



**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Roberto Pessanha da Silva Pires**

**INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA ENTERICA* EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL  
POR AQUECIMENTO ÔHMICO**

Rio de Janeiro

2019

**Roberto Pessanha da Silva Pires**

**INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA ENTERICA* EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL  
POR AQUECIMENTO ÔHMICO**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Rio de Janeiro

2019

Ficha catalográfica elaborada por  
Sergio Pinheiro Rodrigues  
CRB7-3684

P667i Pires, Roberto Pessanha da Silva.  
Inativação de *Salmonella enterica* em fórmula láctea infantil por aquecimento ôhmico. / Roberto Pessanha da Silva Pires. – Rio de Janeiro, 2019.  
78f. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

1. Lactentes-nutrição. 2. Salmoneloses. 3. Processamento ôhmico.  
I. Cruz, Adriano Gomes da. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 613.2.03

**Roberto Pessanha da Silva Pires**

**INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA ENTERICA* EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL  
POR AQUECIMENTO ÔHMICO**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data da aprovação: 04 de julho de 2019.

---

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (Orientador)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte  
Universidade Federal Fluminense - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Cristina Euzébio Pereira Dias de Oliveira  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Rio de Janeiro

2019



*Yo te dedico este trabajo a ti, Carlos, que siempre estuviste a mi lado,  
ayudando a cada paso del proceso (incluso en la distancia).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter-me dado forças para cumprir mais esta etapa na minha escalada acadêmica, e serenidade para entender as pressões a que fui exposto.

Agradeço à minha família e aos meus amigos, por entenderem os momentos em que não pude estar presente, por conta das atividades do Mestrado.

Agradeço ao IFRJ, pela licença para cursar o Mestrado com mais tranquilidade, para realizar minhas atividades de laboratório e de escrita, em especial, aos membros do CoCam que compraram essa “briga” para que este direito fosse garantido.

Agradeço ao meu orientador, por todo o ensinamento, pela paciência, e pelos “puxões de orelha” nas horas necessárias. Agradeço também à banca, aos professores do Mestrado PCTA, à antiga coordenadora a Prof<sup>a</sup>. Marcia Cristina, e ao Prof. Felipe Oliveira da UFRJ, por todo o aprendizado adquirido nestes anos.

Agradeço aos colegas do Mestrado PCTA (das várias turmas) com quem tive contato em sala de aula, nos laboratórios, estudando para as provas, e também em longas ligações telefônicas, dividindo ansiedades e alegrias, em especial, Alexandre, Cristiane, Juliana, Marcela, Monica, Rose e Shigeno. Agradeço também aos alunos de IC<sup>1</sup> que tanto me ajudaram durante este projeto: Bárbara Victor, Fernanda Szpunar, João Vignoly, Mateus Alexandre e Victor Evangelista.

Agradeço a todos que me ajudaram (em algum momento que seja) nos meus experimentos: Aline Garcia, Anderson Cabral, Anderson Sant’Ana, André Luiz, Bruna Chamusca, Cássia Barros, Celso Fasura, Clara Pollery, Daniel Paixão, Eduardo Felipe, Erick Kitagawa, Gabriel Faria, Gabrielle Menezes, Gustavo Anciens, Henrique Coroado, Janaína Nascimento, Joana Dark, João Barros, Larissa Rodrigues, Letícia Alves, Lucas Spelta, Luciano Fernandes, Luiz Dione, Marcus Ferreira, Natasha Sampaio, Philippe Cunha, Ramon Silva, Renan Lima, Roberto Neto, Thaysa Ramos e Yuri Abud.

Agradeço a todos<sup>2</sup> aqueles que contribuíram para que a produção de trabalhos acadêmicos conforme as normas ABNT com  $\LaTeX$  fosse possível. E também ao Centro de Pesquisa em Arquitetura da Informação da Universidade de Brasília (CPAI), aos usuários dos Google Grupos *latex-br* e *abnTeX2*, que contribuíram e que ainda contribuirão para a evolução do *abnTeX2*.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Carlos Alberto Guerrero Peña (que faz aniversário hoje) que me apresentou ao  $\LaTeX$ , abrindo meus olhos para uma nova realidade, além de tantos outros motivos.

---

<sup>1</sup> Iniciação Científica

<sup>2</sup> Os nomes dos integrantes do 1º projeto *abnTeX* estão em <http://codigolivre.org.br/projects/abntex/>

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito”  
(Chico Xavier).*

PIRES, R. P. S. *INATIVAÇÃO DE SALMONELLA ENTERICA EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL POR AQUECIMENTO ÔHMICO*. 78 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

## RESUMO

Em geral, para a redução da população microbiana, as fórmulas lácteas infantis (FLI) podem ser submetidas a um tratamento térmico convencional (CONV) em banho-maria, que varia, geralmente, de 72 a 75 °C por 15 s (pasteurização rápida). Neste trabalho, foram comparados os efeitos do aquecimento ôhmico (AO) a 30 V (intensidade de campo elétrico de 6 V cm<sup>-1</sup>) sob diferentes isotermas (50, 55, 60 e 65 °C) com aqueles gerados pelo aquecimento convencional (sob as mesmas isotermas), quanto às análises de hidroximetilfurfural (HMF) livre, do índice de soroproteínas não desnaturadas (WPNI), de inativação microbiana, de compostos bioativos e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em uma FLI amplamente comercializada. As análises microbiológicas tiveram início com 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *Salmonella enterica* na FLI. Durante os tratamentos ôhmicos, as reduções parciais alcançaram valores de 3,04, 4,69 e 5,97 log UFC mL<sup>-1</sup> para as isotermas de 50, 55 e 60 °C, respectivamente. Durante os tratamentos convencionais, as reduções parciais alcançaram valores de 0,91, 3,00 e 5,21 log UFC mL<sup>-1</sup> para as isotermas de 50, 55 e 60 °C, respectivamente. Os tratamentos a 65 °C não têm seus resultados microbiológicos demonstrados, por impossibilidade temporal na execução. O efeito térmico se mostrou mais importante para o decaimento populacional da *Salmonella enterica* na FLI do que o efeito elétrico, embora a sobreposição de ambos demonstra uma eficiência maior quando testada na mesma isoterma. Verificou-se que o modelo de decaimento “Weibull” foi o que melhor se ajustou a todos os tratamentos térmicos utilizados nesta pesquisa. Com a MEV, sugere-se que quanto maior a temperatura, maiores são os danos às bactérias, principalmente durante os tratamentos ôhmicos. Com relação à análise de HMF, constatou-se que os menores valores foram encontrados nos tratamentos a 50 °C (9,17 e 9,43 μmol L<sup>-1</sup>, CONV e AO, respectivamente, p<0,05), pois com o aquecimento mais brando são menores os efeitos da Reação de Maillard. No geral, os tratamentos ôhmicos apresentam maiores valores de WPNI, possivelmente devido ao menor tempo de aquecimento, o que gera menos desnaturação de proteínas. Com exceção da análise de inibição da α-amilase, os tratamentos ôhmico e convencional apresentaram diferença significativa para todos os compostos bioativos (p<0,05), sendo no geral, o tratamento ôhmico mais eficiente na preservação destes compostos. Corroborou-se isso com relação ao DPPH (atividade antioxidante) (9,74 ± 0,07, 9,74 ± 0,03 e 9,61 ± 0,03 μM Trolox Eq/g, a

55, 60 e 65 °C, respectivamente), TPC (Compostos Fenólicos Totais) ( $88,31 \pm 1,47$ ,  $86,43 \pm 0,27$ ,  $87,58 \pm 0,52$  e  $85,56 \pm 0,38$   $\mu\text{g}$  de Eq/g de Ácido Gálico, a 50, 55, 60 e 65 °C, respectivamente) e ECA (Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina) ( $35,00 \pm 0,26$ ,  $38,27 \pm 0,21$  e  $38,87 \pm 0,21\%$  a 55, 60 e 65 °C, respectivamente), exceto para amostras tratadas a 50 °C ( $9,29 \pm 0,01$   $\mu\text{M}$  Trolox Eq/g e  $23,37 \pm 0,47\%$ , para DPPH e ECA, respectivamente,  $p > 0,05$ ). Quanto ao nível de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, independentemente das tecnologias realizadas, as isotermas de 65 °C ( $44,02 \pm 2,30$  e  $46,25 \pm 1,65\%$ , para AO e CONV, respectivamente) apresentaram os melhores valores para este estudo. No geral, o aquecimento ôhmico se mostrou uma alternativa eficaz para o processamento da FLI a ser servida ao lactente, principalmente a 60 °C.

