- Werner e Hotchkiss (2006) estudaram o efeito do CO₂ pressurizado em diferentes temperaturas (15, 30, 35 e 40 °C), pressões (entre 10,3 e 48,3 MPa) e concentrações de CO₂ (de 0, 3, 66 e 132 g/kg de leite) em relação às populações microbianas psicrotóficas nativas totais, *Pseudomonas fluorescens* totais inoculadas e populações totais de esporos inoculados. Eles observaram que, usando o sistema estudado, o CO₂ pressurizado resulta em maior letalidade microbiana no leite quando acima das temperaturas críticas do que abaixo e sugeriram que um nível crítico de limiar de concentração de CO₂ é necessário para obter os efeitos letais.

- Liao et al. (2014) avaliaram a inativação de microrganismos naturalmente presentes em leite de vaca por meio da aplicação de CO₂ pressurizado com temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C, pressões de 10, 15, 20, 25 e 30 MPa, por um período de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos. Os autores observaram que a redução máxima de mesófilos aeróbios (4,96 log) foi obtida a 25 MPa, 50 °C, por 70 minutos. A 25 MPa, uma inativação completa de coliformes, foi alcançada com 20, 30, 50 e 70 minutos, em tempos de 50, 40, 30 e 20 °C, respectivamente. A 25 MPa, os bolores e leveduras foram completamente inativados quando o leite foi submetido a tratamentos por 70 minutos, com

temperatura de 40 °C ou por 50 minutos, a 50 °C.

- Ceni et al. (2016) aplicaram o CO₂ supercrítico por meio de um sistema contínuo para investigar a inativação de fosfatase alcalina e *E. coli* ATCC 25922. As condições de processo aplicadas incluíram: razão CO₂: leite de 0,05-0,45% em peso, temperatura de 30 a 70 °C, pressão de 8 a 18 MPa e tempo de residência aparente de 10 a 30 minutos sobre a enzima e inativação microbiana. A inativação enzimática de 94,5% foi atingida a uma razão de 0,05%, 70 °C, 8 MPa e tempo de residência aparente de 30 minutos. Nessa condição, a taxa de inativação microbiana foi de 0,09 min⁻¹.

1.3 CRIOCONCENTRAÇÃO

A crioconcentração é uma técnica de concentração de alimentos líquidos que ocorre por meio do congelamento do conteúdo de água e subsequente remoção dos cristais de gelo formados a partir do alimento, permitindo a recuperação de alguns solutos no concentrado (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; SÁNCHEZ et al., 2011a,b; AIDER; OUNIS, 2012; PETZOLD et al., 2015) e proporcionando a remoção de água mais seletiva em relação à evaporação e micro/ultrafiltração (YEE; WILEY; BAO, 2007). A remoção do gelo não implica no comprometimento das características do produto concentrado, permanecendo este com todas as características da solução original (HARTEL; CHUNG, 1993). Além disso, pode-se afirmar que esta técnica é simples e de baixo custo, quando comparada a outras técnicas de concentração, como por exemplo, a evaporação.

Existem basicamente 3 métodos de crioconcentração: suspensão, concentração progressiva e em blocos (AIDER, HALLEUX; MELNIKOVA, 2009a; SÁNCHEZ, et al., 2011a; AIDER; OUNIS, 2012).

No primeiro método (suspensão), ocorre um congelamento parcial da água e separação da fração de gelo da solução congelada. Nessa técnica, a qualidade da solução final depende do tamanho dos cristais, bem como da quantidade de soluto neles incluídos. Aider, Halleux e Melnikova (2009a) referem que a concentração em suspensão envolve sistema complexo de equipamentos (raspador de superfícies, permutadores de calor para geração de sementes de gelo, recipiente de

cristalização, torre de lavagem para separar os cristais de gelo do concentrado) e, por esse motivo, torna-se caro e de uso limitado.

Aider, Halleux e Melnikova (2009a) mencionam ainda que o segundo método (concentração progressiva), também envolve congelamento parcial da água e separação da fração de gelo. No entanto, forma-se um único cristal sobre a superfície de resfriamento, o qual é facilmente removido, resultando num consumo energético consideravelmente inferior ao anterior (suspensão).

Na criocentralização em bloco a solução alimentar é completamente congelada, com posterior descongelamento parcial do bloco congelado, obtendo-se uma fração concentrada de alimento (solução mãe) e outra com um conteúdo mínimo de matéria seca (fração de gelo) (AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2009a; AIDER; OUNIS, 2012). Neste processo, o bloco de gelo sólido atua como uma carcaça sólida através da qual a solução concentrada passa (PETZOLD et al., 2015).

Por utilizarem baixas temperaturas, nestes processos não ocorrem as alterações provocadas pelo calor (HARTEL; ESPINEL, 1993). Sendo assim, a criocentralização protege as vitaminas, proteínas e compostos bioativos do alimento (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; OUNIS, 2012), resultando na obtenção de produtos com qualidade nutricional e biológica preservada (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2009a).

Estudos relatam que criocentralização tem obtido grande êxito na concentração de sucos, vinho, cerveja, extratos de café e chá, laticínios (HARTEL; ESPINEL, 1993; CHANG; HARTEL, 1997; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2008, 2009 a,b; SÁNCHEZ et al., 2011a,b; AIDER; OUNIS, 2012; PETZOLD, et al., 2015). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos relativos à criocentralização em leite humano. Porém, cabe destacar os estudos relativos ao emprego desta técnica em leite de vaca, conduzidos por Best e Vasavada (1993), e por Aider e Ounis (2012), conforme abaixo:

- Best e Vasavada (1993), utilizando concentração de suspensão, obtiveram um teor de sólidos atingindo 40% no leite desnatado e 44% no leite integral.
- Aider e Ounis (2012), ao concentrar leite desnatado por meio de criocentralização em blocos, obtiveram um leite com teor de matéria seca total de 43,72%, após 4 estágios de

crioconcentração. O teor de proteínas totais foi concentrado até 22,49% no quarto estágio e a lactose atingiu 9,01% no terceiro estágio.

As propriedades nutritivas do leite humano poderiam ser aumentadas por meio da adição das fases obtidas na crioconcentração, visto que esta particularidade é atribuída ao emprego de baixas temperaturas, preservando seus componentes de processos de degradação e dessa forma atender às necessidades especiais de RNs pré termo. Entretanto, Aider e Halleux (2009) e Chabarov e Aider (2014) referem que para melhorar a eficiência do processo, é primordial conhecer o impacto do comportamento de matérias primas (no caso do presente estudo, o leite humano), a serem submetidas a este processo classificado como emergente. Sendo assim, seria possível determinar as condições futuras necessárias para o seu emprego, inclusive em bancos de leites humano.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K.M.; GANU, R.; PETROSINO, J.; VERSALOVIC, J. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v.6, p.237ra65, 2014.

AHRABI, A.F., SCHANLER, R.J. Human milk is the only milk for premies in the NICU! **Early Human Development**, v.89, p.S51-S53, 2013.

AIDER, M., OUNIS, W.B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.195–202, 2012.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Gravitational and microwave-assisted thawing during milk whey cryoconcentration. **Journal of Food Engineering**, v.88, p.373–380, 2008.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim milk whey

cryoconcentration and impact on the composition of the concentrated and ice fractions. **Food Bioprocess Technology**, v.2, p.80-88, 2009a.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim acidic milk whey ocyroconcentration and assessment of its functional properties: impact of processing conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.334–341, 2009b.

ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F.R.; ALMEIDA, C.H.G.; CHAVES, R.M.M.; ARAUJO, F.M.S.; GARRIDO, J.R.P. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 2. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999.

ALMEIDA, S. D. S. **Contagem celular somática, bacteriana total e composição do leite humano**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington, 2001.

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135 -143, 2006.

ARSLANOGLU, S.; ZIEGLER, E.E.; MORO, G.E.; WAPM Working Group on Nutrition. Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 38, p. 347-351, 2010.

BARO, C.; GIRIBALDI, M.; ARSLANOGLU, S.; GIUFFRIDA, M.G.; DELLAVALLE, G.; CONTI, A.; TONETTO, P.; BIASINI, A.; COSCIA, A.; FABRIS, C.; MORO, G.E.; CAVALLARIN, L.; BERTINO, E. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 818-829, 2011.

BARROS, M. D.; YAMASHIRO, E.; BARRETO, O.; SAMPAIO, M. M. S. C. Características do leite de mães de recém-nascidos de baixo peso. **Pediatria**, v. 6, n. 2, p. 53-57, 1984.

BEIJERS, R. J. W.; SCHAAFSMA, A. Long-chain polyunsaturated fatty acid content in dutch preterm breast milk; differences in the concentrations of docosahexaenoic acid and arachidonic acid due to length of gestation. **Early Human Development**, v. 44, p. 215-223, 1996.

BELÉN, F.; SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J.M.; RAVENTÓS, M. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 364-373, 2012.

BELURY, M.A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 501-531, 2002.

BERTAGNON, J. R. D.; SEGRE, C. A. M. Terminologia técnica. In: SEGRE, C. A. M. **Perinatologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 315-319.

BERTINO, E.; COPPA, G.V.; GIULIANI, F.; COSCIA, A.; GABRIELLI, O.; SABATINO, G.; SGARRELLA, M. TESTA, T.; ZAMPINI, L.; FABRIS, C. Effects of holder pasteurization on human milk oligosaccharides. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 381-385, 2008.

BERTINO, E.; GIULIANI, F.; OCCHI, L.; COSCIA, A.; TONETTO, P.; MARCHINO, F.; FABRIS, C. Benefits of donor human milk for preterm infants: current evidence. **Early human development**, v. 85, S9-S10, 2009.

BEST, D.E., VASAVADA, K.C. Freeze concentration of dairy products phase 2. **Final report. Dairy Research Foundation**, Elk Grove Village, IL., 1993.

BINOTI, M.L.; RAMOS, A.M. Conservação de alimentos: uma visão mais saudável. **HU revista**, v. 41, p. 171-179, 2015.

BOERSMA, E. R.; OFFRINGA, P. J.; MUSKIET, F.A.J.; CHASE, W.M.; SIMMONS, I. J. Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 1197-1204, 1991.

BORGO, L. A. **Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

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

BRASIL. Portaria nº 322, de 26 de maio de 1988. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=273>>. Acesso em: 10 out.2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno. **Manejo e promoção do aleitamento materno: curso de 18 horas para equipes de maternidades**. Brasília, 2003. 155 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 set. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: fundamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília, 2008. 156 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Brasília, 2012. 326 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança : aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília, 2015. 184 p.

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

CALIL, V.M.L.T; VAZ, F.A.C. Composição bioquímica do leite humano. In: ISSLER, H. **Aleitamento materno no contexto atual: políticas, prática e bases científicas**. São Paulo: Sarvier, 2008. p. 177-190.

CALVANO, L. M. O poder imunológico do leite materno. In: **Amamentação: bases científicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.57-65.

CAMELO JÚNIOR., J. S.; HECK, A. R. Nutrição do recém-nascido a termo – apologia da amamentação. In: MONTEIRO, J. P.; CAMELO JR., J. **Caminhos da nutrição e terapia nutricional: da concepção à adolescência**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p.109-131.

CARMO, M.G.T.; COLARES, L.G.T.; SAUNDERS, C. Nutrição na lactação. In: ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C. LACERDA E.M.A. (Ed.) **Nutrição em obstetrícia e pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2004. p. 225-246.

CENI, G., SILVA, M.F., VALÉRIO JR., C., CANSIANA, R.L., OLIVEIRA, J.V., ROSA, C.D.; MAZUTI, M.A. Continuous inactivation of phosphatase and *Escherichia coli* in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. **Journal of CO₂ Utilization**, v.13, p.24-28, 2016.

CHABAROV, A.; AIDER, M. Mathematical modeling and experimental validation of the mass transfer during unidirectional progressive cryoconcentration of skim Milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.21, p.151-159, 2014.

CHANG, Y.H.; HARTEL, R.W. Flow properties of freeze- concentrated skim milk. **Journal of Food Engineering**, v.31, n.3, p.375–386, 1997.

CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; LEE, S. H.; GO, G. W.; SHIN, H. G.; KIM, K. H.; RHEE, M. S.; KIM, B. C. Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine longissimus dorsi muscle. **LWT**, v. 41, p. 317-322, 2008.

CHULEI, R.; XIAOFANG, L.; HONGSHENG, M.; XIULAN, M.; GUIZHENG, L.; GIANHONG, D.; DEFRANCESCO, C. A.;

CONNOR, W. E. Milk composition in women from five different regions of China: the great diversity of milk fatty acids. **Journal of Nutrition**, v.125, n. 12, p. 2993-2998, 1995.

COOPER A. I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. **Journal Materials Chemistry**, v. 10, p. 207 – 234, 2000.

COSTA, M. C. de; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 187-210, 1999.

COSTA, R.S.S.; CARMO, M.G.T.; SAUNDERS, C.; JESUS, E.F.O.; LOPES, R.T.; SIMABUCO, S.M. Characterization of iron, copper and zinc levels in the colostrum of mothers of term and pre-term infants before and after pasteurization. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 114-117, 2003.

CRISTOFALO, E.A., SCHANLER, R.J., BLANCO, C.L., SULLIVAN, S., TRAWOEGER, R., Randomized Trial of Exclusive Human Milk versus Preterm Formula Diets in Extremely Premature Infants. **Journal of Pediatrics**, v. 163, p. 1592-1595, 2013.

DAMAR, S.; BALABAN, M. O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. R1-R11, 2006.

DARR, J. A.; POLIAKOFF, M. New Directions in Inorganic and Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids. **Chemical Review**, v. 99, p. 495 – 541, 1999.