**Palavras-chave:** Alimentação de lactentes. Salmoneloses. Patógenos. Processamento ôhmico. Tecnologia emergente.

PIRES, R. P. S. *INACTIVATION OF SALMONELLA ENTERICA IN INFANT FORMULA BY OHMIC HEATING*. 78 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

## ABSTRACT

In general, for the microbial population reduction, infant formula (IF) can be subjected to a conventional heat treatment (CONV) by water bath, which generally varies from 72 to 75 °C per 15 s (rapid pasteurization). In this work, the effects of the ohmic heating (OH) at 30 V (electric field strength of 6 V cm<sup>-1</sup>) under different isotherms (50, 55, 60 and 65 °C) were compared with those generated by conventional heating (under the same isotherms) for free hydroxymethylfurfural (HMF) analysis, for Whey Protein Nitrogen Index analysis, for microbial inactivation analysis, bioactive compounds analysis and scanning electron microscopy (SEM) analysis in a widely traded IF. Microbiological analyzes were started with 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> of *Salmonella enterica* in IF. During the ohmic treatments, the partial reductions reached mean values of 3.04, 4.69 and 5.97 log CFU mL<sup>-1</sup> for the 50, 55 and 60 °C isotherms, respectively. During the conventional treatments, the partial reductions reached mean values of 0.91, 3.00 and 5.21 log CFU mL<sup>-1</sup> for the 50, 55 and 60 °C isotherms, respectively. Treatments at 65 °C don't have their microbiological results demonstrated, due to temporal impossibility in the execution. The thermal effect was more important for the population decay of *Salmonella enterica* in IF than the electrical effect, although the overlap of both shows a greater efficiency when tested in the same isotherm. It was verified that the "Weibull" decay model was the best fit for all the thermal treatments used in this research. With SEM, it's suggested that the higher the temperature, the greater the damage to the bacteria, especially during the ohmic treatments. Regarding the HMF analysis, it was found that the lowest values were found in the treatments at 50 °C (9.17 and 9.43 μmol L<sup>-1</sup>, CONV and OH, respectively, p<0.05), because with the lowest heating the Maillard reaction shows up less effects. In general, the ohmic treatments have higher WPNI values, possibly due to the shorter heating time, which generates less protein denaturation. With the exception of the α-amylase inhibition analysis, the ohmic and conventional treatments showed a significant difference for all the bioactive compounds (p<0.05), ohmic treatment being generally the most efficient in the preservation of these compounds. This is corroborated with respect to DPPH (antioxidant activity) (9.74 ± 0.07, 9.74 ± 0.03 and 9.61 ± 0.03 μM Trolox Eq/g, at 55, 60 and 65 °C, respectively), TPC (Total Phenolic Compounds) (88.31 ± 1.47, 86.43 ± 0.27, 87.58 ± 0.52 and 85.56 ± 0.38 μg of Eq/g of Gallic Acid, at 50, 55, 60 and 65 °C, respectively) and ACE (Angiotensin Converting Enzyme Inhibition) (35.00 ± 0.26,

$38.27 \pm 0.21$  and  $38.87 \pm 0.21\%$  at 55, 60 and 65 °C, respectively), except for samples treated at 50 °C ( $9.29 \pm 0.01 \mu\text{M Trolox Eq/g}$  and  $23.37 \pm 0.47\%$ , for DPPH and ACE, respectively,  $p > 0.05$ ). Regarding the level of  $\alpha$ -glycosidase inhibition, regardless of the technologies performed, the 65 °C isotherms ( $44.02 \pm 2.30$  and  $46.25 \pm 1.65\%$ , for OH and CONV, respectively) presented the best values for this study. In general, the ohmic heating has proved to be an effective alternative for the processing of IF to be served to the infant, mainly at 60 °C.

**Keywords:** Infant feeding. Salmonellosis. Pathogens. Ohmic processing. Emerging technology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Bactérias da estirpe <i>Salmonella</i> Typhi observadas por microscopia eletrônica de varredura e coloridas por computador. . . . .	23
Figura 2 – Esquema de funcionamento do Aquecimento ôhmico (AO). . . . .	25
Figura 3 – Crescimento das 5 estirpes de <i>Salmonella enterica</i> (indicadas na Tabela 3) em placa contendo ágar Casoy. . . . .	34
Figura 4 – <i>Salmonella enterica</i> em placa contendo ágar bismuto sulfito. . . . .	35
Figura 5 – Fluxograma da Preparação do inóculo bacteriano. . . . .	36
Figura 6 – Equipamento de Aquecimento Ôhmico (AO) do Laboratório de Processamento de Alimentos do IFRJ - <i>Campus</i> Rio de Janeiro. . . . .	37
Figura 7 – Equipamento de Aquecimento Convencional (banho-maria) do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do IFRJ - <i>Campus</i> Rio de Janeiro. . . . .	39
Figura 8 – Fluxograma do Aquecimento (Ôhmico ou Convencional) até a contagem bacteriana. . . . .	40
Figura 9 – Opções para escolha do modelo de decaimento com suplemento GlnaFiT do Excel®. . . . .	41
Figura 10 – Exemplo de gráfico de decaimento do “Modelo Log-Linear + Ombro” gerado com o suplemento GlnaFiT do Excel®. . . . .	41
Figura 11 – Perfis de tempo × temperatura (com os primeiros 4 minutos de aquecimento isotérmico) dos processamentos ôhmico (AO) e convencional (CONV) conduzidos a 50, 55 e 60 °C. . . . .	46
Figura 12 – Inativação de <i>Salmonella enterica</i> em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, conforme explicado no final da Figura 5. Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise realizada em duplicata. . . . .	49
Figura 13 – Inativação de <i>Salmonella enterica</i> em FLI tratadas por aquecimento convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, segundo o modelo de decaimento “Weibull”. Os valores correspondem à média de dois experimentos. . . . .	50
Figura 14 – Inativação de <i>Salmonella enterica</i> em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, segundo o modelo de decaimento “Weibull”. Os valores correspondem à média de dois experimentos. . . . .	51



Figura 15 – Amostras controle de mudanças morfológicas nas células de <i>Salmonella enterica</i> (SE) em FLI antes dos tratamentos por aquecimento ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular. . . . .	60
Figura 16 – Mudanças morfológicas nas células de <i>Salmonella enterica</i> (SE) em FLI tratadas por aquecimento convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular. Seta vermelha: células lisadas e detritos ( <i>debris</i> ) celulares. . . . .	61
Figura 17 – Mudanças morfológicas nas células de <i>Salmonella enterica</i> (SE) em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular. Seta vermelha: células lisadas e detritos ( <i>debris</i> ) celulares. . . . .	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças entre o Leite Humano, Fórmula Infantil e Leite de Vaca. . . . .	19
Tabela 2 – Informação Nutricional da FLI comercial utilizada. . . . .	33
Tabela 3 – Estirpes de Referência. . . . .	34
Tabela 4 – Coletas durante as isotermas. . . . .	38
Tabela 5 – Parâmetros estatísticos ajustados ao modelo Weibull para avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella enterica</i> em FLI submetidas aos aquecimentos ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. . . . .	54
Tabela 6 – Índice de soroproteína não desnaturada (WPNI) e Concentração de Hidroximetilfurfural livre (HMF livre) de FLI submetidas aos aquecimentos ôhmico (AO) e convencional (CONV). . . . .	55
Tabela 7 – Compostos Bioativos presentes na FLI: Capacidade antioxidante e Capacidades de Inibição da $\alpha$ -amilase, da $\alpha$ -glicosidase e da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). . . . .	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abr	Abril
AC	<i>Alternating current</i> ou Corrente alternada
ADPI	<i>American Dairy Products Institute</i> ou Instituto de Produtos Lácteos Americanos
Ago	Agosto
AO	Aquecimento Ôhmico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> ou Coleção de cultura-tipo norte-americana
°C	Graus Celsius
CE	Comunidade Européia
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
cm	Centímetro
DDP	Diferença de potencial
Dez	Dezembro
Dr.	Doutor
Dr <sup>a</sup> .	Doutora
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>Et al.</i>	<i>Et alia</i> ou E outros
EUA	Estados Unidos da América
Fev	Fevereiro
FLI	Fórmula láctea infantil
g	Gramas
× g	Gravidades

GInaFiT	<i>Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool</i> ou Ferramenta de ajuste de modelo de inativação de <i>Geeraerd e Van Impe</i>
HMF	Hidroximetilfurfural
IFRJ	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Jan	Janeiro
Jul	Julho
Jun	Junho
kcal	Quilocaloria
kJ	Quilojoule
LMQA	Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos - UNICAMP
log	Logarítmo
m	Metro
Mai	Maio
Mar	Março
MEFS	Microextração em fase sólida
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
Nov	Novembro
Out	Outubro
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof.	Professor
Prof <sup>a</sup> .	Professora

RE	Equivalente de retinol
RM	Reação de Maillard
RMSE	<i>Root Mean of Squared Error</i> ou Raiz do Erro Médio Quadrático
RP	Redução parcial
RT	Redução total
s	Segundo
Set	Setembro
TR	Taxa de redução
UFC	Unidade formadora de colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
V	Volt
v/v	Volume por volume
WPNI	<i>Whey Protein Nitrogen Index</i> ou Índice de soroproteína não desnaturada
$\alpha$ TE	Equivalente de alfa-tocoferol
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ mol	Micromol

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1	FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL .....	19
2.2	<i>SALMONELLA ENTERICA</i> .....	21
2.3	AQUECIMENTO ÔHMICO .....	24
2.4	MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	26
2.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	29
2.5.1	<b>Concentração de hidroximetilfurfural</b> .....	29
2.5.2	<b>Índice de soroproteína não desnaturada</b> .....	29
2.5.3	<b>Compostos Bioativos</b> .....	29
2.5.3.1	Capacidade antioxidante .....	29
2.5.3.2	Capacidade de inibição de $\alpha$ -amilase e de $\alpha$ -glicosidase .....	30
2.5.3.3	Capacidade de inibição de enzima conversora de angiotensina.....	30
2.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	30
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
5.1	FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL.....	33
5.2	ESTIRPES .....	34
5.2.1	<b>Preparação do inóculo bacteriano</b> .....	35
5.3	AQUECIMENTO ÔHMICO .....	37
5.4	AQUECIMENTO CONVENCIONAL .....	38
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> .....	39
5.6	CONSTRUÇÃO DO MODELO PREDITIVO.....	41
5.7	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA FLI APÓS PROCESSAMENTO.....	42
5.7.1	<b>Concentração de hidroximetilfurfural</b> .....	42
5.7.2	<b>Índice de soroproteína não desnaturada</b> .....	42
5.7.3	<b>Compostos Bioativos</b> .....	42
5.7.5.1	Capacidade antioxidante .....	43
5.7.5.2	Capacidade de inibição de $\alpha$ -amilase e de $\alpha$ -glicosidase .....	43
5.7.5.3	Capacidade de inibição de enzima conversora de angiotensina.....	44

5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	44
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
6.1	MICROBIOLOGIA PREDITIVA: AQUECIMENTO ÔHMICO <i>VERSUS</i> AQUECIMENTO CONVENCIONAL .....	46
6.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	54
6.2.1	HMF .....	54
6.2.2	WPNI .....	55
6.2.3	Compostos Bioativos .....	56
6.3	ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA BACTERIANA E DA FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	58
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
	<b>Anexos</b> .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

As fórmulas lácteas infantis (FLI) são produtos destinados à alimentação de lactentes, em substituição total ou parcial ao leite materno, e têm grande importância mercadológica, pois são alternativas para muitas mães que estão impossibilitadas de amamentar seus bebês, seja por questões de saúde ou até por falta de tempo.

As bactérias do gênero *Salmonella* têm um conhecido histórico de epidemias pelo mundo, causando infecções (em grande parte de origem alimentar) que terminam diversas vezes em morte. Tem sido grande o número de casos de salmoneloses provenientes das FLI contaminadas em todo o mundo.

É extremamente importante o controle de patógenos nas FLI, pois são alimentos não estéreis, e destinados a um público alvo suscetível a infecções. Tanto as indústrias fabricantes quanto os manipuladores das fórmulas reconstituídas devem se atentar para o cumprimento das boas práticas sanitárias ao manipularem as FLI, como preconiza a RDC nº 46 de 25 de setembro de 2014.

Diversos tratamentos vêm sendo utilizados nos alimentos ao longo do tempo, mas nem sempre com sucesso, tanto por não serem tão eficientes na sua descontaminação, como também por alterarem as suas características sensoriais e/ou nutritivas.

Há algumas décadas, o aquecimento ôhmico vem sendo estudado, entretanto não é totalmente entendido quanto aos seus efeitos não térmicos, não sendo tão utilizado na indústria. Este trabalho visa ajudar nesta questão, trazendo à tona mais alguns dados para demonstrar a relevância desta tecnologia emergente.

Com a utilização de cálculos matemáticos da microbiologia preditiva, foram gerados modelos que demonstram a inativação de *Salmonella* spp. nas fórmulas lácteas infantis tratadas por aquecimento ôhmico e por aquecimento convencional. Desta forma, foi possível verificar a eficácia do aquecimento ôhmico e determinar quais as melhores condições de se utilizar o processamento ôhmico para descontaminação das FLI frente a este patógeno tão perigoso, ainda mais para lactentes, que têm o sistema imunológico mais frágil.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL

Fórmula infantil [...] é o produto em forma líquida ou em pó destinado à alimentação de lactentes [...], sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite materno ou humano, para satisfação das necessidades nutricionais desse grupo etário (BRASIL, 2006).

No Brasil, foram feitas avaliações do conteúdo nutricional das fórmulas lácteas infantis mais vendidas e verificou-se que a maioria delas está em conformidade com os dados descritos nos rótulos, embora algumas marcas apresentem discrepâncias quanto às concentrações de alguns nutrientes. Isso demonstra que as autoridades brasileiras precisam se ater à padronização destes produtos, como recomenda a RDC nº 46 de 25 de setembro de 2014 (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

A fórmula láctea infantil (FLI) apresenta a sua composição protéica um pouco diferente da composição do leite humano, mas é o melhor substituinte para os lactentes que não são alimentados com leite materno (RODRIGUES *et al.*, 2017). Ainda assim, devido às tecnologias existentes, é um grande problema produzir as FLI totalmente estéreis, pois o processo de esterilização afeta as características sensoriais das mesmas, e por isso, não podem ser utilizadas. Com isso, estudos estão sendo realizados para se incorporar substâncias antimicrobianas (como peptídeos bioativos, ácidos orgânicos, probióticos e prebióticos) nas FLI em pó, para se minimizar o risco de contaminantes microbianos (KENT *et al.*, 2015). Pode-se verificar um comparativo entre leite humano, fórmula infantil e leite de vaca na Tabela 1.

Tabela 1 – Diferenças entre o Leite Humano, Fórmula Infantil e Leite de Vaca.

Nutriente	Leite Humano	Fórmula Infantil	Leite de Vaca
Proteínas	Quantidade adequada, fácil de digerir	Modificada para quantidade adequada, risco de alergia	Excesso, difícil digestão, risco de alergia
Vitaminas	Quantidade suficiente	Geralmente suplementadas	Deficiente em Vit. A e C
Minerais	Quantidade suficiente, equilibrado, fácil absorção	Suplementadas, parcialmente equilibradas, difícil absorção	Excesso de alguns nutrientes, desequilibrado, difícil absorção
Água	Suficiente (se em Aleitamento Materno Exclusivo)	Necessário oferecer	Necessário oferecer
Fatores de proteção imunológica	Presentes	Ausentes	Ausentes
Fatores de crescimento	Presentes	Ausentes	Ausentes

Fonte: Adaptado de Olha quem está comendo (2013).

Lactentes ficam muito resistentes se eles se alimentam exclusivamente com leite materno até os seis meses de vida, conjugando uma alimentação balanceada com leite materno dos seis meses até os dois anos de idade. A redução da amamentação é proporcional ao desenvolvimento, não pela retirada do peito, mas pela porcentagem ingerida, comparada às outras formas de alimentação (IBGE, 2010; NOVAES *et al.*, 2017).

Segundo a Embrapa Gado de Leite, o consumo de leite no Brasil em 2016 foi de 171,3 litros/habitante/ano, e em 2017 foi de 166,7 litros/habitante/ano, o que indica que tanto o leite quanto os seus derivados têm grande relevância no perfil de consumo do brasileiro, levando-se em conta as importações e exportações (CARVALHO; ROCHA; GOMES, 2018).

Segundo Francisquini *et al.* (2017), em torno de 70% dos alimentos infantis comercializados mundialmente são FLI, principalmente de quatro empresas multinacionais: Danone<sup>®</sup>, Nestlé<sup>®</sup>, Abbott<sup>®</sup> e Mead Johnson<sup>®</sup>. As FLI podem ser de cinco tipos diferentes: FLI para prematuros, FLI para lactentes (0 a 6 meses de idade), FLI de seguimento para lactentes (a partir dos 6 meses de idade), FLI de seguimento para crianças de primeira infância (1 a 3 anos de idade) e FLI especiais.

Novos estudos têm sido realizados para desenvolver métodos de rápida detecção de micro-organismos patogênicos nas fórmulas infantis como, por exemplo, as bactérias da espécie *Cronobacter sakazakii* (KIM *et al.*, 2017). Segundo Angulo *et al.* (2008), *Salmonella enterica* e *Cronobacter sakazakii* são as duas principais espécies de patógenos encontradas em fórmulas lácteas infantis em pó.

Desde a década de 1950, tem-se notícia de leite em pó contaminado com *Salmonella* spp. causando surtos em países europeus. Nos últimos anos, verificou-se um grande número de surtos de salmonelose em bebês pelo mundo relacionados ao consumo de FLI contaminadas, geralmente estando ligadas ao “*spray drier*” das fábricas. Crianças e bebês são mais suscetíveis às salmoneloses, e a incidência dessas doenças nesta faixa etária é bem maior que nas pessoas mais velhas, embora, talvez, essa diferença seja tão expressiva pelo fato de muitos adultos negligenciarem a sua saúde, nem sempre buscando ajuda médica quando adoecem. Os cuidadores e as famílias que utilizam as FLI deveriam estar cientes de que estes não são produtos estéreis, e que estão sujeitos a contaminação (ANGULO *et al.*, 2008; GUNN *et al.*, 2016; MAÇI *et al.*, 2015).