DE MATOS, K.H.O. **Inativação microbiana em ostras (*crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2013. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

ERKMEN, O. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on staphylococcus aureus in broth and milk. **{LWT} - Food Science and Technology**, v. 30, n. 8, p. 826-829, 1997.

ERKMEN, O. Effects of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 131-135, 2001.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J.M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v.69, p.1-10, 2013.

FIDLER, N.; KOLETZKO, B. The fatty acid composition of human colostrum. **European Journal of Nutrition**, v. 39, p. 31-37, 2000.

FIDLER, N.; SALOBIR, K.; STIBILIJ, V. Fatty acid composition of human colostrum in Slovenian women living in urban and rural areas. **Biology of the Neonate**, v. 79, p. 15-20, 2001.

FITZSTEVENS, J.L.; KELSEY, C.S.; SMITH, M.A.; HAGADORA, J.I. Systematic review of the human milk microbiota. *Nutrition in Clinical Practice*, v.XX, n. X, 201X.

FORD, J.E.; LAW, B.A.; MARSHALL, V.M.E.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **The Journal of Pediatrics**, v. 90, n. 1, p. 29-35, 1997.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A. H.; SPILIMBERGO S.; ELST, K.; VAN GINNEKEN, L.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHIERE, F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, v 117, p 1-28, 2007.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano**. [2014?]. Disponível em:
<http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>.
Acesso em: 10 set. 2014.

GENZEL-BOROVICZEÂNY, O.; WAHLE, J.; KOLETZKO, B. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and

preterm delivery. **European Journal of Pediatrics**, v. 156, p. 142-147, 1997.

GRANCE, T.R.S., SERAFIN, P.O., DÉBORA MARCHETTI CHAVES THOMAZ, D.M.C., PALHARES, D.B. Aditivo homólogo para a alimenta ção do recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. **Revista Paulista de Pediatria**, v.33, n.1, p. 28-33, 2015.

HARTEL, R.W., ESPINEL, L.A. Freeze concentration of skim milk. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.101-120, 1993.

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

IMIANOVSKY, U. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em leite materno proveniente de banco de leite**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711 p.

JENSEN, R. G. Lipids in human milk. **Lipids**, Champaign, v. 34, 1243-1271, 1999.

JEURINK, P.V.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; JIMÉNEZ, E.; KNIPPELS, L.M.J.; FERNÁNDEZ, L.; GARSSSEN, J.; KNOL, J.; RODRÍGUEZ, J.M.; MARTÍN, R. Human milk: a source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v.4, p.17–30, 2013.

KOENIG, A.; DINIZ, E.M.A.; BARBOSA, S.F.C.; VAZ, F.A.C. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. **Journal of Human Lactation**, v.21, n. 4, p. 439-443, 2005.

KOVÁCS, A. et al. Fatty acids in early human milk after preterm and full-term delivery. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 41, p. 454-459, 2005.

KOLETZKO, B.; MROTZEK, M.; BREMER, H. J. Fatty acid

composition of mature human milk in Germany. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, p. 954-959, 1988.

LAURINDO, V. M.; CALIL, T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. III – Condições que alteram a composição nutricional do leite humano. **Pediatria** São Paulo. 1991. Disponível em: <<http://WWW.pediatrriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/83.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2008.

LAWRENCE, R. A. **La lactancia materna**. 4.ed. Madrid: Mosby, 1996. 892 p.

LEISTNER, L.; GORRIS, L. G. M. Food preservation by hurdle technology. **trends in Food science and technology**, v. 6, n. 2, p. 41-46, 1995.

LEPRI, L.; DEL BUBBA, M.; MAGGINI, R.; DONZELLI, G.P.; GALVAN, P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 1-10, 1997.

LESSA, N.M.V. **Incorporação de ácidos graxos *trans* e seus efeitos em diferentes fases do crescimento de ratos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

LIAO, H.; ZHONG, K.; LIAO, X.; CHEN, F.; HU, X. Inactivation of natural microorganisms naturally present in raw bovine milk by high-pressure. **International Journal of Food Science and Microbiology**, v. 49, p. 696-702, 2014.

LIMA, M. F.; HENRIQUES, C. A.; SANTOS, F. D.; ANDRADE, P. M. M.; TAVARES DO CARMO, M. G. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA:C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados à sua essencialidade e suplementação. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 28, p. 65-77, 2004.

LIPPI, U. G.; CASANOVA, L. D.; PATRIOTA, R. G.; BARRAGAN, A. M.; SILVA, E. Y. K. Prematuridade. In: SEGRE, C. A. M. Perinatologia: fundamentos e prática. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 226-232.

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

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; CAMPOY-FOLGOSO, C.; RIVERO-URGELL, M.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A. I. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 1242-1254, 2002.

LUCAS, A.; LUCAS, P.J.; CHAVIN, S.I.; LYSTER, L.R.J.; BAUM, J.D. A human milk formula. **Early Human Development**, v. 4, n. 1, p. 15-21, 1980.

LUNN, J. Monounsaturates in the diet. **Nutrition Bulletin**, v. 32, n.4, p. 378-391, 2007.

MAIA, P.R.S.; ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F.R.; SILVA, D.A. Rede nacional de bancos de leite humano: gênese e evolução. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n.3, p. 285-292, 2006.

MASTERS, M. et al. Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. **Lipids**, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2002.

MORITA, R.Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.39, p.144 – 167, 1975.

MOURA, E. C. Nutrição. In: CARVALHO, M. R. DE; TAMEZ, R. N. Amamentação: bases científicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.26-56.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C.; PERMANYER, M.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. **Food Chemistry**, v. 124, p. 697–702, 2011.

MOUTSIOULIS, A. A.; MURRIETA, C.M.; BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L.; BARBANO, D.M.; CAREY, G.B. Human breast milk enrichment in conjugated linoleic acid after consumption of a conjugated linoleic acid-rich food product: a pilot study. **Nutrition research**, v. 28, p. 437-442, 2008.

MUELLER, A.; THIJS, C.; SIMÕES-WÜST, A.P.; HUBER, M.; STEINHART, H. Trans fatty acids in human milk are an indicator of different maternal dietary sources containing trans fatty acids. **Lipids**, v. 45, p. 245-251, 2010.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. **Jornal de pediatria**, v. 80, n.5, p. 163S-172S, 2004.

NAYAK, S. Understanding Cow`s Milk Protein Allergy. **Pediatric Oncall Journal**, v.12, n.3, p. 60-66, 2015.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1999.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n.3, p. 193-196, 2002.

NOVAK, F.R.; JUNQUEIRA, A.R.; DIAS, M.S.P.; ALMEIDA, J.A.G. Análise sensorial do leite humano ordenhado e sua carga microbiana. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n.2, p. 181-184, 2008.

PEREZ, P.F.; DORÉ, J.; LECLERC M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P.,;SEGURA- ROGGERO, I.; SCHIFFRIN, E.J.; DONNET-HUGHES, A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p.724–32, 2007.

PETZOLD, G., MORENO, J., LASTRA, P., ROJAS, K. ORELLANA, P. Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. **Innovative Food Science Emerging**

Technologies, v.30, p.192-197, 2015.

RAMÍREZ-CORRÍA, V. D. A.. Deficiência de ácidos grasos esenciales em el feto y em el recién nacido pretérmino. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 73, n. 1, p. 43-50, 2001.

RIST, L.; MUELLER, A.; BARTHEL, C.; SNIJDERS, B.; JANSEN, M.; SIMÕES-WÜST, A.P.; HUBER, M.; KUMMELING, I.; VON MANDACH, U.; STEINHART, H.; THJIS, C. Influence of organic diet on the amount of conjugated linoleic acids in breast milk of lactating women in the netherlands. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 735-743, 2007.

RODRÍGUEZ, J.M. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 5, p. 779-784, 2014.

ROMEU-NADAL, M.; CASTELLOTE, A.I.; GAYA, A. LOPEZ-SABATER, M. C. Effect of pasteurization on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. **Food Chemistry**, v. 107, p. 434-438, 2008.

ROZOLEN, C.D.A.C.; GOULART, A.L.; KOPELMAN, B.I. Is Breast Milk Collected at Home Suitable for Raw Consumption by Neonates in Brazilian Public Neonatal Intensive Care Units? *Journal of Human Lactation*, v. 22, n. 4, p. 418-425, 2006.

SALA-VILA, A.; CASTELLOTE, A. I.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; CAMPOY, C.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation. **Nutrition**, v. 21, p. 467-473, 2005.

SÁNCHEZ, J., HERNÁNDEZ, E., AULEDA, J.M., RAVENTÓS, M. Review: Freeze Concentration Technology Applied to Dairy Products. **Food Science and Technology International**, v.17, n.1, p.05-09, 2011a.

SÁNCHEZ, J., HERNÁNDEZ, E., AULEDA, J.M., RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.147-155,

2011b.

SANTOS, M.M., MARTINEZ, F.E., SIEBER, V.M., PINHATA, M.M.M., FELIN, M.L.S. Acceptability and growth of VLBW-infants fed with own mother's milk enriched with a natural or commercial human milk fortifier (HMF) † 1370. **Pediatric Research**, v. 41, p. 231-231, 1997.

SCHANLER, R.J. Em tempo: leite humano é a estratégia alimentar para prevenir a enterocolite necrosante. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n.2, p. 131-133, 2015.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA JR., P. F.; SOARES, E.A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2007.

SILVA, F. F. **Qualidade do leite materna em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminos bioativas**. 2008. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

SILVA, M. H. L.; SILVA, M.T.C.; BRANDÃO; S.C.C.; GOMES, J.C.; PETERNELLI, L.A.; FRANCESCHINI, S,C.C. **Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women**. *Food Chemistry*, v. 93, p. 297-303, 2005.

SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A.; QUINTAL, V. S.; IBIDI, S. M.; ALBUQUERQUER, E. M. **Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura**. *Química nova*, v. 30, n.7, p. 1535-1538, 2007.

SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JAREN, E.; ROMERO, F.J. **Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization**. *Acta Paediatrica*, v. 97, p. 1070-1074, 2008.

SOARES, D. **Inativação de *Listeria monocytogenes* empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2012.

SPLIMBERGO, S.; BERTUCCO, A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO₂. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 627–638, 2003.

SULLIVAN, S., RICHARD J. SCHANLER, R.J., KIM, J.H., PATEL, A.L., TRAWÖGER, R., KIECHL- KOHLENDORFER, U., CHAN, G.M., BLANCO, C.L., ABRAMS, S., COTTEN, M., LARROIA, N., EHRENKRANZ, R.A., DUDELL, G., CRISTOFALO, E.A., MEIER, P., LEE, M.L., RECHTMAN, D.J., LUCAS, A. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. **The Journal of Pediatrics**, v.156, p. 562-567, 2010.

THOMAZ, D.M.C., SERAFIM, P.O., DURVAL B. PALHARES, D.B., MELNIKOV, P., VENHOFEN, L., VARGAS, M.O.F. Comparação entre suplementos homólogos do leite humano e um suplemento comercial para recém-nascidos de muito baixo peso. **Jornal de Pediatria**, v.88, n.2, p. 119-124, 2012.

TINOCO, S. M. B.; SICHIERI, R.; MOURA, A. S.; SANTOS, F. S.; DO CARMO, M. G. T. **Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal**. Cadernos de Saúde Pública, v. 23, n. 3, p. 525-534, 2007.

UNDERWOOD, M.A. Human milk for the premature infant. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n.1, p. 189-207, 2013.

VALDÉS, V.; SÁNCHEZ, A. P.; LABBOK, M. **Manejo clínico da lactação: assistência à nutriz e ao lactente**. Rio de Janeiro: Revinter, 1996. 128 p.

VIANNA, S. O.; COUTINHO, C. M.; VAZ, R. S.; BOMPEIXE, E. P.; BORGONOVO, T. **Colostro: importância do aleitamento materno para o desenvolvimento do sistema imune do neonato**. Curitiba, 2005. Disponível em:

<http://imap.curitiba.pr.gov.br/files/imap/downloads/INTEGRA%20PDF/42T_05_COMPL.pdf> Acesso em 18 novembro 2008.

VIECZOREK, A.L. **Avaliação dos bancos de leite humano do estado do Paraná**. 2010. (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

VOIGHT, R. G.; JENSEN, C. L.; FRALEY, J.K.; ROZELLE, J.C.; BROWN III, F.R.; HEIRD, W. C. Relationship between ω 3 long-chain polyunsaturated fatty acids during early infancy and neurodevelopmental status at 1 year of age. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 15, p.111-120, 2002.

WERNER, B.G.; HOTCHKISS, J.H. Continuous flow nonthermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 872-881, 2006.

WHIGHAM, L. D.; COOK, M. E.; ATKINSON, R. L. Conjugated linoleic acid: implications for human health. **Pharmacological research**, v. 42, n.6, p. 503-510, 2000.

WORTHINGTON-ROBERTS, B. S. Lactação e leite humano: considerações nutricionais. In: WORTHINGTON-ROBERTS, B. S.; VERMEERSCH, J.; WILLIAMS, S. R. **Nutrição na gravidez e na lactação**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. p.187-240.

YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p. 125–137, 2007.

ZHANG, J.; DAVIS, T. A.; MATTHEWS, M. A.; DREWS, M. J.; LABERGE, M.; AN, Y. H. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 354-372, 2006.