Em 2017, diversos bebês tiveram problemas de saúde causados por FLI contaminadas por bactérias do gênero *Salmonella* oriundas de uma mesma indústria francesa (SILVA *et al.*, 2018), e o caso foi amplamente noticiado pela mídia mundial, pois as FLI foram distribuídas não somente na Comunidade Européia (CE) mas também em

54 países externos à CE, e precisaram ser retiradas dos mercados. Segundo os órgãos European Food Safety Authority e European Centre for Disease Prevention and Control (2018), neste surto foi detectada a contaminação de FLI por *Salmonella* Agona (um dos sorotipos utilizados neste trabalho). *S. Agona* é o 10º maior sorotipo de *Salmonella* em número de casos reportados de infecções na União Europeia, já tendo sido reportados dois outros surtos na França associados ao consumo de FLI da mesma empresa em 2004-2005. Com isso, 367 amostras de FLI foram coletadas entre 2005-2013 por alguns países membros da União Europeia para testes, mas com nenhum resultado positivo.

Nos países em desenvolvimento, há maior dificuldade de se reconhecer, com rapidez, os surtos causados por patógenos presentes nas FLI, pois além da falta de laboratórios que testem o sorotipo destes micro-organismos, o que possibilitaria identificar a ligação entre os casos, o investimento público em saúde ainda é precário (ANGULO *et al.*, 2008; GUNN *et al.*, 2016; MAÇI *et al.*, 2015).

## 2.2 SALMONELLA ENTERICA

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos móveis Gram-negativos, aeróbios facultativos, relacionados a *Escherichia coli* e outras bactérias entéricas. As bactérias do gênero *Salmonella* estão presentes no intestino de animais e, por isso, normalmente são encontradas nos esgotos. Há duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é o nome de espécie mais aceito para os membros patogênicos deste gênero de bactérias, que podem estar presentes em alimentos frescos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Segundo Oliveira *et al.* (2013b), há seis subespécies de *Salmonella enterica*:

- *Salmonella enterica* subespécie *enterica*<sup>1</sup>;
- *Salmonella enterica* subespécie *salamae*<sup>2</sup>;
- *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*<sup>2</sup>;
- *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae*<sup>2</sup>;
- *Salmonella enterica* subespécie *houtenae*<sup>3</sup>;
- *Salmonella enterica* subespécie *indica*.

<sup>1</sup> Responde por 99% das salmoneloses em humanos.

<sup>2</sup> Frequentemente isoladas de animais de sangue frio e raramente de humanos ou de animais de sangue quente.

<sup>3</sup> Predominantemente isolada do ambiente e raramente é patogênica para os humanos.

Segundo Forsythe (2013), as *Salmonella* spp. são melhor estudadas de acordo com cada sorotipo. Os sorotipos, apesar de semelhantes, possuem variações genéticas suficientes para se diferenciarem quanto aos seus hospedeiros (que podem ser humanos ou animais) e quanto às doenças que causam. Utilizam-se os antígenos O, H e Vi para diferenciar os sorotipos de *Salmonella* spp. Os principais sorotipos que causam infecções alimentares atualmente são o *S. Enteritidis* e o *S. Typhimurium*, ambos da subespécie *enterica*.

Lamas *et al.* (2018) afirmam que dos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella enterica* existentes, grande parte das pesquisas são dedicadas à *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (que compreende quase 60% deste total), e que muito pouco se estudou, ainda, sobre os sorotipos das outras subespécies de *Salmonella enterica*. As diferentes espécies e subespécies de *Salmonella* foram se diferenciando através de milhões de anos, ao ganharem ou perderem fatores de patogenicidade, e as mais patogênicas para o ser humano são as bactérias da subespécie *enterica*. Outro fator que diferencia o interesse nas pesquisas científicas entre as diferentes subespécies de *Salmonella enterica* é que a subespécie *enterica* está principalmente ligada aos animais de sangue quente, que tem mais contato com os humanos. As outras subespécies estão predominantemente presentes em animais de sangue frio, como répteis e anfíbios.

Normalmente, as salmoneloses de origem alimentar causam náusea, diarreia, dor abdominal, calafrios e febre baixa. Podem causar também cefaleia, vômito e fraqueza. As salmoneloses mais comuns são: febre entérica tifóide (causada pelo sorotipo *S. Typhi*, como na Figura 1), febre entérica paratifóide (causada pelo sorotipo *S. Paratyphi*), gastroenterite (causada pelos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) e doença sistêmica invasiva (causada pelo sorotipo *S. Cholerasuis*) (FORSYTHE, 2013). Na década passada, diversos surtos de salmonelose causadas por alimentos contaminados foram registrados no Brasil (GOMES; FRANCO; MARTINIS, 2013).

Há casos de portadores assintomáticos de bactérias da estirpe *Salmonella Typhi* (um dos sorotipos utilizados neste experimento) que as liberam nas fezes de forma intermitente, e assim, cerca de 2% a 5% dos doentes são contaminados por portadores crônicos. Caso manipulem FLI, o perigo cresce ainda mais. Para que os surtos sejam controlados, é necessário que os pacientes vão aos médicos, e que estes e os laboratórios reportem os casos aos órgãos de saúde pública (HANCOCK-ALLEN, 2016; KOBAYASHI *et al.*, 2016). *Salmonella* Cubana (um dos sorotipos utilizados neste experimento) é um dos agentes bacterianos que mais causam doenças transmitidas por alimentos (DTAs) nos Estados Unidos, e desde que foi descoberta em Cuba em 1946, já foi associada a diversos surtos de DTAs, causando doenças não somente em humanos, mas também em animais (HOFFMANN *et al.*, 2014).

A *Salmonella* spp. continua sendo juntamente com a *Campylobacter* spp. os

maiores agentes bacterianos de gastroenterites nos países desenvolvidos, tendo sido reportados em 2017 um total de 49,8, 21,2 e 14,5 casos de salmonelose a cada 100.000 habitantes na Austrália, na União Européia e nos Estados Unidos, respectivamente. Mas segundo os franceses, grandes consumidores de produtos lácteos, menos de 2% dos surtos de salmonelose estão ligados a derivados do leite. O segredo é evitar a contaminação da matéria-prima, o que facilita a boa qualidade dos seus derivados, pois a FLI é prejudicada principalmente por leite de má qualidade. Deve-se levar em consideração a resistência da *Salmonella* spp. ao processo de secagem da FLI, o que causa muitos danos à saúde, tendo em vista o público alvo que é mais susceptível a doenças, por conta da tenra idade (FOX; JIANG; GOBIUS, 2018).



Figura 1 – Bactérias da estirpe *Salmonella* Typhi observadas por microscopia eletrônica de varredura e coloridas por computador.

Fonte: Adaptada de Green (2018).

Segundo Bula-Rudas, Rathore e Maraqa (2015), algumas das razões pelas quais os bebês são mais propensos às salmoneloses são a hipocloridria (baixa produção de ácido gástrico) e o rápido esvaziamento gástrico. A febre tifóide e suas complicações causam grandes transtornos à saúde das crianças, principalmente nos países em desenvolvimento. Como as bactérias da estirpe *Salmonella* Typhi estão criando resistência muito rapidamente, a antibioticoterapia está se tornando um desafio cada vez maior.

De acordo com Bermúdez-Aguirre e Corradini (2012), já foram estudados diversos tratamentos térmicos (por meio convencional, por micro-ondas, por rádio frequência, por aquecimento ôhmico, por indução, entre outros) e não térmicos (por alta pressão hidrostática, por campos elétricos pulsados, por ultrassom, etc) para a inativação de bactérias do gênero *Salmonella*, mas novos estudos são sempre necessários para que se possa chegar ao melhor tratamento para cada matriz alimentar.

Segundo Forsythe (2013), o tratamento térmico do alimento a 72 °C por 15 segundos (pasteurização rápida) é utilizado para inativar as bactérias patogênicas,

por exemplo, *Salmonella* spp., *Brucella* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*, que normalmente existem no leite fresco. Mas há outros micro-organismos que conseguem sobreviver a este tratamento e, por conseguinte, deteriorar os alimentos.

Os tratamentos não térmicos para combater as bactérias do gênero *Salmonella* são mais eficazes quando combinados entre si. O ozônio, por exemplo, nas formas gasosa ou aquosa, pode ser usado para diminuir drasticamente a presença de bactérias do gênero *Salmonella* em cascas de ovos (que são as principais fontes de salmoneloses) e em tanques de resfriamento de carcaças de aves. A radiação ultravioleta é muito eficaz para a descontaminação de superfícies planas, como as de aço inoxidável, por inibir a replicação bacteriana, mas a eficácia desse processo decai em superfícies irregulares, como peças de carne de frango ou legumes, tipo a couve-flor (BRODOWSKA; NOWAK; ŚMIGIELSKI, 2017; GABRIEL *et al.*, 2018; MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012).

O uso de água eletrolisada (que pode ser gerada no local com água e cloreto de sódio) não gera resíduos tóxicos ao final do processo de desinfecção, mas é mais eficaz para as superfícies de contato com alimentos (como tábuas de corte e ordenhadeiras), brotos e sementes. O uso de bacteriófagos pode ser promissor para vegetais e frutas frescas, mas ainda depende do pH e do tipo de célula hospedeira, e além de terem que ser específicos para cada patógeno, estes ainda podem criar resistência, o que ainda requer muitos estudos para este tipo de sistema de descontaminação (AGUAYO *et al.*, 2017; MILLS; ROSS; HILL, 2017; MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012).

A utilização do ultrassom para inativação de bactérias do gênero *Salmonella* foi mais estudado em líquidos, como leite, água e ovos crus, pois percebeu-se que seu alcance não atinge grandes profundidades em alimentos sólidos; mas o problema do ultrassom é sua pouca eficácia quando utilizado sem o auxílio de outras tecnologias. O dióxido de carbono pressurizado não é tóxico para os consumidores e funciona bem em alimentos líquidos, mas não funciona bem em sólidos, e sua viabilidade na indústria ainda é baixa (GUIMARÃES *et al.*, 2018; MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012).

## 2.3 AQUECIMENTO ÔHMICO

O aquecimento ôhmico (AO) tem este nome devido à Lei de Ohm, representada pela Equação 2.1:

$$V = R \times I, \quad (2.1)$$

onde  $V$  significa voltagem,  $R$  significa resistência elétrica e  $I$  significa corrente elétrica (ICIER, 2012). A voltagem é definida em cada experimento (neste trabalho, foi utilizada de 30 V), e a resistência elétrica utilizada no cálculo é a do próprio alimento, conforme a Figura 2.

Outro parâmetro utilizado para se definir os experimentos com aquecimento ôhmico é a intensidade de campo elétrico ( $V\text{ cm}^{-1}$ ), definida pela Equação 2.2:

$$E = \frac{V}{d}, \quad (2.2)$$

onde  $E$  significa intensidade de campo elétrico,  $V$  significa voltagem e  $d$  significa distância (entre os eletrodos) (COSTA *et al.*, 2018).

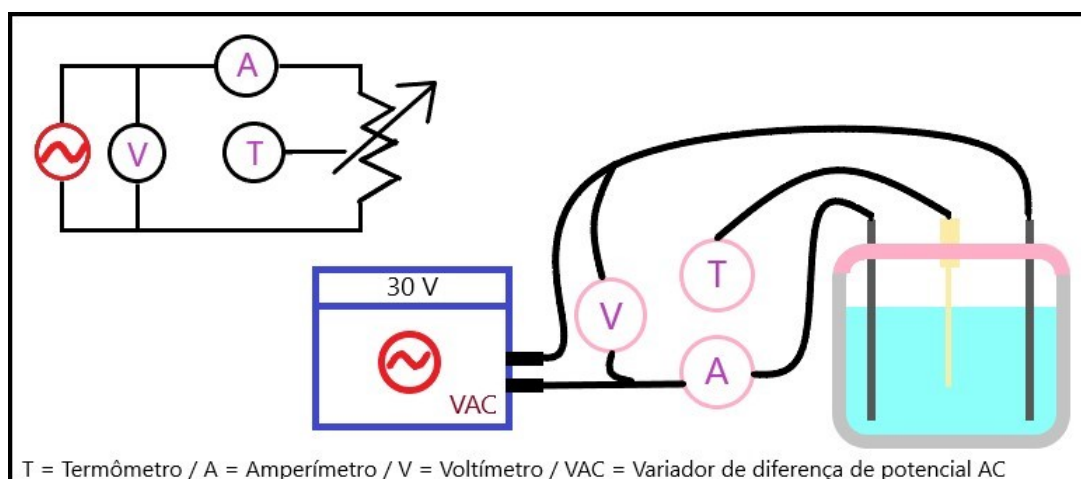


Figura 2 – Esquema de funcionamento do Aquecimento ôhmico (AO).

Uma das vantagens do aquecimento ôhmico é a redução do tempo de aquecimento, e a sua uniformidade, o que causa uma melhor geração de compostos secundários no alimento, como por exemplo, compostos bioativos em alimentos derivados do leite. Além disso, foi indicado que o aquecimento ôhmico deve provocar eletroporação em alguns tipos de bactérias, pois a sua inativação é, em algumas faixas de temperatura, superior à do aquecimento convencional. Por ser dependente da temperatura, a condutividade do alimento varia durante o aquecimento ôhmico, pois as células lesadas pelo calor liberam íons, o que auxilia numa maior condução da energia elétrica (JAEGER *et al.*, 2016; RAMASWAMY *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017; SAKR; LIU, 2014).

O principal efeito causador de morte celular durante o aquecimento ôhmico é o efeito térmico. Além deste, a eletroporação (geração de poros na membrana citoplasmática acarretando em extravazamento de material intracelular) ainda não é totalmente explicada, mas é o principal fator não térmico do aquecimento ôhmico. Os efeitos não térmicos no geral ainda são pouco entendidos, mas a sua presença é nítida quando se comparam os resultados entre os experimentos utilizando aquecimento ôhmico juntamente, em contraste, ao aquecimento convencional (CAPPATO *et al.*, 2017).

Gally *et al.* (2016) relatam que a perda de calor, durante o processamento, é um fator importante a ser levado em conta no aquecimento ôhmico e que a concentração de sal influencia diretamente na condutividade do alimento, e com isso, no seu tempo de aquecimento.

Na Coreia do Sul, foram realizados estudos para inativar *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* em diferentes matrizes alimentares, utilizando-se o aquecimento ôhmico. Lee *et al.* (2012) utilizaram como matrizes o suco de laranja e o suco de tomate com aquecimento ôhmico contínuo, obtendo resultados positivos. Kim e Kang (2015) utilizaram leite desnatado como matriz, também com resultados positivos em relação ao tratamento térmico convencional e, ainda, utilizaram altas frequências, pois na frequência padrão de 60 Hz ocorrem reações eletroquímicas em adição ao fator térmico e nestes estudos os autores quiseram averiguar o efeito térmico em separado. Park, Ha e Kang (2017) também usaram altas frequências, utilizando suco de maçã como matriz, e verificaram que a concentração de sólidos nos sucos também altera a eficiência do tratamento térmico.

Muitos trabalhos vêm destacando a utilização do aquecimento ôhmico para inibição de patógenos em diferentes matrizes alimentares, mas nenhum cita a utilização do aquecimento ôhmico em FLI para inativação de *Salmonella* spp, como por exemplo, Lee *et al.* (2012), Lee, Ryu e Kang (2013), Kim e Kang (2015), Park, Ha e Kang (2017), e Rodrigues *et al.* (2017).

## 2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é utilizada desde a década de 20 do século passado, quando era utilizada para determinar o tempo que os micro-organismos demoravam para morrer em diferentes tipos de aquecimento, o que foi importante para a indústria de enlatados. Estes estudos ficaram estagnados por 6 décadas, até que voltaram a receber atenção e investimentos nos países desenvolvidos em 1983, devido ao aumento de surtos de intoxicação alimentar. Ainda na década de 80, foram criados os primeiros *softwares* para modelagem preditiva de micro-organismos em alimentos, *Food Micromodel* (no Reino Unido), *Pathogen Modeling Program – PMP* (nos EUA) e *Food Linked Agricultural and Industrial Research - FLAIR* (na Europa, com a cooperação de 10 países) (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia que gera modelos matemáticos baseados em dados experimentais, tais como atividade de água, pH, temperatura, entre outros, para modelar as curvas de crescimento ou diminuição de concentração dos micro-organismos em determinado alimento, segundo as condições experimentais. Dessa forma, pode-se prever, com certa confiança, como os micro-



organismos se comportarão em um alimento durante o tempo em que for estocado, ou mesmo de que forma o alimento deve ser tratado para que se evite a proliferação do micro-organismo contaminante, ou mesmo a sua eliminação (OLIVEIRA *et al.*, 2013a). Uma das áreas de estudo da microbiologia preditiva é a conservação dos alimentos e a manutenção de suas características físico-químicas, pois estas propriedades podem variar de acordo com a concentração de micro-organismos presentes nos alimentos e seu tempo de estocagem, e isso pode ser verificado através dos modelos matemáticos (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

Há três níveis de modelos preditivos (CRUZ *et al.*, 2018; FORSYTHE, 2013; SCHLEI *et al.*, 2018):

- Primeiro nível: gera curvas (de temperaturas diferentes) em um gráfico de concentração do micro-organismo (UFC mL<sup>-1</sup>) por tempo (minutos), sem contar com as variáveis do ambiente;
- Segundo nível: explica como a curva do gráfico do primeiro nível varia conforme os diferentes ambientes, tais como pH, temperatura, entre outros, pois as atividades metabólicas dos micro-organismos podem acelerar ou desacelerar conforme aumentam ou diminuem alguma dessas variáveis, e os valores podem ser verificados experimentalmente; e
- Terceiro nível: combina os dois primeiros, para tentar prever como o micro-organismo se comportará, em resposta às mudanças ambientais, utilizando as equações do primário e do secundário e calculando as suas probabilidades de adequação.

O *software* GInaFiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) é um suplemento<sup>4</sup> do Microsoft<sup>®</sup> Office Excel<sup>®</sup> que foi criado para facilitar a modelagem preditiva (nos dois primeiros níveis) para tratamentos de inativação microbiana, e utiliza dez tipos gerais de decaimento (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005; KU Leuven, 2015):

- Regressão Log-Linear;
- Modelo Log-Linear + Ombro;
- Modelo Log-Linear + Cauda;
- Modelo Log-Linear + Ombro + Cauda;

<sup>4</sup> “Os suplementos fornecem comandos e recursos opcionais do Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup>. Por padrão, os suplementos não estão disponíveis imediatamente no Excel<sup>®</sup>, devendo primeiramente ser instalados e (em alguns casos) ativados para que você possa usá-los” (Microsoft<sup>®</sup>, 2018).