CAPÍTULO 2

2.1 EFFECT OF HIGH-PRESSURE CARBON DIOXIDE PROCESSING ON THE INACTIVATION OF AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA AND ESCHERICHIA COLI IN HUMAN MILK*

* Artigo submetido para publicação na revista CyTA – Journal of Food (comprovante de submissão - anexo 2)

Effect of high-pressure carbon dioxide processing on the inactivation of aerobic mesophilic bacteria and *Escherichia coli* in human milk

Efecto del procesamiento de dióxido de carbono a alta presión sobre la inactivación de bacterias aeróbicas mesófilas y *Escherichia coli* en la leche humana

Abstract

In this study the effect of high-pressure carbon dioxide processing on inactivation of aerobic mesophilic bacteria and *Escherichia coli* ATCC 25922 inoculated in human milk was evaluated. The effect of the ratio between sample mass and CO₂ (1:0.2; 1:0.6 and 1:1 m/m); depressurization rate (1, 5.5 and 10 MPa/min), and pressure cycling (1, 3 and 5) were the process variables studied. The best reductions in aerobic mesophilic bacteria as well as in *E. coli* (6.0 and 5.7 log, respectively) were obtained with a ratio of 1:1, a depressurization rate of 10 MPa/min, and 1 cycle of pressurization/depressurization. The depressurization rate was found to be an important variable in the inactivation process. The results achieved in this study suggest that high-pressure carbon dioxide processing can be applied to human milk as a safe alternative to the pasteurization employed in human milk banks.

Keywords: human milk. high-pressure carbon dioxide. *Escherichia coli*. aerobic mesophilic bacteria. microbial inactivation.

2.2 INTRODUCTION

It has been well established that human milk provides all the nutrients and immune factors necessary for the growth and development of newborns and babies (Ballard & Morrow, 2013; Souza, Delgadillo, & Saraiva, 2016). In normal situations, shortly after birth, newborns are fed directly from their mother's breasts. However, many infants are fed with milk from human milk banks because sometimes preterm newborns do not have enough strength to suckle. In addition, some mothers show physiological and/or emotional problems, resulting in the reduction of milk production (Serafini et al., 2003). In this case the excess production milk from lactating women donate must have microbiological, chemical, nutritional, immunologic, sensory and structural quality assured (Almeida, 2008).

In order to ensure the quality of human milk the pasteurization process is used to eliminate the contaminating microorganisms, such as *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., yeasts and molds, and *Enterobacteriaceae* (Serafini et al., 2003). Masiello, Martin, Trmčić, Wiedmann and Boo (2016) reported that the presence of coliform bacteria in pasteurized human milk mostly indicated contamination due to pasteurization failure.

Fecal coliform bacteria detection is sequential and dependent on positive results for total coliforms, thus indicating with greater presence of enteric pathogens. Among the microorganisms isolated in the fecal coliform test, *Escherichia coli* is the one that is most frequently detected, thus becoming the classic indicator of the possible presence of enteric pathogens in food, particularly in human milk (Novak & Almeida, 2002)

Novak, Almeida, Asensi, Moraes and Rodrigues (2001) reported that infections that occur during the first year of life constitute one of the most important causes of elevated morbidity and mortality rates among infants. The frequency and severity of infections caused by *E. coli*, are influenced by the immaturity of the immune system observed for this age group. Therefore, human milk is required to undergo a strict quality control process conducted throughout the collection, processing, and distribution of the product in order to ensure its safety and quality (Brazil, 2008). However, de Oliveira et al. (2016) state that the low temperature long time (LTLT) pasteurization (62.5 °C / 30 min), usually applied in Human Milk Banks (HMB), modifies biological quality and microstructure of the human milk.

The high-pressure carbon dioxide (CO₂) processing is an emerging technology and has been studied as a promising alternative for the

reduction of microorganisms in liquid whole egg (Garcia-Gonzalez et al., 2009), hami melon juice (Chen et al., 2010), milk (Ceni et al., 2016), apple juice (Porebska, Sokołowska, Skapska, & Rzoska, 2017), and mozzarella-type cheese (Sikin, Walkling-Ribeiro, & Risvi, 2016). CO₂ is a low-cost inert, non-toxic and non-flammable gas and it has high density, low viscosity, it is available having high purity, it does not generate waste, it does not create any environmental problems, and also it can be used at temperatures below 50 °C (Choi, Bae, Kim, Kim, & Rhee, 2009; Zhang et al., 2006). To our knowledge, the use of this technology to ensure the safety and microbiological quality of human milk has not been reported in the literature. In this study the impact of high-pressure carbon dioxide processing on the microbial inactivation of aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* ATCC 25922 inoculated in human milk was determined. Also, the effects of process variables, such as the ratio of CO₂ to sample mass ratio, depressurization rate, and the number of compression/decompression cycles was investigated.

2.3 EXPERIMENTAL

2.3.1 Selection of voluntary lactating donors

Eight human milk donors, aged of 21-33 years were invited to participate in the study when they sought the CIAM (Center for Breastfeeding Encouragement) at the Maternity Ward of the University Hospital at Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil) to relieve breast engorgement. The volunteers received clarification on the purpose of the research and signed an informed written consent. The research project was submitted to the Ethics Committee for Research with Human Beings at UFSC. It was approved on January 11, 2016 and was registered under number 1.386.799.

2.3.2 Samples

The human milk samples were collected manually into sterilized glass jars, following the hygiene guidelines outlined in the Operating Manual for Human Milk Bank (HMB) (Brazil, 2008) and subsequently grouped to create a pool of human milk. After collection, the samples were immediately frozen and stored in a freezer at -20 °C until the time of the analyses, which were conducted within a maximum period of 15 days. For the processing procedures and the analysis of the human milk,

the transportation of the samples to the laboratories was made in coolers containing recyclable ice.

2.3.3 Inoculum preparation

A surrogate *E. coli* ATCC 25922 stock culture was maintained on Brain–Heart Infusion (BHI) (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) slants at 4°C. The culture for experiment was subcultured twice in Nutrient broth (NB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) incubated at 35°C for 18 h until reach the concentration of 10^8 CFU/mL.

2.3.4 Contamination of the milk samples

The thawed milk samples were vigorously mixed and divided into 2 portions. The first portion (10 mL) was inoculated at a concentration of 8 log CFU/mL of *E. coli* culture, which reaches 6 log CFU/mL of *E. coli* in the human milk samples. The initial aerobic mesophilic bacteria count was equal to 1.0×10^7 CFU/mL. The second portion (control sample) was not contaminated and it was used for calculating the difference of the artificial contamination compared to the natural contamination of the milk.

2.3.5 Microbiological analyses

The determination of aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* was performed before and after each inactivation experiments using Petrifilm® plates (Aerobic Count Plate - AC, and *E. coli*/Coliform Count Plate - EC, respectively), according to Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 2002). Replicate counts were expressed as averaged log CFU/mL. In order to confirm the concentration of the inoculum, decimal dilutions of the *E.coli* suspension were carried out and then were plated in Petrifilm® EC and incubated at 35 °C for 48 h.

2.3.6 Experimental design and apparatus

Table 2.1 shows the central composite design (CCD) used to evaluate the effects of the ratio between sample mass and CO₂ (1:0.2; 1:0.6 and 1:1 m/m), pressure cycling (1, 3 and 5) and depressurization rate (1, 5.5 and 10 MPa/min), on the total count of viable aerobic mesophilic bacteria and *E. coli*.

Table 2. 1 Factors and their respective levels of the experimental design.

Tabla 2.1. Factores y sus respectivos niveles del diseño experimental.

Variables	Levels		
	-1	0	1
Ratio m/m (human milk/CO ₂)	1:0.2	1:0.6	1:1
Pressure cycles	1	3	5
Depressurization rate (R) (MPa/m)	1.0	5.5	10.0

The initial working pressure was 8 MPa, at this point the system was kept for a short period to allow stabilization of the system, and then the pressure was increased to 20 MPa (rate of 10 MPa/min), and kept constant up to experiment completion. After the procedure, the system pressure was reduced to 8 MPa at the rate of depressurization pre-established by the experimental design, which also established the number of pressure cycles of each experiment. At the end of this process the pressure was manually reduced from 8MPa to atmosphere pressure. For all experiments the time was set at 120 minutes and the temperature maintained at 33 °C.

A static-synthetic method was used in a variable volume high pressure cell to perform the inactivation experiments. This method was previously described by Soares, Lerin, Cansian, Oliveira and Mazutti (2013). Figure 2.1 shows an overall view of the apparatus which was used. The experimental set-up, briefly, consisted of: a variable-volume view cell (maximum internal volume = 27 mL); two sapphire windows for visual observation; an absolute pressure transducer (Smar LD 301), with a precision around 0.03 MPa; a portable programmer (Smar, HT 201) for the pressure data acquisition; and a syringe pump (ISCO 260D). The inactivation cell contained a movable piston, which allowed to control the pressure inside the cell (Figures 2.2a and b). The cell was surrounded by a metal jacket and the temperature was maintained using a thermostatic bath, with water as the heating/cooling fluid. At the beginning of the experiment the inactivation cell was loaded with a certain amount of sample mass (human milk) by means of a sterile syringe at atmosphere pressure. A syringe pump, with resulting precision of 0.005 g in CO₂ loads, helped to load CO₂.

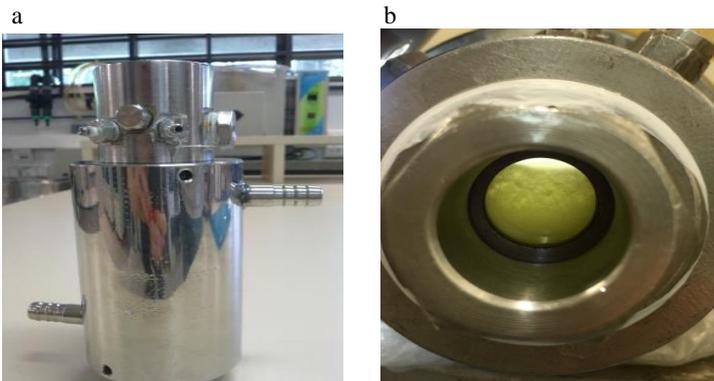
Figure 2. 1. Experimental apparatus for human milk processing with supercritical carbon dioxide.

Figura 2. 1. Aparato experimental para el procesamiento de la leche humana con dióxido de carbono supercrítico.



Figure 2. 2. (a) Variable volume equilibrium cell of the experimental apparatus for human milk processing with supercritical carbon dioxide (b) a front view of the cell.

Figura 2. 2. (a) Célula de equilibrio de volumen variable del aparato experimental para el procesamiento de la leche humana con dióxido de carbono supercrítico (b) una vista frontal de la célula.



2.3.7 Statistical analysis

All the results were analyzed using Statistica® 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) considering a significance level of 95% ($P < 0.05$). Pareto chart was used to better evaluate the effects of each factor, considering a significance level of 95% ($P < 0.05$).

2.4 . RESULTS AND DISCUSSION

Table 2.2 shows the effect of the high-pressure carbon dioxide processing on the microbial inactivation and it can be observed a decrease in both aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* ATCC 25922 after applying the pressurized carbon dioxide using different process conditions.

Table 2. 2. Total count of viable aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* ATCC 25922 in human milk after high-pressure carbon dioxide processing using different process conditions.

Tabla 2. 2. Conteo total de bacterias mesófilas aerobias viables y *E. coli* ATCC 25922 en la leche humana después del procesamiento de alta presión de dióxido de carbono usando diferentes condiciones del proceso.

R	M:CO ₂ (wt%)	PC	R (MPa/min)	Nº of surviving AMB (CFU/mL)	AMB log- reduction (CFU/mL)	Nº of surviving <i>E.</i> <i>coli</i> (CFU/mL)	<i>E. coli</i> log- reduction (CFU/mL)
1	-1 (0.2)	-1 (1)	-1 (1)	1.1 x 10 ⁶	-1.0	7.0 x 10 ⁴	-1.3
2	1(1.0)	-1(1)	-1(1)	2.8 x 10 ⁴	-2.8	3.7 x 10 ³	-2.7
3	-1(0.2)	1(5)	-1(1)	6.4 x 10 ⁵	-1.0	2.6 x 10 ⁴	-1.7
4	1(1.0)	1(5)	-1(1)	1.0 x 10 ⁵	-2.2	1.4 x 10 ⁴	-2.0
5	-1(0.2)	-1(1)	1(10)	1.0 x 10 ²	-5.5	1.0 x 10 ²	-4.8
6	1(1.0)	-1(1)	1(10)	4.5 x 10 ¹	-6.0	1.0 x 10 ¹	-5.7
7	-1(0.2)	1(5)	1(10)	2.5 x 10 ¹	-6.1	1.0 x 10 ¹	-5.7
8	1(1.0)	1(5)	1(10)	4.1 x 10 ³	-3.6	2.6 x 10 ³	-3.7
9	0 (0.6)	0(3)	0(5.5)	6.1 x 10 ⁴	-3.0	8.8 x 10 ³	-2.8
10	0(0.6)	0(3)	0(5.5)	1.6 x 10 ⁴	-2.8	6.8 x 10 ²	-3.1
11	0(0.6)	0(3)	0(5.5)	1.5 x 10 ⁴	-2.8	2.0 x 10 ³	-2.7

Legend: R: Run. M: Milk. PC: Pressure cycle. AMB: Aerobic Mesophilic Bacteria.