- Modelo de Weibull;
- Modelo de Weibull com parâmetro  $p$  fixado;
- Modelo de Weibull + Cauda;
- Modelo de Duplo Weibull;
- Modelo Bifásico;
- Modelo Bifásico + Ombro.

Alguns trabalhos recentes já vem sendo desenvolvidos utilizando estes modelos. Os efeitos do óleo essencial de canela e de nanopartículas de óxido de zinco, por exemplo, já foram estudados para diminuir a concentração de bactérias da espécie *Listeria monocytogenes* em meios líquidos, obtendo-se uma acurácia de quase 99% no modelo comportamental do patógeno (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2017).

Savran, Pérez-Rodríguez e Halkman (2018) estudaram o modelo de sobrevivência de bactérias da estirpe *Salmonella* Enteritidis em iogurte sob armazenamento a diferentes temperaturas, para ajudar a evitar possíveis DTAs. Com base no modelo preditivo, o iogurte deveria ser armazenado a 25 °C ao invés de a 4 °C, como habitual, para que o patógeno estudado tivesse menor chance de sobrevivência, porém, outros patógenos e esporos resistiriam melhor nesta temperatura. Logo, percebeu-se que o ideal é realmente garantir as práticas higiênicas na sua cadeia de produção, pois contaminações com este patógeno advêm da falta delas ou da pasteurização inadequada de um leite cru altamente contaminado. A pasteurização é um processo obrigatório antes da venda do leite no Brasil, para que seja diminuída ou eliminada a sua carga de micro-organismos patogênicos (FELTES; ARISSETO-BRAGOTTO; BLOCK, 2017).

A probabilidade de sobrevivência de bactérias da estirpe *Salmonella* Typhimurium foi avaliada por Koyama *et al.* (2017) de acordo com o tempo utilizado na sua inativação em alimentos com baixa atividade de água, pois uma descontaminação ineficiente pode ser perigosa, devido à virulência do patógeno, que mesmo com poucas células pode causar graves danos ao hospedeiro.

Portela *et al.* (2019) realizaram estudos de inativação de *Salmonella* spp. em FLI por micro-ondas, tratadas em diferentes potências (20, 40, 60, e 80 W), onde conseguiram validar os modelos de decaimento e verificar que em todas as potências utilizadas havia eliminação do patógeno, embora sob 20 W o tempo de tratamento tenha sido pelo menos cinco vezes maior que os demais.

Analisando-se os diferentes modelos preditivos para um conjunto de dados de decaimento microbiano em uma matriz láctea, pode-se verificar principalmente qual é o

modelo que tem o maior valor de  $R^2$ <sup>5</sup>, pois este terá mais chances de ser o modelo que indicará o comportamento do micro-organismo frente às condições impostas pelo tratamento. Também são utilizados o fator bias<sup>6</sup> e o fator exatidão<sup>7</sup> (CHAVES *et al.*, 2014).

## 2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 2.5.1 Concentração de hidroximetilfurfural

O 5-hidroximetilfurfural (HMF), produto intermediário da Reação de Maillard (RM), é indesejável em produtos lácteos líquidos e também é um indicador de tratamento térmico. O HMF livre representa o período pré-aquecimento (HMF produzido até a análise) e o HMF total representa o período pós-aquecimento (o quanto ainda pode ser produzido de HMF) (FRANCISQUINI *et al.*, 2016; NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2016).

### 2.5.2 Índice de soroproteína não desnaturada

O soro do leite é frequentemente utilizado para a verificação dos efeitos térmicos sobre os produtos lácteos, pois as proteínas do soro são diretamente afetadas. WPNI é um marcador químico do “tipo 1” de aquecimento. Segundo o American Dairy Products Institute (ADPI), o índice de soroproteína não desnaturada (WPNI, em inglês) pode ser utilizado para classificar a severidade do tratamento térmico ao qual o produto lácteo foi submetido. Os produtos são classificados como: produto de baixo aquecimento (índices acima de 6 mg WPN mL<sup>-1</sup> de FLI), produto de médio aquecimento (índices entre 1,51 e 5,99 mg WPN mL<sup>-1</sup> de FLI) e produto de alto aquecimento (índices abaixo de 1,50 mg WPN mL<sup>-1</sup> de FLI) (MESHRAM *et al.*, 2018; NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2016).

### 2.5.3 Compostos Bioativos

#### 2.5.3.1 Capacidade antioxidante

Os organismos vivos podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser radicais (por exemplo, superóxido [O<sub>2</sub><sup>-</sup>] ou hidroxila [OH]) ou não-radicaais de

<sup>5</sup> Coeficiente de ajuste, que varia de 0 a 1, indicando percentualmente o quanto os dados obtidos correspondem ao modelo.

<sup>6</sup> Representa o quanto os valores preditos estão na região segura ou insegura da predição.

<sup>7</sup> Indica a precisão dos valores preditos em relação aos encontrados experimentalmente.

oxigênio (por exemplo, peróxido de hidrogênio [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]). Essas ERO podem reagir com as moléculas dos organismos vivos, causando danos, o que pode gerar problemas graves, até câncer. Compostos antioxidantes podem ser enzimáticos (superóxido dismutase, por exemplo) ou não-enzimáticos (por exemplo, vitaminas E e C), e ajudam a combater as ERO. As fórmulas infantis podem conter compostos com características antioxidantes, que são necessários aos lactentes, que produzem cinco vezes mais ERO do que durante a gestação (SHOJI; SHIMIZU, 2019).

### 2.5.3.2 Capacidade de inibição de $\alpha$ -amilase e de $\alpha$ -glicosidase

As enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase são importantes fatores para o aumento da glicemia, pois ajudam a quebrar carboidratos em porções menores que são mais facilmente absorvidas pelo organismo. Os tratamentos para diabetes estão sempre em pesquisas, pois além de matar, pode causar graves sequelas nos portadores desta doença crônica. Compostos que inibem a ação dessas enzimas são de interesse funcional, pois atuam como hipoglicemiantes naturais, diferentemente dos medicamentos, que podem apresentar efeitos colaterais (GRAHAM *et al.*, 2019).

### 2.5.3.3 Capacidade de inibição de enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma das integrantes do processo de vasoconstricção, o que gera um aumento de pressão arterial. Hipertensão é uma das doenças crônicas que mais afetam as pessoas nos últimos anos, de importância mundial. Compostos que inibem a ação da ECA atuam como anti-hipertensivos, tendo uma importância funcional no alimento, prevenindo os efeitos colaterais dos medicamentos (GRAHAM *et al.*, 2019).

## 2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O microscópio eletrônico de varredura trabalha com geração de um feixe de elétrons que interage com a superfície das amostras, e quando esses elétrons se dispersam, geram as imagens. Para melhorar a nitidez da imagem, utiliza-se uma camada condutora por cima da camada da amostra; e é feita uma série de desidratações com diferentes porcentagens de etanol (HICKEY *et al.*, 2015).

### 3 JUSTIFICATIVA

As *Salmonella* spp. são dos principais patógenos responsáveis por DTAs, o que torna este gênero um dos mais importantes a serem estudados, considerando a elevada incidência de casos de contaminação tanto em lactários quanto em residências, não só por manipulação inadequada quanto por micro-organismos provenientes de alimentos mal preparados.

A ideia deste trabalho é proveniente da necessidade de garantir a segurança dos alimentos, principalmente dos consumidos por recém-nascidos, que tem a imunidade ainda em desenvolvimento. A baixa imunidade dos lactentes e uma possível contaminação por bactérias da espécie *Salmonella enterica* nas fórmulas lácteas infantis, com as quais eles muitas vezes são alimentados, são uma combinação desastrosa, para não dizer que pode ser fatal.

A utilização de uma tecnologia emergente, como o aquecimento ôhmico, pode ser de grande ajuda neste processo de inativação de formas vegetativas no alimento, além de possivelmente degradá-lo menos do que o aquecimento convencional, mantendo a sua qualidade nutricional. Ademais, no Brasil quase não há estudos sobre aquecimento ôhmico, carecendo ainda de pesquisas mais aprofundadas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do aquecimento ôhmico na inativação de *Salmonella enterica* em fórmula láctea infantil (FLI), bem como os seus efeitos sobre as características deste alimento.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do uso de aquecimento ôhmico como alternativa ao método tradicional utilizado no processamento de fórmulas lácteas infantis;
- Determinar os parâmetros de inativação de *Salmonella enterica* em diferentes condições do processo de aquecimento ôhmico utilizando-se ferramentas de microbiologia preditiva;
- Avaliar os parâmetros físico-químicos (WPNI, HMF, Compostos Bioativos) da FLI após submissão aos diferentes tratamentos térmicos: ôhmico e convencional;
- Analisar a superfície da membrana bacteriana de *Salmonella enterica* e da FLI após submissão aos diferentes tratamentos térmicos: ôhmico e convencional.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL

A fórmula láctea infantil (FLI) comercial em pó utilizada nesta pesquisa (cuja composição indicada pelo fabricante no rótulo do produto está reproduzida na Tabela 2) foi escolhida por ser mundialmente utilizada na alimentação de lactentes.

Foram solubilizados (com auxílio de agitação magnética e à temperatura ambiente) 30,6 g de FLI em 200 mL de água filtrada para o preparo de cada amostra, respeitando-se assim, as proporções indicadas pelo fabricante.

Tabela 2 – Informação Nutricional da FLI comercial utilizada.

	Quantidade por 100 g	Quantidade por 100 mL
Valor energético	484 kcal = 2025 kJ	66 kcal = 277 kJ
Carboidratos	53 g	7,3 g
Proteínas	9,8 g	1,3 g
Gorduras totais	26 g	3,5 g
Gorduras saturadas	11 g	1,5 g
Gorduras <i>trans</i>	0 g	0 g
Ácido linoleico	4,0 g	0,5 g
Ácido $\alpha$ - linoleico	0,7 g	0,1 g
Ácido docosahexaenóico (DHA)	52 mg	7,0 mg
Ácido araquidônico (ARA)	91 mg	12 mg
Fibras alimentares	5,8 g	0,8 g
Fruto-oligossacarídeos (FOS)	0,6 g	0,08 g
Galacto-oligossacarídeos (GOS)	5,2 g	0,72 g
Sódio	135 mg	18 mg
Cálcio	410 mg	56 mg
Ferro	6,0 mg	0,83 mg
Potássio	490 mg	67 mg
Cloreto	340 mg	47 mg
Fósforo	203 mg	28 mg
Magnésio	34 mg	4,7 mg
Zinco	3,9 mg	0,55 mg
Manganês	73 $\mu$ g	10 $\mu$ g
Cobre	292 $\mu$ g	40 $\mu$ g
Selênio	11 $\mu$ g	1,5 $\mu$ g
Iodo	88 $\mu$ g	12 $\mu$ g
Vitamina A	453 $\mu$ g RE	62 $\mu$ g RE
Vitamina D	8,7 $\mu$ g	1,2 $\mu$ g
Vitamina E	8,0 mg $\alpha$ TE	1,1 mg $\alpha$ TE
Vitamina K	33 $\mu$ g	4,5 $\mu$ g
Vitamina B1	365 $\mu$ g	50 $\mu$ g
Vitamina B2	686 $\mu$ g	90 $\mu$ g
Vitamina B6	294 $\mu$ g	40 $\mu$ g
Vitamina B12	1,3 $\mu$ g	0,18 $\mu$ g
Vitamina C	68 mg	9,5 mg
Niacina	3100 $\mu$ g	420 $\mu$ g
Ácido pantotênico	2400 $\mu$ g	330 $\mu$ g
Ácido fólico	87 $\mu$ g	12 $\mu$ g
Biotina	11 $\mu$ g	1,5 $\mu$ g
Taurina	38 mg	5,2 mg
L-carnitina	7,8 mg	1,1 mg
Colina	91 mg	12 mg
Inositol	32 mg	4,4 mg
Nucleotídeos	24 mg	3,2 mg

Fonte: Informações nutricionais contidas no rótulo do produto comercial utilizado na pesquisa.

## 5.2 ESTIRPES

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho encontram-se descritas na Tabela 3. Essas culturas foram estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em caldo Casoy com 40% (v/v) de glicerol.

Tabela 3 – Estirpes de Referência.

Estirpe	Identificação	Origem
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Typhi	ATCC 19214	American Type Culture Collection
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Typhimurium	ATCC 14028	American Type Culture Collection
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Agona	LMQA-747*	Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos - UNICAMP
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Cubana	LMQA-826*	Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos - UNICAMP
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Mbandaka	LMQA-734*	Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos - UNICAMP

(\*): Estirpes isoladas de produtos lácteos.

Verificou-se que as cinco estirpes aparentemente não interferem no crescimento umas das outras, como se pode observar na Figura 3.



Figura 3 – Crescimento das 5 estirpes de *Salmonella enterica* (indicadas na Tabela 3) em placa contendo ágar Casoy.



### 5.2.1 Preparação do inóculo bacteriano

Individualmente, conforme Figura 5, as estirpes identificadas na Tabela 3 foram inoculadas em placa de petri contendo ágar Casoy (Himedia) e incubadas a 37 °C por 24 horas, para reativação. Colônias isoladas foram repicadas em placas de petri contendo ágar bismuto sulfito (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), um meio seletivo e diferencial para *Salmonella* spp., e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para cada placa (das diferentes estirpes), uma colônia isolada de cor negra e com brilho metálico (típica de *Salmonella* spp. em ágar bismuto sulfito, como na Figura 4) foi repicada em uma nova placa de petri contendo ágar Casoy (Himedia) e incubada a 37 °C por 24 horas.

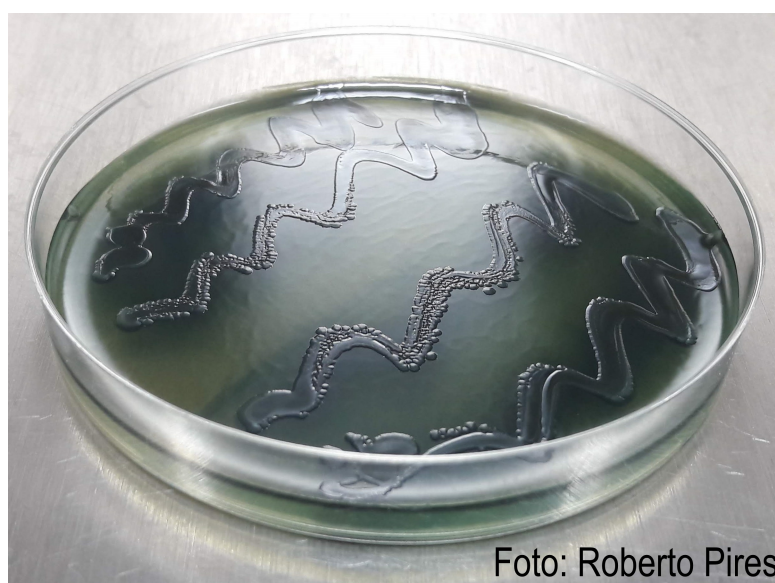


Foto: Roberto Pires

Figura 4 – *Salmonella enterica* em placa contendo ágar bismuto sulfito.

Tubos de ensaio estéreis de vidro com tampa rosqueável contendo, em cada um, 10 mL de solução de NaCl a 0,85% (p/v), foram inoculados com as diferentes estirpes de *Salmonella* spp. utilizadas neste trabalho. Elas foram previamente crescidas, até que se atingisse a concentração de aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> em cada tubo, com o auxílio da escala 5 de McFarland, obtendo-se assim um tubo para cada estirpe. Foram pipetados 3 mL de cada tubo para um único tubo *Falcon* vazio que passou a conter 15 mL de um *pool* de bactérias com a concentração de aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após a centrifugação deste tubo *Falcon* a  $1000 \times g$  (Centrífuga modelo 80-2B, marca CentriBio®) por 25 minutos, o sobrenadante do tubo foi descartado e as células foram ressuspensas em 15 mL de FLI reconstituída (que foram retirados dos 200 mL originais antes do aquecimento), denominado então de inóculo bacteriano. Em seguida, esses 15 mL de inóculo bacteriano foram adicionados ao restante da FLI, no recipiente onde foi realizado o tratamento térmico, de modo a completar o volume final de 200 mL, no momento em que a temperatura da FLI atingiu

a isoterma desejada.