The best results were obtained in experiments 5, 6, 7 and 8, with

log reductions ranging from 3.6 to 6.1 in relation to mesophilic bacteria, and from 3.7 to 5.7 in relation to *E. coli*. The greatest aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* reductions were observed for the depressurization rate of 10 MPa/min thus suggesting that an increase in depressurization rate favors the inactivation of *E. coli* in human milk. Experiments 7 and 8 showed that the number of cycles had a positive effect only when associated with a higher depressurization rate, for both aerobic mesophilic bacteria and *E. coli*. Silva et al. (2013) using supercritical carbon dioxide reported that the depressurization rate caused a positive effect on inactivation of *E. coli* in broth and the number of cycles was an important factor in the inactivation. However, the number of cycles was associated with a longer time of experiment, leading to a complete inactivation in exposure times of over 120 min. On the other hand, higher depressurization rates were associated with short times experiments. In the present study, the experimental time was set to 120 min. In this way it was possible to observe more effectively the effect of the time in relation to the depressurization rate on microbial inactivation in comparison with the behavior noted by Silva et al. (2013).

Figures 2.3 and 2.4 show the effects of processing variables on the responses using Pareto charts and as can be seen the greater the rate of depressurization, the greater is the inactivation of aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* ATCC 25922 in human milk. The positive effects of a higher depressurization rate were similar when 5 depressurization cycles were applied, as can be noted in experiments 7 and 8 compared to 3 and 4, for both aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* ATCC 25922. The best inactivation rates were obtained in experiments 5 and 6 (5.5 and 6, respectively), where higher depressurization rates (10 MPa/min) were used regardless of the amount of CO₂. The depressurization causes a sudden expansion of CO₂, which has been solubilized within the microbial cells, leading to their rupture and consequent inactivation of microorganisms (Karaman & Erkmen, 2001).

Figure 2. 3. Pareto chart showing the effects of independent variables on aerobic mesophilic bacteria reduction after high-pressure carbon dioxide processing obtained in the central composite design (CCD).

Figura 2. 3. Diagrama de Pareto que muestra los efectos de las variables independientes sobre la reducción de las bacterias aerobias mesófilas después del procesamiento de dióxido de carbono a alta presión obtenida en el diseño compuesto central (DCC).

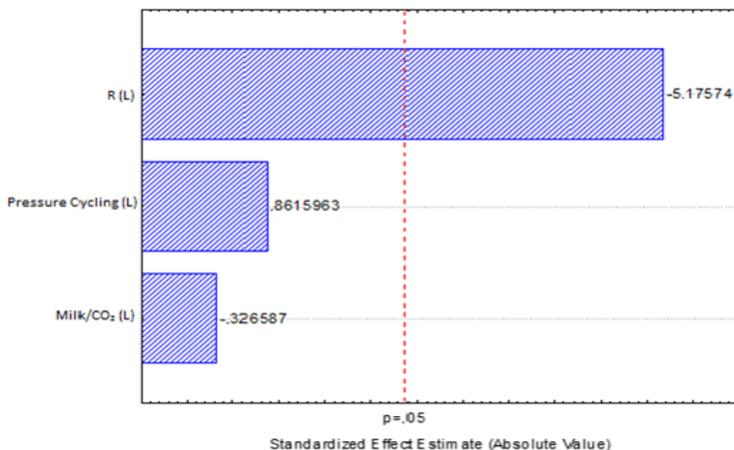
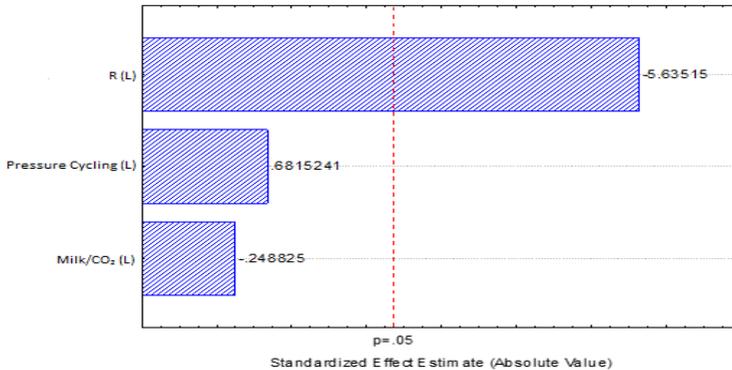


Figure 2. 4. Pareto chart showing the effects of independent variables on microbial survivals after high-pressure carbon dioxide processing of *E. coli* ATCC 25922 obtained in the central composite design (CCD).

Figura 4. Diagrama de Pareto que muestra los efectos de las variables independientes sobre la supervivencia microbiana después del procesamiento de dióxido de carbono a alta presión de *E. coli* ATCC 25922 obtenido en el diseño compuesto central (DCC).



Soares et al. (2013) reported a higher inactivation rate of a culture of *Listeria monocytogenes* using a depressurization rate of 10 MPa/min while de Matos (2013) reported the inactivation of aerobic mesophilic bacteria, *Vibrio* spp. and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using one processing cycle, small amounts of CO₂ (1:0.2) and a low depressurization rate (1 MPa/min). However, when the amount of CO₂ was higher (1:08), the highest inactivation rate occurred at the highest depressurization rate (10 MPa/min).

Erkmen (1997) achieved total inactivation of aerobic bacteria and *Staphylococcus aureus* artificially inoculated in whole cow's milk treated at 14.6 MPa for 5h, and in skimmed milk treated at 9 MPa for 2h, both at 25 °C. The same author evaluated the inactivation of *E. coli* in whole and in skimmed milk, with a reduction of 6.42 and 7.24 log, respectively. In both studies, the milk fat may have increased the resistance to the penetration of CO₂ into the microbial cells. It may also have influenced on the microbial inactivation in the present study since the fat content in human milk range between 3.2 and 3.6 g/mL (Ballard & Morrow, 2013).

Werner and Hotchkiss (2006) evaluated the effects of subcritical and supercritical CO₂ in a continuous flow system on the reduction of naturally occurring psychrotrophic microorganisms and of bacterial

spores and *Pseudomonas fluorescens* that were artificially inoculated in skimmed milk. These authors noted a higher mortality rate when the milk was treated at supercritical CO₂ conditions. For the total microbial population, maximum reductions of 5.36 and 5.02 log were noted for *P. fluorescens*, at 35 °C and 20.7 MPa, and an average reduction of 3.81 and 2.93 log, respectively, at 30 °C, with pressures between 10.3 and 20.7 MPa. Liao, Kui, Xiaojun and Xiaosong (2014) evaluated the inactivation of microorganisms naturally present in raw cow's milk and obtained a maximum decrease of 4.96 log in aerobic bacteria after a period of 70 min of exposure, at 25 MPa and 50 °C. Yeast and mold were completely inactivated after 70 min of exposure, at 40 °C and 25 MPa, or 50 min at 50 °C and 25 MPa. The coliform bacteria were completely inactivated by the treatments at 25 MPa for 20, 30, 50 and 70 min at 50, 40, 30 and 20 °C, respectively.

The inoculum level used in a microbiological challenge depends on whether the objective of the study. In our case, the level was determined to evaluate process lethality and 10⁸ CFU/mL for *E. coli* ATCC 25922 was used to demonstrate the extent of reduction in challenge. *E. coli* ATCC 25922 was chosen since several outbreaks involving this pathogenic organism have been observed in milk and beverages. *E. coli* ATCC 25922 is a surrogate of *E. coli* O157:H7.

In spite of the high contamination level used in the present study, a significant decrease in the microbial count of aerobic mesophilic bacteria and of *E. coli* was observed (Table 2). Ceni et al. (2016) reported a sharp decrease in the microbial count when a residence time of more than 20 min was applied. The greater microbial reduction obtained was a result of high temperature, pressure and exposure time applied. Besides, the amount of pressurized gas, in turns, implies in an increased interaction with the microorganisms, thus being able to promote the inactivation of the existing microbiota (Matos, 2013). Although different parameters were used to evaluate the inactivation of the same microorganism in the present study, it is possible to suggest that the time of treatment (maintained at 120 min) and the pressure (20 MPa) that were applied have a positive effect on microbial inactivation.

2.5. CONCLUSIONS

The best reductions in the counts of both aerobic mesophilic bacteria and *E. coli* were obtained when the following parameters were used: carbon dioxide:sample mass ratio of 1:1, depressurization rate of 10

MPa/min and one pressurization/depressurization cycle. Results obtained in this work indicated that high-pressure carbon dioxide processing is a promising alternative for replacing the current human milk pasteurization process using low temperatures. The depressurization rate was an important variable in the inactivation of *E. coli* in human milk. Studies on high pressure carbon dioxide processing should be conducted towards assessing the effects of even faster depressurization rates and also kinetic inactivation profile, on the natural contamination of human milk as well as on its nutrients, to ensure their safety and quality.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

2.6 REFERENCES

- Almeida, S.D.S. (2008). Somatic cell count, total bacterial and human milk composition (Master thesis). Retrieved from https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Dissertacao2008_Suzy_Darlen.pdf
- Association Official Analytical Chemists International. (2002) *Official methods of analysis*. (17th ed.). Washington, DC: Author.
- Ballard, O. & Morrow, A.L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 49-74. doi: [10.1016/j.pcl.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002)
- BRAZIL. (2008) National Health Surveillance Agency [Brazil], Human milk bank: operation, prevention and control of risks. Brasília, 160 p.
- Ceni, G., Silva, M.F., Valério Jr., C., Cansiana, R.L., Oliveira, J.V., Rosa, C.D. & Mazuti, M.A. (2016). Continuous inactivation of phosphatase and *Escherichia coli* in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. *Journal of CO₂ Utilization*, 13, 24-28. doi: [10.1016/j.jcou.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.11.003)
- Chen, J.I., Zhang, J., Song, L., Jiang, Y., Wu, J. & Hu, X.S. (2010). Changes in microorganism, enzyme, aroma of hami melon (*Cucumis melo L.*) juice treated with dense phase carbon dioxide and stored at

4°C. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11, 623-629. doi: [10.1016/j.ifset.2010.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.05.008)

Choi, Y. M.; Bae, Y. Y.; Kim, K. H.; Kim, B. C. & Rhee, M. S. (2009). Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat science*, 82, 419-424. doi: [10.1016/j.meatsci.2009.02.016](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.016)

Erkmen, O. (1997). Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Staphylococcus aureus* in broth and milk. *{LWT} - Food Science and Technology*, 30, 826-829. doi: [10.1006/fstl.1997.0277](https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0277)

Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J. F. & Devlieghere, F. (2009). Inactivation of naturally occurring microorganisms in liquid whole egg using high pressure carbon dioxide processing as an alternative to heat pasteurization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, 74-82. doi: [10.1016/j.supflu.2009.06.020](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.06.020)

Karaman, H. & Erkmen O. (2001). High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. *Food Microbiology*, 18, 11-16. doi: [10.1006/fmic.2000.0371](https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0371)

Liao, H., Kui, Z., Xiaojun, L. & Xiaosong, H. (2014). Inactivation of microorganisms naturally present in raw bovine milk by high-pressure carbon dioxide. *International Journal Of Food Science and Technology*, 49, 696-702. doi: [10.1111/ijfs.12352](https://doi.org/10.1111/ijfs.12352)

Masiello, S.N., Martin, N.H., Trmčić, A., Wiedmann, M. & Boo, K.J. (2016). Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 99, 130-140. doi: [10.3168/jds.2015-9728](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9728)

de Matos, K.H.O. (2013). *Inativação microbiana em ostras (crassostrea gigas) empregando dióxido de carbono supercrítico* (Doctoral dissertation). Retrieved from <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/106994>

Novak, F.R. & Almeida, J.A.G. (2002). Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. *Jornal de Pediatria*, 78, 193-196. doi: [10.1590/S0021-75572002000300005](https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000300005)

Novak, F.R., Almeida, J.A.G., Asensi, M.A., Moraes, B.A. & Rodrigues, D.P. (2001). Resistência antimicrobiana de coliformes isoladas de leite humano ordenhado. *Cadernos de Saúde Pública*, 17, 713-717. doi: [10.1590/S0102-311X2001000300026](https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000300026)

de Oliveira, S.C., Bourliou, C., Ménard, O., Bellanger, A., Henry, G., Rousseau, F., ... Deglaire, A. (2016). Impact of pasteurization of human milk on preterm newborn *in vitro* digestion: gastrointestinal disintegration, lipolysis and proteolysis. *Food Chemistry*, 211, 171-179. doi: [10.1016/j.foodchem.2016.05.028](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.028)

Porebska, I., Sokołowska, B., Skapska, S. & Rzoska, S.J. (2017). Treatment with hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Food Control*, 73, 24-30. doi: [10.1016/j.foodcont.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.005)

Serafini, A.B., André, M.C.D.P.B, Rodrigues, M.A.V., Kipnis, A., Carvalho, C.O., Campos, M.R.H., ... Jubé, T.F.N. (2003). Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. *Revista de Saúde Pública*, 37, 775-779. doi: [10.1590/S0034-89102003000600013](https://doi.org/10.1590/S0034-89102003000600013)

Sikin, A.M., Walkling-Ribeiro, M. & Risvi, S.S.H. (2016). Synergistic effect of supercritical carbon dioxide and peracetic acid on microbial inactivation in shredded mozzarella-type cheese and its storage stability at ambient temperature. *Food Control*, 70, 174-182. doi: [10.1016/j.foodcont.2016.05.050](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.050)

Silva, J.M., Rigo, A.A., Dalmolin, I.A., Debien, I., Cansian, R.L., Oliveira, J.V. & Mazutti, M.A. (2013). Effect of pressure, depressurization rate and pressure cycling on the inactivation of *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. *Food control*, 29, 76-81. doi: [10.1016/j.foodcont.2012.05.068](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.068)

Soares, D., Lerin, L.A., Cansian, R.L., Oliveira, J.V. & Mazutti, M.A. (2013). Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. *Food control*, 31, 514-518. doi: [10.1016/j.foodcont.2012.11.045](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.045)

Sousa, S.G., Delgadillo, I. & Saraiva, J.A. (2016). Human milk composition and preservation: evaluation of high-pressure processing as a nonthermal pasteurization technology. *Critical Reviews in Food*

Sciences and Nutrition, 56, 1043-1060. doi:
[10.1080/10408398.2012.753402](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.753402)

Werner, B.G. & Hotchkiss, J.H. (2006). Continuous flow nonthermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 872-881. doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72151-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72151-8)

Zhang, J., Davis, T. A., Matthews, M. A., Drews, M. J., Laberge, M. & An, Y. H. (2006). Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38, 354-372. doi:
[10.1016/j.supflu.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.05.005)

CAPÍTULO 3

3.1 THE IMPACT OF THE BLOCK FREEZE CONCENTRATION PROCESS ON HUMAN MILK PROPERTIES INTENDED TO FEEDING NEWBORNS

* Artigo publicado pela revista Food and Nutrition Sciences

DOI: [10.4236/fns.2017.84028](https://doi.org/10.4236/fns.2017.84028)

The impact of the block freeze concentration process on human milk properties intended for feeding newborns

Abstract

Human milk is the ideal nutritional support for premature neonates. Considering the need for aggregating nutritional value to human milk provided to such vulnerable group of infants, human milk was concentrated by the block freeze concentration technique. The effects of freeze concentration on the physicochemical properties, the efficiency of the process, color parameters, and the density and dynamic viscosity of human milk were assessed. The freeze concentration technology was used to successfully concentrate human milk to a factor equal to 180.48% and 72% of total solid retention in the second stage of freeze concentration. The values observed in the concentrates for the biochemical properties showed that the fraction of concentrated fluid human milk of the second stage (C2) presented elevated amounts of carbohydrates, protein and energy. The elevated caloric value observed in the ice fraction of the first stage (I1) refers to the retention of lipids in it. When added to human milk, C2 and I1 may satisfy the special requisites of nutrients and energy to guarantee the growth and development of preterm neonates.

Key words: Freeze Concentration; Human Milk; Human Milk Fortifier; Premature Neonate

3.2 INTRODUCTION

Human milk is the ideal nutritional support for premature neonates and its use is encouraged at the neonatal intensive care units and after the premature baby goes home [1]. However, the mothers of such premature babies are less inclined to begin expressing milk, sustain lactation and provide their milk soon after birth. Thus, it is recommended that milk from human milk banks is used to provide an exclusive and appropriate diet during the first weeks of life of the baby [2]. Nevertheless, human milk donors are usually mothers of full-term babies and the milk produced by them has a composition that differs from the milk of mothers of preterm babies, i.e., usually contain less protein and lipids. Moreover, premature neonates need higher caloric intake as compared to full-term newborns [3].

Halleux et al. [2] and Oliveira et al. [4] reported that preterm newborns are even more vulnerable and immature than full-term

newborns of the same postnatal age, presenting higher gastric pH, lower enzymatic activities, faster gastric emptying, and lower concentrations of electrolytes in their digestive fluids, among other limitations. Grance et al. [5] and Lönnerdal [6] emphasize that one of the ways of supplementing human milk for preterm babies would be to add proteins of bovine origin. On the other hand, Errázuriz et al. [7] state that cow's milk proteins are the antigens that most frequently cause sensitivity in infants. Milk protein allergy in neonates can manifest as digestive, skin and respiratory problems [7], in addition to a deficiency in growth rate [8], and the appearance of the illness named necrotizing enterocolitis [9]. Sullivan et al. [10], and Schanler [9], report that making use of a diet based on quality human milk can reduce, or even eliminate, the development of enterocolitis.

A few human milk based supplements are available on the Market, but their elevated costs may limit their use [3] [11]. Such supplements may be also obtained by submitting human milk to expensive industrial technologies, such as centrifugation [11], evaporation [12], and freeze dry [5]. Despite high-level similarities between human milk and infant formulas, a closer inspection indicates a number of important differences, which may underlie the known nutritional and functional differences between these two sources of infant nutrition [13]. An innovating alternative that aims at supplementing human milk is the concentration of the total solids of such raw material by applying the freeze concentration process. Belén et al. [14] reported that this process promotes the concentration of the liquid food products by freezing and subsequently separating a part of the frozen water.

Freeze concentration is considered a phenomenon that occurs during thawing of a solution resulting in a concentrated phase and another in the form of ice [14] [15]. This process has a few advantages, such as a low chemical deterioration due to decreased enzymatic and microbiological activity and almost no loss of volatile components of the raw material [16]. Hence, freeze concentration is a process able to guarantee a higher quality of the product submitted to it [17], providing a more selective water removal [18], in addition to being simple and having lower costs when compared to other industrial techniques. Adding the phases obtained through freeze concentration may increase the nutritive properties of human milk, since that feature is attributed to the low temperatures employed, which avoid the degradation of its components. Thus, using freeze concentration in liquid foods enables the obtainment of products with higher nutritional and sensorial quality, in addition to

avoiding undesirable chemical and biochemical changes [17] [19] [20]. In order to improve the efficiency of the process, Aider and Halleux [17] and Chabarov and Aider [21] indicate that is necessary to know the impact of the behavior on the raw material, in our case on human milk, to be submitted to this process considered as an emerging one; thus forecasting the future conditions that will be necessary for applying such technique. There are no reports in the literature on the effect of block freeze concentration on the human milk. The objective of the present study was to evaluate the effect of block freeze concentration on the physicochemical properties and freeze concentration performance on the human milk aiming the utilization of the concentrated fractions in newborn feeding.

3.3 MATERIAL AND METHODS

3.3.1 Human milk sampling

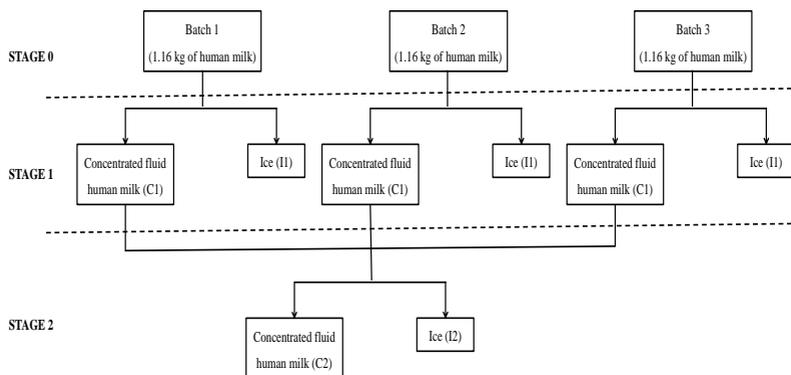
This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina. In this study was used human milk samples from 8 donors aged between 21 and 36 years old, between May to July, 2016, as follows: donor 1 (21 years old, 3 weeks of breast feed time); donor 2 (23 years old, 3 weeks of breast feed time); donor 3 (23 years old, 2 weeks of breast feed time); donor 4 (24 years old, 3 weeks of breast feed time); donor 5 (28 years old, 2 weeks of breast feed time); donor 6 (29 years old, 4 weeks of breast feed time); donor 7 (32 years old, 5 weeks of breast feed time); donor 8 (36 years old, 3 weeks of breast feed time). All donors were mothers of full-term babies, who met the criteria established by the Operating Manual for Human Milk Banks [22] for the donation of human milk. The human milk samples from Human Milk Bank of Motherhood Carmela Dutra, Childrens Hospital Joana de Gusmão (Florianópolis, Santa Catarina, Brazil) and Regional Hospital of São José (São José, Santa Catarina, Brazil) were collected manually into sterilized glass jars following the hygiene guidelines outlined in the Operating Manual for Human Milk Banks [22]. Each one human milk sample was submitted to LTLT (*low temperature long time*) pasteurization, pooled and shaken with vortex turbulence.

3.3.2 Freeze concentration procedure

The freeze concentration methodology applied to the human milk was the block freeze concentration, described by Boaventura et al. [23].

The method is based on total freezing of human milk followed by a partial defrosting procedure under simple gravitational separation. This method makes it possible to obtain two fractions denoted as concentrated fluid human milk (C) and ice (I) (Figure 1). An initial weight of 3.48 kg of human milk was divided into three batches of 1.16 kg and then frozen at -20 ± 2 °C in a freezer unit (Electrolux, FE 18, São Carlos, Brazil) by indirect cooling. Once the human was frozen, 50 % of the initial weight was defrosted at room temperature (20 ± 2 °C). The total defrosted liquid obtained (1.74 kg) was the concentrated fluid human milk of the first freeze concentration stage (C1). C1 was also frozen at -20 ± 2 °C and defrosted (20 ± 2 °C) up to 50% of the weight (0.87 kg) and it was the concentrated fluid human milk of the second freeze concentration stage (C2). The human milk, ices (I1 and I2) defrosted remaining from each freeze concentration stage and an aliquot of each concentrated fluid milk human (C1 and C2) were evaluated in relation to physicochemical properties, freeze concentration performance, color parameters, density and dynamic viscosity.

Figure 3. 1. Human milk concentration using the block freeze concentration process.



3.3.3 Physicochemical analysis

The titratable acidity (g/100 g lactic acid) was determined according to Instituto Adolfo Lutz (IAL) methodology [24], while the pH values were measurement using a pH meter (± 0.01) (PHS-3 BW, BEL, Piracicaba, São Paulo, Brazil).

Total solids content (g/100 g) was determined by drying of the

samples to constant weight at 70 °C under vacuum condition for 24 hours. Protein was estimated by measuring the N content of samples by the Kjeldahl method and multiplying by a conversion factor equal to 6.38. The lipid content was determined according to Gerber method, while the ash content was obtained by gravimetric method. These analytical procedures followed the appropriate standard methods [25]. The value for total carbohydrate was determined by difference. The caloric value (kcal/g) was calculated from the conversion factors, which were equal to 4 kcal/g, 9 kcal/g and 4 kcal/g for protein, lipid and carbohydrates, respectively. All analyses were carried out in triplicate. The chemicals used were of analytical grade and when necessary the solutions were properly prepared and standardized.

3.3.4 Freeze concentration performance

The concentration factor at each freeze concentration stage was calculated as a function of the increase of the concentration of the solution in relation to the total solids content (TS) [26]. The concentration factor was obtained as described in Equation (1):

$$CF (\%) = \frac{TS_n}{TS_0} \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

where CF is the concentration factor (%), TS_n is the total solid content (g/100 g) at a given freeze concentration stage (n = 1 or 2) and TS₀ is the total solid content (g/100 g) of the human milk.

The process efficiency of the freeze concentration process was determined according to Belén et al. [27], based on the total solids contents (g/ 100 g). Thus, the process efficiency (PE) (%) of the freeze concentration was determined by the increase of TS in the human milk concentrated fluid (C) (g/100 g) in relation to the TS remaining in ices I (g/100 g) defrosted from each freeze concentration stage (n), as described in the Equation (2):

$$PE (\%) = \frac{TS \text{ in the } C_n - TS \text{ in the } I_n}{TS \text{ in the } C_n} \times 100 \quad \text{Eq (2)}$$

As recommended by Petzold et al. [28], to validate the obtained experimental results, a mass balance of each freeze concentration stage was made and compared to the theoretical value. The mass balance was calculated for each freeze concentration stage from the results obtained

for the total solids content (TS) of human milk, concentrated fluid human milk (C1 and C2) and ice (I1 and I2). The mass balance of the first stage of freeze concentration (C1) was calculate in relation to TS of the human milk and the second stage (C2) in relation to TS of C1.

3.3.5 Color analysis

The color analysis of the human milk, concentrated fluid human milk (C1 and C2) and ice (I1 and I2) defrosted samples was determined using a colorimeter Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan), adjusted to operate with D65 lightning and 10° of observation angle. The colorimeter was calibrated with a white standard plate and to measure the L*, b* and a* parameters was used the CIELab color scale. The L* parameter ranges 0 to 100 and indicates luminosity (variation from black to white), the b* axis is the variation from yellow (+ b*) to blue (- b*) and the a* axis shows the variation from red (+ a*) to green (- a*). The value of Hue angle (h*) and Chroma (C*) were determined using Equations (3) and (4), respectively [29]. All analyses were done four times.

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Eq (3)}$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{.....Eq (4)}$$

3.3.6 Density

The density of the human milk, concentrated fluid human milk (C1 and C2) and ice (I1 and I2) defrosted was determinate by methodology described by AOAC [25]. A glass pycnometer (Gay-Lussac's pycnometer) (previously equilibrated to constant weight at 25 °C) was used. The density (g/cm³) realized in triplicate was calculated using the following Equation (5):

$$\rho_S = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1) \times \rho_{H_2O}} \quad \text{Eq (5)}$$

where ρ_S is the density of solutions (g/cm³), m_1 is the mass of empty pycnometer (g), m_2 is the mass of pycnometer with water (g), m_3 is the mass of pycnometer with solutions (g), and ρ_{H_2O} is the density of water.

3.3.7 Dynamic viscosity

The dynamic viscosity was measured using Falling-Ball Viscometer based on the measuring principle by Hoesppler (VEB MLW, Lesskestrabe, Germany), as described by Palczewska-Tulinska and Oracz [30], with modifications. In this viscometer is employed the rolling-ball principle, which it uses gravity as the driving force. A ball rolls through a closed capillary filled with sample fluid which is inclined at 10° angle with vertical axis. The time it takes the ball to travel a defined measuring distance is a measure for the fluid's viscosity. Thus, the inclination angle of the capillary permits the user to vary the driving force. For calculating the viscosity from the measured time, the fluid's density obtained for human milk, C1, C2, I1 and I2 were used. The ball N°2 with mass of 4.459 g and density equal to 2.228 g/cm³ was necessary to obtain the viscosity values. A liquid bath thermostat was responsible to maintain the temperature control at 35 ± 1°C, because it is the human milk temperature during the breastfeeding. The reading was done manually by the operator and calculated in triplicate using the following Equation (6).

$$\eta = t \times (\rho_b - \rho_s) \times K \quad \text{Eq (6)}$$

where η is dynamics viscosity (mPa.s), t is ball rolling time (s), ρ_b is ball density (g/cm³), ρ_s is sample density (g/cm³) and K is proportionality constant.

3.3.8 Statistical analyses

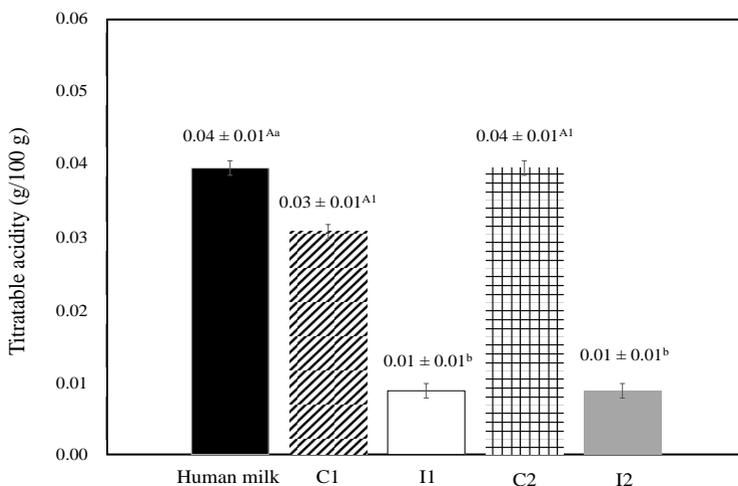
The data were expressed as means and standard deviation. The significance of the differences between the means of the milk samples was determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's studentized range (5% of significance). All statistical analyses were performed using the software STATISTICA version 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Figures 3.2 and 3.3 show the titratable acidity and pH, respectively, from each freeze concentration stage for human milk, concentrated fluid human milk fractions (C1 and C2) and ice fractions (I1, I2). No

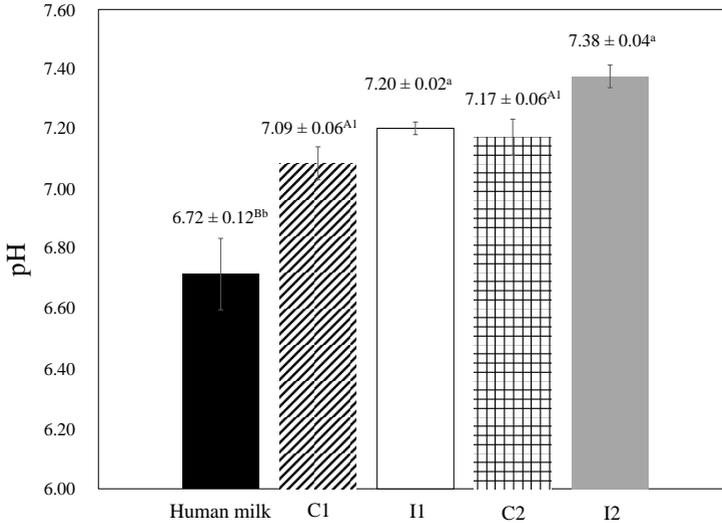
differences ($P > 0.05$) were found between human milk, C1 and C2 acidity values; nevertheless, they were lower ($P < 0.05$) for ice fractions (I1, I2). All results were in accordance with the National Health Surveillance Agency of Brazil which classifies the range of 1.0 - 8.0°D (0.01 g/100g and 0.08 g/100g, respectively) as an adequate acidity [22]. However, bacteria that integrate normal human milk microbiota can ferment lactose, resulting in an increase in lactic acid and in an elevation of its acidity. Pereira et al. [31], reported that high and low values for human milk acidity may influence the biological availability of nutrients, such as calcium, which is essential for bone mineralization in preterm infants. Therefore, considering the importance of human milk acidity for its nutritional quality, it should be emphasized that acidic or alkaline overloads result in metabolic acidosis or alkalosis, and its use can cause necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants [31].

Figure 3. 2. Titratable acidity (g/100 g) of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.



Legend: Results are expressed as mean \pm standard deviation, among three batches carried out in triplicate for each freeze concentration stage, with three repetitions for titratable acidity. ^{A-C} Different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the C of each freeze concentration stage. ^{a-c} Different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the I of each freeze concentration stage. ¹⁻² Different superscript numbers denote significant differences ($P < 0.05$) between the C of each freeze concentration stage.

Figure 3.3. pH values of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.



Legend: Results are expressed as mean \pm standard deviation, among three batches carried out in triplicate for each freeze concentration stage, with three repetitions for pH values. ^{A-C} Different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the C of each freeze concentration stage. ^{a-c} Different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the I of each freeze concentration stage. ¹⁻² Different superscript numbers denote significant differences ($P < 0.05$) between the C of each freeze concentration stage.

Regarding the pH results, no differences ($P < 0.05$) were observed between C1 and C2 samples, and I1 and I2 samples, respectively. However, when these values were compared with human milk, it was possible to note that lower value ($P < 0.05$) was obtained for the human milk. According to Cavalcante et al. [32], those values may vary between 5.47 and 7.84 and depend on the week of lactation and the lipids present. The same authors affirm that human milk can be considered as food that is initially little basic, becoming slightly acidic (up to the 21st day after birth) and then stabilizing between neutral and slightly basic (up to 180 days after birth). In light of the foregoing, the results observed for pH in this study are within the acceptable parameters.

The results referring to the total solids contents, the concentration factor (CF) and process efficiency (PE) are shown in Table 3.1. These

results show that it was possible to concentrate the total solids of human milk, and the CF and PE values obtained were higher ($P < 0.05$) in the second than in the first freeze concentration stage.

Table 3. 1. Total solids content of the human milk, concentrated fluid human milk the mass transfer in relation to total solids content for the two freeze concentration stages.

		Total solids (g/100 g)	CF (%)	PE (%)
Human milk		11.95 ± 0.11 ^{Ca}	-	-
Stage 1	C1	14.17 ± 0.01 ^{B2}	118.59 ± 1.06 [*]	43.88 ± 0.82 [*]
	I1	7.95 ± 0.12 ^b	-	-
Stage 2	C2	21.57 ± 0.17 ^{A1}	180.48 ± 0.27 [†]	70.30 ± 0.2 [†]
	I2	6.41 ± 0.09 ^c	-	-

Legend: Results are expressed as mean ± standard deviation, among three batches carried out in triplicate for each freeze concentration stage, with three repetitions for total solids content, CF and PE. ^{A-D} Within a column, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the C of each freeze concentration stage. ^{a-d} Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the I of each freeze concentration stage. ¹⁻³ Within a column, different superscript numbers denote significant differences ($P < 0.05$) between the C of each freeze concentration stage. Different symbols indicate significant differences ($P < 0.05$) in the CF and PE of each freeze concentration stage.

During the freeze concentration of whey, Aider and Ounis [26] observed that both values, CF and PE, were directly dependent on the total solids content. When concentrating the whey of fresh cheddar cheese [33], the authors mentioned that the elevated content of free water present in the first two stages of concentration was responsible for the greater efficiency of the process. Sánchez et al. [34] and Aider and Ounis [26] associated a decrease in the effectiveness of the process with an increase in the viscosity of the solution obtained after increasing dry matter contents and the retention of solids in the ice fraction during the freeze concentration process.

In the present study, the small ice crystals produced by slow freezing contained less impurities and solids than those produced by a rapid freezing process. Therefore, the freezing generated a formation of regular crystals, which could account for the increase in CF and PE,

contributing to this concentration process. Moreover, Petzold et al. [35] affirmed that the concentration of the solution recovered by the freeze concentration process generally depends on the viscosity of the concentrate, which is directly related to the total solids and lipid contents. In the case of the human milk freeze concentration process, the fat retained in I1 (ice fraction of the first stage) (Table 3.2) influenced the lower value of PE ($P < 0.05$).

Table 3. 2. Physicochemical properties of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.

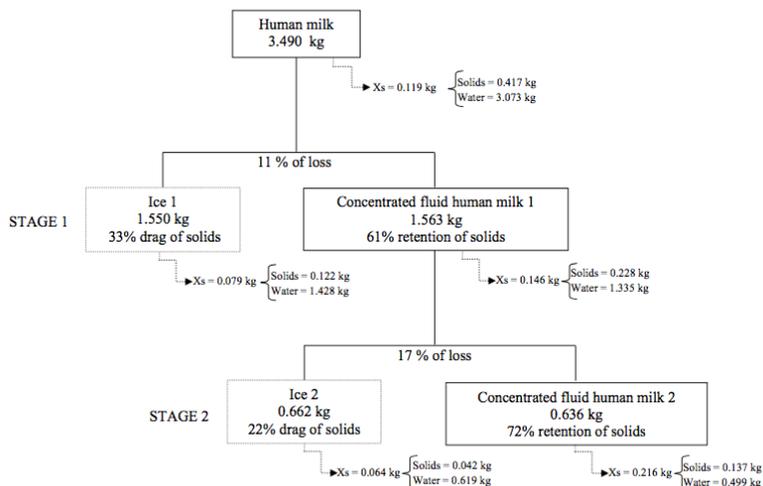
		Protein (g/100 g)	Lipid (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Total carbohydrates (g/100 g)	Caloric value (kcal/100g)
Human milk		1.45 ± 0.01 ^{Ca}	3.05 ± 0.21 ^{Ab}	0.25 ± 0.02 ^{Ba}	7.21 ± 0.31 ^{Ca}	62.09 ± 3.17 ^{Ba}
Stage 1	C1	2.21 ± 0.04 ^{B2}	0.25 ± 0.07 ^{B1}	0.36 ± 0.02 ^{B2}	11.36 ± 0.06 ^{B2}	56.53 ± 1.03 ^{C2}
	I1	0.58 ± 0.02 ^c	4.60 ± 0.14 ^a	0.11 ± 0.01 ^c	2.66 ± 0.23 ^c	54.36 ± 2.26 ^b
Stage 2	C2	3.34 ± 0.04 ^{A1}	0.35 ± 0.07 ^{B1}	0.53 ± 0.04 ^{A1}	17.35 ± 0.24 ^{A1}	85.91 ± 1.75 ^{A1}
	I2	1.00 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.07 ^c	0.18 ± 0.02 ^b	4.98 ± 0.18 ^b	26.17 ± 1.39 ^c

Legend: Results are expressed as mean ± standard deviation, among three batches carried out in triplicate for each freeze concentration stage, with three repetitions for physicochemical composition. ^{A-C} Within a column, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the C of each freeze concentration stage. ^{a-c} Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the I of each freeze concentration stage. ¹⁻² Within a column, different superscript numbers denote significant differences ($P < 0.05$) between the C of each freeze concentration stage.

It is noteworthy that the human milk was not skimmed, because this treatment is not applied by human milk banks, i.e., it is only submitted to the Holder pasteurization process (LTLT - low temperature long time). In short, the standardization technology provided for in the human milk processing and quality control manuals issued by Brazilian agencies does not allow the skimming of human Milk. Furthermore, contrary to standardization, the block freeze concentration performed in this study does not employ advanced equipment, which means it can be easily applied in human milk banks.

Aiming at validating the experimental results, a mass balance of both freeze concentration process stages was determined and compared to the theoretical values obtained. The mass balance was calculated for the total solids in milk, concentrates and ice fractions from each freeze concentration stage (Figure 3.4).

Figure 3. 4. Human milk mass balance resulting from the block freeze concentration process.



These results confirm that the second freezing concentration stage showed the best performance, despite the retention of lipids observed in the ice fraction of the first stage (Table 3.2). Upon concentrating cheddar cheese whey, Aider, Halleux and Akbache [33] observed a drastic increase in the content of solids in the first two stages of concentration, obtaining values that reached 14.54, 27.87, 30.17 and 34.20%, respectively, in the four stages. Aider, Halleux and Melnikova [36] concentrated whole milk whey up to 37.7% of solids by gravitational thawing and 36.85% by using microwave-assisted thawing, also with a greater process effectiveness in the first two stages. Such tendency was also observed in the freeze concentration of skimmed whey, reaching a value of approximately 35% in the fourth stage [37]. Upon concentrating skimmed milk, Aider and Ounis [26] obtained a concentrate with 43.72% in the fourth stage, also observing a decrease in the effectiveness of the process in the third and fourth stages. Even with the high effectiveness of the process that we ascertained in both stages of concentration used (Table 1), the values with respect to total solids were lower than the ones verified by Aider, Halleux and Akbache [33] in cheddar cheese whey.

It is noteworthy that concentration processes that use temperatures above 70°C may result in an irreversible aggregation of protein [26] [34]

[36]. Because low temperatures are applied in the freeze concentration process, it seems to be a highly advantageous process that also enables the preservation of nutritive and biological components of foods [37] [26]. The values observed for the total protein, lipid, ash, carbohydrate contents and the calorific value of human milk, concentrates and ice phases resulting from both freeze concentration stages are shown in Table 2. The analysis of the data referring to the protein content shows that the concentration stage exerted a positive effect on the total protein content of human milk and on the concentrates ($P < 0.05$). The protein content decreased in I1, with a subsequent increase in I2, in the ice fraction. The same behavior was observed by Aider, Halleux and Melnikova [36] [38] and by Aider and Ounis [26] in the block freeze concentration of milk products, but only beginning at the third stage of concentration. It is known that human milk provides newborns with proteins whose quality is ideal for their nutrition [6] [11]. However, the enzymatic immaturity of preterm neonates makes them more prone to deficiencies or to toxicity deriving from any excess of amino acids than full-term neonates [39]. There is a decrease in protein contents in mature milk while the needs for proteins of preterm neonates remain high, resulting in the inappropriateness of that nutrient to supply such need. Supplementing human milk with protein is capable of correcting such deficiency [3] [40]. According to Corpeleijn et al. [41], the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPHGAN) recommends that the supply of proteins for newborns with less and more than 1 kg should be between 3.6 - 4.1 and 3.2 - 3.6 g/100 g, respectively. Thus, the addition of the C2 obtained in this study to the milk of donors could satisfy the recommendation of protein intake of preterm neonates.

The contents of lipids assessed in freeze concentration show that there was a difference ($P < 0.05$) between human milk and the concentrated and ice fractions. Nevertheless, the analysis of the data did not find any differences ($P < 0.05$) between the concentrates and it was possible to verify that most of the lipid portion was retained in I1. Similar behavior was observed by Aider, Halleux and Melnikova [37] and Sánchez et al. [42]. The multiple functions exercised by lipids in infant feeding, such as a participation in the composition of cell membranes, myelin and prostaglandins, the delivery of vitamins and fat-soluble hormones, thermal isolation, energy deposit and assistance in the immunological protection of infants should be emphasized [43]. Moreover, they provide for around 50% of infant energy needs [44]. The need for essential fatty acids may result in immunological and neurological changes and alterations in growth and the skin, in addition

to behavioral disorders [45]. Just as the content of protein present in the C2 sample, the lipids retained in I1 could also be used to increase the calorific value of human milk and could provide for the increase needs of energy of preterm neonates when necessary.

As in the study conducted by Aider, Halleux and Menilkova [38], the content of ashes in the C2 fraction was greater ($P < 0.05$) than the one found for C1 and that of human milk. Upon comparing the milk and the ice fractions, we noted that human milk presented greater ash content ($P < 0.05$) than I1 and I2. The values presented in this study for the ash contents of human milk are close to the ones observed by Silva et al. [44] for mature milk.

The carbohydrate contents of both concentrates increased with the freeze concentration process, being higher ($P < 0.05$) for C2. With respect to the ice fraction, we observed a reduction ($P < 0.05$) of the total carbohydrate contents in I1 and later increase ($P < 0.05$) in I2. Other studies [26] [36] [37] showed the same tendency in relation to the ice fraction, but beginning from the third stage of freeze concentration. Human milk carbohydrates are highly significant for newborns. Apart from providing energy, Moura [46] states that such carbohydrates help in the absorption of calcium and in the myelination of axons; hence, stimulating neurological development. The addition of the C2 obtained in this study to the milk of donors would satisfy the recommendations of ESPGHAN, referred by Corpeleijn et al. [41] with respect to the total carbohydrates recommended for preterm neonates, i.e., between 10.5 and 12.0 g/100g.

Table 3.2 shows the results for protein, lipid and total carbohydrate contents for human milk, the concentrated and ice fractions. The C2 fraction showed a significantly higher ($P < 0.05$) caloric value than that of human milk or than any other fraction from the freeze concentration process. These results show the importance of the C2 fraction obtained. The caloric value observed for the ice fraction I1 is related to its high lipid retention.

It is a known fact that color is an important parameter influencing consumer choice, being also an indicative of quality [47], which can influence the acceptability of human milk. Sousa, Delgado and Saraiva [48] stated that when the milk is subjected to a different processing, it is expected that changes in color may occur. With respect to the L^* parameter (Table 3.3), when compared with human milk, it was possible to note its decrease and increase ($P < 0.05$) for concentrated fractions (C2; C1) and ice fraction from the first stage of the freeze concentration

process (I1), respectively. As the L^* parameter indicates lightness and the capacity of an object to either reflect or transmit light [49], this fact probably occurred due to the higher lipid concentration observed in the I1 sample. However, as cited by Verruck et al. [50] the smaller lightness also could be attributed to milk casein.

Table 3. 3. Physical properties and color parameters (L^* , a^* , b^* , C^* , h^*) of the human milk, concentrated fluid human milk (C) and ice (I) for the two freeze concentration stages.

	Human milk	Stage 1		Stage 2	
		C1	I1	C2	I2
Density (g/cm^3)	$1.03 \pm 0.01^{\text{Ba}}$	$1.07 \pm 0.01^{\text{A1}}$	$1.03 \pm 0.01^{\text{a}}$	$1.09 \pm 0.01^{\text{A1}}$	$1.02 \pm 0.01^{\text{a}}$
Viscosity (mPa.s)	$12.14 \pm 0.26^{\text{Ba}}$	$13.09 \pm 0.06^{\text{B2}}$	$9.81 \pm 0.38^{\text{b}}$	$20.82 \pm 0.79^{\text{A1}}$	$8.15 \pm 0.07^{\text{c}}$
L^*	$60.12 \pm 0.64^{\text{Ab}}$	$43.77 \pm 0.30^{\text{C2}}$	$65.15 \pm 0.42^{\text{a}}$	$57.34 \pm 0.55^{\text{B1}}$	$39.35 \pm 0.10^{\text{c}}$
a^*	$-2.58 \pm 0.05^{\text{Bc}}$	$-1.97 \pm 0.01^{\text{A1}}$	$-2.44 \pm 0.03^{\text{b}}$	$-2.82 \pm 0.05^{\text{C2}}$	$-0.23 \pm 0.04^{\text{a}}$
b^*	$4.01 \pm 0.80^{\text{Ab}}$	$-5.28 \pm 0.08^{\text{C2}}$	$6.91 \pm 0.56^{\text{a}}$	$-0.58 \pm 0.23^{\text{B1}}$	$-2.07 \pm 0.19^{\text{c}}$
C^*	$4.78 \pm 0.66^{\text{Bb}}$	$5.64 \pm 0.07^{\text{A1}}$	$7.33 \pm 0.54^{\text{a}}$	$2.89 \pm 0.09^{\text{C2}}$	$2.08 \pm 0.19^{\text{c}}$
h^*	$125.60 \pm 3.10^{\text{Cb}}$	$249.50 \pm 0.30^{\text{A1}}$	$109.50 \pm 1.20^{\text{c}}$	$189.50 \pm 2.30^{\text{B2}}$	$263.60 \pm 0.60^{\text{a}}$

Legend: Results are expressed as mean \pm standard deviation, among three batches carried out in triplicate for each freeze concentration stage, with three repetitions for density and viscosity; and five repetitions for the color parameters. ^{A-C} Within a row, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the C of each freeze concentration stage. ^{a-c} Within a row, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the human milk and the I of each freeze concentration stage. ¹⁻² Within a row, different superscript numbers denote significant differences ($P < 0.05$) between the C of each freeze concentration stage.

The results referring to the a^* parameter indicate the tendency toward a green color in human milk, as well as in the concentrates and ice fractions. These results occurred due to the presence of riboflavin in the milk, as cited by Magenis et al. [49]. In relation to the b^* parameter the positive values of the samples were found for human milk and I1 fraction, while the other samples showed negative values. These positive and negative values indicate a tendency toward a yellow and blue color, which was also affected by lipid content (Table 3.2). These behaviors could be attributed to the presence or absence of carotenoids that have affinity by lipids. As cited before, all color parameters are closely linked to the quality aspects of human milk. However, the Hue (h^*) and Chroma (C^*)

angles, being a function of a^* and b^* , gives a more realistic perspective than a single color. The Hue angle indicates visual assessment of food discoloration, while the Chroma represents its color saturation. Therefore, the results obtained for h^* indicated that all fractions obtained during the freeze concentration process were affected (Table 3.3), where the sample with the more and less pronounced tonality is represented by the fractions I1 and I2, respectively, but none was equal ($P < 0.05$) to the human milk. The C^* results indicated that the greater color saturations were observed for the C1 and I1 samples and this fact could be credited to the greater protein (casein) and lipid contents (Table 3.2) present, respectively.

Other important physical parameters for the human milk are the density and the viscosity. Sousa and Silva [51] and Aider and Ounis [26] affirmed that the density and the viscosity, respectively, could be related to the total solid content of raw material. Moukarzel and Bode [52] highlighted that although much attention is often given to the composition and caloric value of human milk, density and viscosity are essential for pre-term infant feeding.

It was observed (Table 3.3) for the density value a slight increase ($P < 0.05$) in the concentrated, while for ices fractions no differences ($P > 0.05$) were verified, when compared with the human milk. According to Oliveira et al. [4] supplements with density values close to those of the human milk are desirable for pre-term infants. These authors stated that low density values contribute for gastric stabilization, thus human milk could be a protective mechanism favoring emptying and compensating the immature gastric motility in preterm newborns. Despite C2 shows the highest ($P < 0.05$) viscosity result (Table 3), it should be noted that it is composed by human milk. Normally, a problem with supplements with high viscosity values is related to the sensitivity of newborns to cow's milk. Corvaglia et al. [53] highlighted that cow's milk induces gastric dysrhythmia, which can lead to a severe impairment of gastric motor function and also to an exacerbation of gastro-esophageal reflux, and delayed gastric emptying. Therefore, the higher C2 viscosity obtained in this study does not represent a negative factor, since such concentrate would not be directly supplied to preterm infants, but would be added to the milk of donors when necessary.

Our results reinforce the need for carefully controlling and optimizing all of the steps in human milk processing, in order to explore alternative treatments for human milk concentration, using its fractions for replacing preterm baby supplements that frequently contain proteins from cow's milk. So, our results support early initiation of human milk

fortification to increase protein, lipid and caloric intake by newborns. Finally, in the future, this work could contribute to the implementation of this efficient technology at human milk banks and might help reduce term and preterm infant morbidity and mortality, allowing infants to achieve their full potential for growth and development.

3.5 CONCLUSION

The results obtained in this study showed that the block freeze concentration process can be applicable to the concentration of human milk. The concentrate from stage 2 and the ice fraction from first concentration stage show potential to be used as protein and lipid human milk fortifier, respectively. Therefore, both fractions could improve the weight gain and growing of premature infants.

Finally, this process showed to be safe to freeze concentrate human milk and, because it is a simple and inexpensive method, it can be employed at any Human Milk Bank.

3.6 REFERENCES

- [1] Ahrabi, A.F. and Schanler, R.J. (2013) Human Milk is the Only Milk for Premies in the NICU! *Early Human Development*, 89, S51-S53.
- [2] Halleux, V., Pieltain, C., Senterre, T. and Rigo, J. (2017) Review. Use of Donor Milk in the Intensive Care Unit. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 22, 23-29.
- [3] Underwood, M.A. (2013) Human Milk for the Premature Infant. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 189-207.
- [4] Oliveira, S.C., Bourlieu, C., Ménard, O., Bellanger, A., Henry, G., Rousseau, F., Dirson, E., Carrière, F., Dupont, D. and Deglaire, A. (2016) Impact of Pasteurization of Human Milk on Preterm Newborn In Vitro Digestion: Gastrointestinal Disintegration, Lipolysis and Proteolysis. *Food Chemistry*, 211, 171-179.
- [5] Grance, T.R.S., Serafin, P.O., Débora Marchetti Chaves Thomaz, D.M.C. and Palhares, D.B. (2015) Homologous fortifier for very low birth weight preterm infant feed. *Revista Paulista de Pediatria*, 33, 28-33.

[6] Lönnerdal, B. (2017) Bioactive Proteins in Human Milk - Potential Benefits for Preterm Infants. *Clinics in Perinatology*, 44, 179 - 191.

[7] Errázuriz G., Lucero, Y., Ceresa, S., Gonzalez, M., Rossel, M. and Vivies, A. (2016) Clinical characteristics and management of infants less than 1-year-old suspected with allergy to cow's milk protein. *Revista Chilena de Pediatría*, 87, 449-454.

[8] Cristofalo, E.A., Schanler, R.J., Blanco, C.L., Sullivan, S., Trawoeger, R., Kiechl-Kohlendorfer, U., Dudell, G., Rechtman, D.J., Lee, M.L., Lucas, A. and Abrams, S. (2013) Randomized Trial of Exclusive Human Milk Versus Preterm Formula Diets in Extremely Premature Infants. *The Journal of Pediatrics*, 163, 1592-1595.

[9] Schanler, R.J. (2015) In time: human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis. *Revista Paulista de Pediatría*, 33, 131-133.

[10] Sullivan, S., Richard J. Schanler, R.J., Kim, J.H., Patel, A.L., Trawöger, R., Kiechl- Kohlendorfer, U., Chan, G.M., Blanco, C.L., Abrams, S., Cotten, M., Laroia, N., Ehrenkranz, R.A., Dudell, G., Cristofalo, E.A., Meier, P., Lee, M.L., Rechtman, D.J. and Lucas, A. (2010) An Exclusively Human Milk-based Diet is Associated With a Lower Rate of Necrotizing Enterocolitis Than a Diet of Human Milk and Bovine Milk-based Products. *The Journal of Pediatrics*, 156, 562-567.

[11] Thomaz, D.M.C., Serafim, P.O., Durval B. Palhares, D.B., Melnikov, P., Venhofen, L. and Vargas, M.O.F. (2012) Comparison between homologous human milk supplements and a commercial supplement for very low birth weight infants. *Jornal de Pediatría*, 88, 119-124.

[12] Santos, M.M., Martinez, F.E., Sieber, V.M., Pinhata, M.M.M. and Felin, M.L.S. (1997) Acceptability and Growth of VLBW-infants Fed With Own Mother's Milk Enriched With a Natural or Commercial Human Milk Fortifier (HMF) † 1370. *Pediatric Research*, 41, 231-231.

- [13] Su, M.-Y., Broadhurst, M., Liu, C.-P., Gathercole, J.G., Cheng, W.-L., Qi, X.-Y., Clerens, S., Dyer, J.M., Day, L. and Haigh, B. (2017) Comparative Analysis of Human Milk and Infant Formula Derived Peptides Following In Vitro Digestion. *Food Chemistry*, 221, 1895-1903.
- [14] Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J.M. and Raventós, M. (2012) One Option For the Management of Wastewater From Tofu Production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of Food Engineering*, 110, 364-373.
- [15] Sánchez, J., Ruiz, Y., Auleda, J.M., Hernández, E. and Raventós, M., (2009) Review. Freeze Concentration in the Fruit Juices Industry. *Food Science and Technology International* 15, 303–315.
- [16] Yee, P.L., Wakisaka, M., Shirai, Y. and Hassan, M.A. (2003) Effects of Single Food Components on Freeze Concentration by Freezing and Thawing Technique. *Japan Journal of Food Engineering*, 4, 77-83.
- [17] Aider, M. and Halleux, D. (2009) Review. Cryoconcentration Technology in the Bio-food Industry: Principles and Applications. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 679 – 685.
- [18] Yee, K.W.K., Wiley, D.E. and Bao, J. (2007) Whey Protein Concentrate Production by Continuous Ultrafiltration: Operability Under Constant Operating Conditions. *Journal of Membrane Science*, 290, 125– 137.
- [19] Sánchez, J., Ruiz, Y., Raventós, M., Auleda, J.M. and Hernández, E. (2010) Progressive Freeze Concentration of Orange Juice in a Pilot Plant Falling Film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 644 – 651.
- [20] Auleda, J.M., Raventós, M., Sánchez, J. and Hernández, E. (2011) Estimation of the freezing point of concentrated fruit juices for application in freeze concentration. *Journal of Food Engineering*, 105, 289-294.
- [21] Chabarov, A. and Aider, M. (2014) Mathematical Modeling and Experimental Validation of the Mass Transfer During Unidirectional

Progressive Cryoconcentration of Skim Milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 151-159.

[22] ANVISA (2008) Brazilian National Health Surveillance Agency. Human Milk Bank: Operation, Prevention and Control of Risks. ANVISA, Brasília.

[23] Boaventura, B.C.B., Murakami, A.N.N., Prudêncio, E.S., Maraschin, M., Murakami, F.S., Amante, E.R. and Castanho, R.D.M. (2013) Enhancement of Bioactive Compounds Content and Antioxidant Activity of Aqueous Extract of Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Through Freeze Concentration Technology. *Food Research International*, 53, 686-692.

[24] Instituto Adolfo Lutz (2008). Analytical Standards of the Adolfo Lutz Institute: Physicochemical Methods for Food Analysis. IAL, São Paulo.

[25] AOAC (2005) Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists. 18th. ed. Maryland, USA.

[26] Aider, M. and Ounis, W.B. (2012) Skim Milk Cryoconcentration as Affected by the Thawing Mode: Gravitational vs. Microwave-assisted. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 195–202.

[27] Bélen, F., Benedetti, S., Sánchez, J., Hernández, E. Auleda, J.M., Prudêncio, E.S., Petrus, J.C.C. and Raventós, M. (2013) Behavior of Functional Compounds During Freeze Concentration of Tofu Whey. *Journal of Food Engineering*, 116, 681 – 688.

[28] Petzold, Orellana, Moreno, Cerda, and Parra (2016) Vacuum-assisted Block Freeze Concentration Applied to Wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 330–335.

[29] Masoud, W. and Jakobsen, M. (2003) Surface Ripened Cheeses: the Effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the Intensity of Pigmentation Produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *International Dairy Journal*, 13, 231-237.

- [30] Palczewska-Tulinska and Oracz, P.J. (2005) Selected Physicochemical Properties of Hexamethylcyclotrisiloxane, Octamethylcyclotetrasiloxane, and Decamethylcyclopentasiloxane. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 50, 1711 – 1719.
- [31] Pereira, C.I.V., Dametto, J.F.S. and Oliveira, J.C.C. (2016) Evaluation of human milk titratable acidity before and after addition of a nutritional supplement for preterm newborns. *Jornal de Pediatria*, 92, 499-504.
- [32] Cavalcante J.L.P., Telles, F.J.S., Peixoto, M.M.L.V. and Rodrigues, R.C.B. (2005) Use of the titratable acidity in the quality control of the milked human milk. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25,103-108.
- [33] Aider, M., Halleux, D. and Akbache, A. (2007) Whey Cryoconcentration and Impact on its Composition. *Journal of Food Engineering*, 82, 92 – 102.
- [34] Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J.M. and Raventós, M. (2011) Freeze Concentration of Whey in a Falling-film Based Pilot Plant: Process and Characterization. *Journal of Food Engineering*, 103, 147-155.
- [35] Petzold, G., Moreno, J., Lastra, P., Rojas, K. and Orellana, P. (2015) Block Freeze Concentration Assisted by Centrifugation Applied to Blueberry and Pineapple Juices. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 30, 192-197.
- [36] Aider, M., Halleux, D. and Melnikova, I. (2008) Gravitational and Microwave-Assisted Thawing During Milk Whey Cryoconcentration. *Journal of Food Engineering*, 88, 373–380.
- [37] Aider, M., Halleux, D. and Melnikova, I. (2009) Skim Milk Whey Cryoconcentration and Impact on the Composition of the Concentrated and Ice Fractions. *Food Bioprocess Technology*, 2, 80-88.
- [38] Aider, M., Halleux, D. and Melnikova, I. (2009) Skim Acidic Milk Whey Cryoconcentration and Assessment of Its Functional Properties: Impact of Processing Conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,10, 334–341.

- [39] Santos, S.C., Figueiredo, C.M., Andrade, S.M.O. and Palhares, D.B. (2007) Plasma Amino Acids in Preterm Infants Fed Different Human Milk Diets From a Human Milk Bank. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 2, 51–56.
- [40] Heiman, H. and Schanler, R.J. (2006) Benefits of Maternal and Donor Human Milk for Premature Infants. *Early Human Development*, 82, 781–787.
- [41] Corpeleijn, W.E., Vermeulen, M.J., van den Akker, C.H. and van Goudoeve, J.B. (2011) Feeding Very-Low-Birth-Weight Infants: Our Aspirations versus the Reality in Practice. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58, S20-S29.
- [42] Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J.M. and Raventós, M. (2011) Review: Freeze Concentration Technology Applied to Dairy Products. *Food Science and Technology International*, 17, 05–09.
- [43] Laurindo, V.M., Calil, T., Leone, C. R. and Ramos, J.L.A. (1991) Nutritional Composition of Colostrum of Mothers of Suitable and Small Term Infants for Gestational Age. III - Conditions that Alter the Nutritional Composition of Human Milk. *Pediatria São Paulo*.
<http://www.pediatrasiapaolo.usp.br/upload/pdf/83.pdf>
- [44] Silva, R. C., Escobedo, J. P., Gioielli, L. A., Quintal, V. S., Ibidi, S. M. and Albuquerque, E. M. (2007) Centesimal composition of human milk and physico-chemical properties of its fat. *Química Nova*, 30, 1535-1538.
- [45] Tinoco, S. M. B., Sichieri, R., Setta, C. L., Moura, A.S., Santos, F. S. and Do Carmo, M. G. T. (2008) Trans fatty acids from milk of brazilian mothers of premature infants. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 44, 50-56.
- [46] Moura, E. C. (2005) Nutrição. In: Carvalho, M. R. de and Tamez, R. N. *Breastfeeding: Scientific Bases*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 26-56.

[47] Nascimento, C.F., Santos, P.M., Pereira-Filho, E.R. and Rocha, F.R.P. (2017) Recent Advances on Determination of Milk Adulterants. *Food Chemistry*, 221, 1232-1244.

[48] Sousa, S.G., Delgadillo, I. and Saraiva, J.A. (2016) Human Milk Composition and Preservation: Evaluation of High-pressure Processing as a Non-thermal Pasteurization Technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1043 -1060.

[49] Magenis, R.B., Prudêncio, E.S., Fritzen-Freire, C.B., Stephan, M.P., Egito, A.S. and Dagher, H. (2014) Rheological, Physicochemical and Authenticity Assessment of Minas Frescal Cheese. *Food Control*, 45, 22 – 28.

[50] Verruck, S., Prudêncio, E.S., Müller, C.M.O., Fritzen-Freire, C.B. and Amboni, R.D.M.C. (2015) Influence of Bifidobacterium Bb-12 on the Physicochemical and Rheological Properties of Buffalo Minas Frescal Cheese During Cold Storage. *Journal of Food Engineering*, 151, 34 – 42.

[51] Sousa, P.P.R. and Silva, J.A. (2010) Quality monitoring of human milk milked and distributed in Reference Milk Bank. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69, 7-14.

[52] Moukarzel, S. and Bode, L. (2017) Human Milk Oligosaccharides and the Preterm Infant: A Journey in Sickness and in Health. *Clinics in Perinatology*, 44, 193–207.

[53] Corvaglia, L., Martini, S. and Faldella, G. (2013) Gastro-oesophageal reflux: pathogenesis, symptoms, diagnostic and therapeutic management. *Early Human Development*, 89S4, S18–S19.

ANEXO A – TCLE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa **“Efeito do tratamento com dióxido de carbono supercrítico sobre a inativação microbiana e oxidação lipídica de leite humano (Stricto Sensu)”**.

O motivo que nos leva a realizar o presente estudo é a necessidade de garantir que o leite humano de doadoras a ser oferecido a lactentes e bebês prematuros e doentes seja seguro do ponto de vista microbiológico e nutricional após o processamento, favorecendo assim a preservação de sua saúde e seu pleno desenvolvimento. Dessa forma, justifica-se a busca de uma nova tecnologia que, ao utilizar temperaturas mais baixas de processamento, possa favorecer a minimização das perdas nutricionais ocorridas através do processamento térmico. O objetivo desse projeto é avaliar e comparar os efeitos da pasteurização e do processo de inativação microbiana por dióxido de carbono (CO₂) supercrítico em relação à inativação microbiana de mesófilos aeróbios naturalmente presentes e coliformes fecais artificialmente inoculados ao leite humano, bem como a oxidação lipídica após o processamento. O estudo acontecerá por meio da coleta do leite excedente de nutrizes que buscam a Central de Incentivo ao Aleitamento Materno/HU (CIAM) para alívio de ingurgitamento mamário, o qual não necessita ser utilizado para alimentação de seus recém-nascidos, sendo portanto desprezado após o esvaziamento das mamas. O número de coletas dependerá da necessidade de atendimentos subsequentes na CIAM e da disponibilidade em fazer novas doações. O leite será coletado de forma manual, pela pesquisadora, colocado em frascos estéreis e em seguida congelado para posterior análise.

Os riscos passíveis de ocorrer referem-se ao desconforto inerente à mama ingurgitada, bem como ao processo de ordenha, com posterior alívio após o esvaziamento mamário. O estudo não trará benefícios diretos às doadoras, porém os resultados poderão contribuir para que o leite humano fornecido por doadoras seja seguro do ponto de vista microbiológico e preserve seus atributos nutricionais, contribuindo assim para o crescimento e desenvolvimento de lactentes que dele necessitam.

Você terá garantia de acompanhamento sempre que necessitar de atendimento na CIAM, seja para esvaziamento mamário ou para quaisquer dúvidas inerentes ao processo de aleitamento materno.

Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é

voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou perda de benefícios. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: (48) 3207-3778 ou pelo e-mail: anaclaudia.berenhauer@yahoo.com.br.

As pesquisadoras irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do estudo permanecerão confidenciais e estarão a sua disposição, quando finalizada. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Óleos e Gorduras do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. No entanto, caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, as pesquisadoras assumirão a responsabilidade pelos mesmos.

Eu _____, portadora do RG: _____ fui esclarecida de maneira clara e detalhada sobre a pesquisa "**Efeito do tratamento com dióxido de carbono supercrítico sobre a inativação microbiana e oxidação lipídica de leite humano (*Stricto Sensu*)**". Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Endereço do CEPESH:
Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara)
Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Trindade, Florianópolis/SC
CEP: 88.040-400
e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br
Fone: +55 48 3721-6094

Florianópolis,

de 2015.

ASSINATURA

Profª Dra Jane Mara Block

ASSINATURA

Ana Claudia Berenhauer

ANEXO B

● Fwd: CyTA - Journal of Food - Decision on Manuscript ID TCYT-2016-0254 (4)

Pessoas ★

From: **CyTA - Journal of Food** <onbehalfof+manuel.vazquez+usc.es@manuscriptcentral.com>

Date: 2017-03-19 14:36 GMT-03:00

Subject: CyTA - Journal of Food - Decision on Manuscript ID TCYT-2016-0254

To: janeblock@gmail.com

19-Mar-2017

Dear Dr Block:

Your manuscript entitled "Effect of high-pressure carbon dioxide processing on the inactivation of aerobic mesophilic bacteria and Escherichia coli in human milk", which you submitted to CyTA - Journal of Food, has been reviewed. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

The reviewer(s) would like to see some major revisions made to your manuscript before publication. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

When you revise your manuscript please highlight the changes you make in the manuscript by using the track changes mode in MS Word or by using bold or coloured text.

To submit the revision, log into <https://mc.manuscriptcentral.com/tcyt> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision. Please enter your responses to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you made to the original manuscript. Please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to CyTA - Journal of Food, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to CyTA - Journal of Food and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,

Dr Vázquez Vázquez

Editor in Chief, CyTA - Journal of Food

manuel.vazquez@usc.es