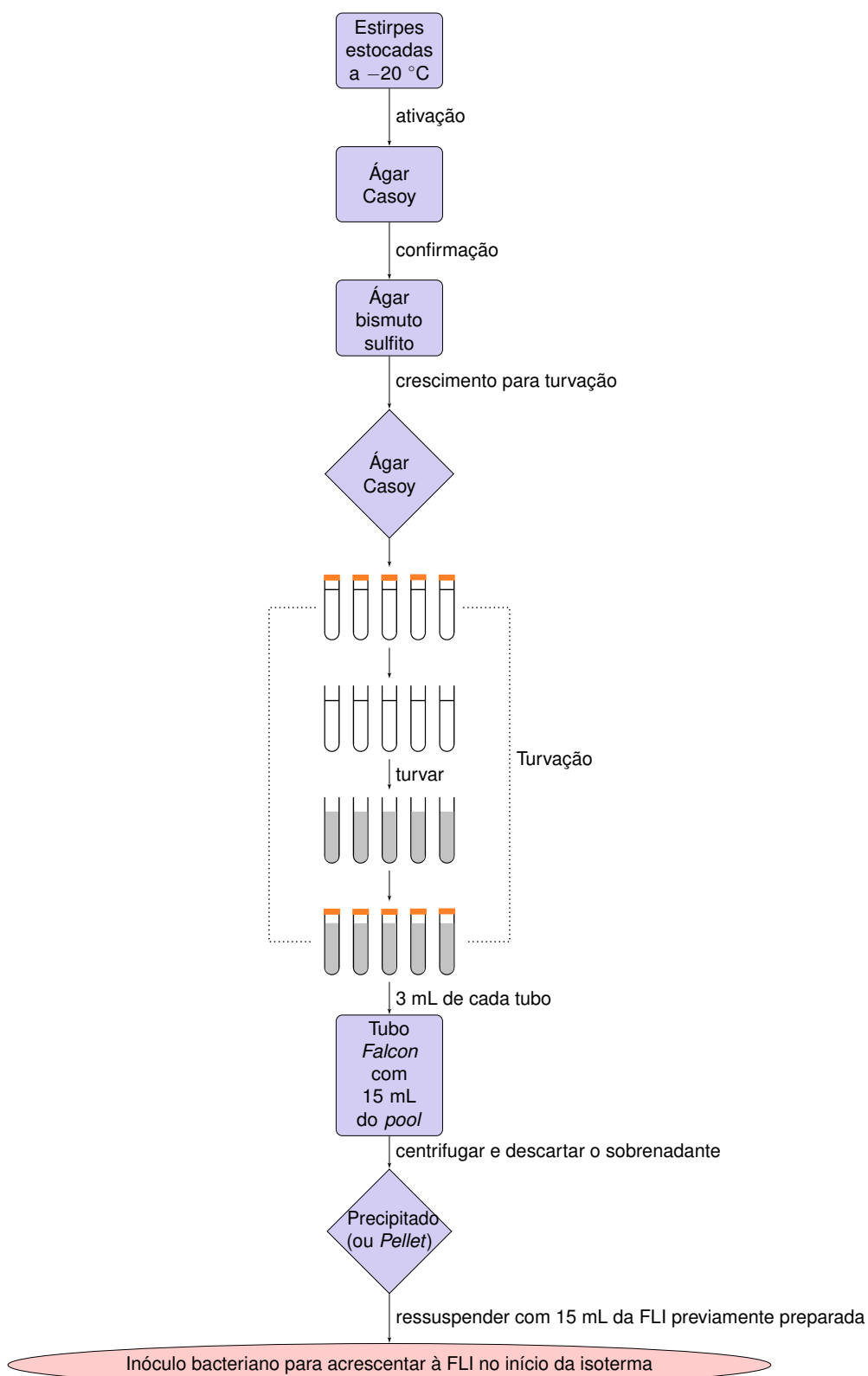


Figura 5 – Fluxograma da Preparação do inóculo bacteriano.

### 5.3 AQUECIMENTO ÔHMICO

O equipamento de Aquecimento Ôhmico (AO) utilizado consiste dos seguintes materiais: um recipiente retangular com 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 7,5 cm de altura, dois eletrodos de aço inoxidável “tipo 316” com 9 cm de comprimento, 0,2 mm de espessura e 8 cm de altura, um provedor de tensão (DDP) - *Variac*, três multímetros (para as medições de voltagem, corrente elétrica e temperatura) e um termopar tipo K, conforme Figura 6.

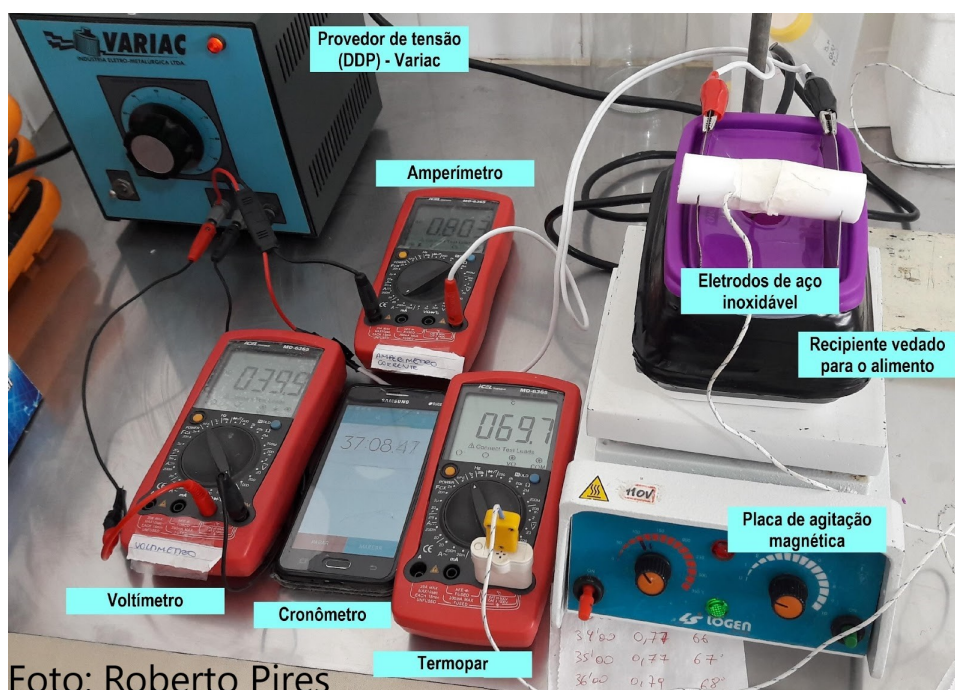


Figura 6 – Equipamento de Aquecimento Ôhmico (AO) do Laboratório de Processamento de Alimentos do IFRJ - *Campus* Rio de Janeiro.

Adaptando-se a metodologia de Rodrigues *et al.* (2017), foram realizados tratamentos térmicos ôhmicos nas amostras, a partir da temperatura ambiente até que se atingiram as temperaturas desejadas (indicadas na Tabela 4). Em seguida, mantiveram-se as isotermas (ligando-se e desligando-se o provedor de tensão (DDP) - *Variac*), utilizando-se a voltagem de 30 V (com intensidade de campo elétrico de  $6 \text{ V cm}^{-1}$ ), com agitação magnética. Os seguintes dados foram quantificados ao longo do tempo: voltagem, temperatura e corrente elétrica.

O tratamento térmico ôhmico foi iniciado à temperatura ambiente (aproximadamente  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), e quando atingiu a temperatura desejada, os 15 mL de FLI reconstituída, contendo o *pool* de bactérias, foram adicionados. Após ligeira homogeneização, foi retirada a 1ª alíquota ( $t = 0$ ) durante a isoterma. Foram coletadas alíquotas da amostra para quantificação de *Salmonella* spp., em intervalos de tempo distintos para cada

isoterma, conforme detalhado na Tabela 4. Em cada experimento foi utilizada apenas uma das isotermas, conforme mostra a Figura 8.

Tabela 4 – Coletas durante as isotermas.

	Aquecimento Ôhmico				Aquecimento Convencional			
	Temperatura da isoterma (°C)				Temperatura da isoterma (°C)			
	50,0	55,0	60,0	65,0	50,0	55,0	60,0	65,0
Tempo (min.:seg.) - após o início da isoterma	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00
	5:00	2:00	0:20	0:15	5:00	2:00	1:00	0:15
	10:00	4:00	0:40	0:30	10:00	4:00	2:00	0:30
	15:00	6:00	1:00	0:45	15:00	6:00	3:00	0:45
	20:00	8:00	1:20	1:00	20:00	8:00	4:00	1:00
	23:00	10:00	1:40	1:15	23:00	10:00	5:00	1:15
	25:00	12:00	2:00	1:30	25:00	12:00	6:00	1:30
	26:00	14:00	2:20	1:45	26:00	14:00	7:00	2:55
	30:00	16:00	2:40	2:00	30:00	16:00	8:00	4:20
	32:00	18:00	3:00	2:15	32:00	18:00	10:00	5:45
	35:00	20:00	3:20	2:30	35:00	20:00	12:00	7:10
	40:00	22:00	3:40	2:45	40:00	22:00	14:00	8:35
	45:00	24:00	4:00	3:00	45:00	24:00	15:00	10:00

Fonte: Adaptada de Rodrigues *et al.* (2017).

Os dados coletados durante o experimento foram dispostos em um gráfico de concentração de *Salmonella* spp. ( $\log$  UFC mL<sup>-1</sup>) por tempo de aquecimento (minutos), para posterior análise dos resultados.

## 5.4 AQUECIMENTO CONVENCIONAL

O equipamento de Aquecimento Convencional utilizado consiste dos seguintes materiais: um recipiente retangular com 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 7,5 cm de altura, um aparelho elétrico de banho-maria (modelo TE-054 MAG, marca Tecnal<sup>®</sup>), um multímetro (para a medição de temperatura) e um termopar tipo K, conforme Figura 7.

Adaptando-se a metodologia de Rodrigues *et al.* (2017), foram realizados tratamentos térmicos convencionais nas amostras, a partir da temperatura ambiente, até que se atingiram as temperaturas desejadas (indicadas na Tabela 4). Em seguida, mantiveram-se as isotermas (aumentando ou diminuindo a temperatura no termostato do banho-maria), com agitação magnética anterior ao início do experimento e leve agitação manual do recipiente durante o experimento. A temperatura foi quantificada ao longo do tempo.

O tratamento térmico convencional foi iniciado à temperatura ambiente (apro-

ximadamente 25 °C), e quando atingiu a temperatura desejada, os 15 mL de FLI reconstituída contendo o *pool* de bactérias foram adicionados. Após ligeira homogeneização, foi retirada a 1ª alíquota ( $t = 0$ ) durante a isoterma. Foram coletadas alíquotas da amostra para quantificação de *Salmonella* spp., em intervalos de tempo distintos para cada isoterma, conforme detalhado na Tabela 4. Em cada experimento foi utilizada apenas uma das isotermas, conforme mostra a Figura 8.

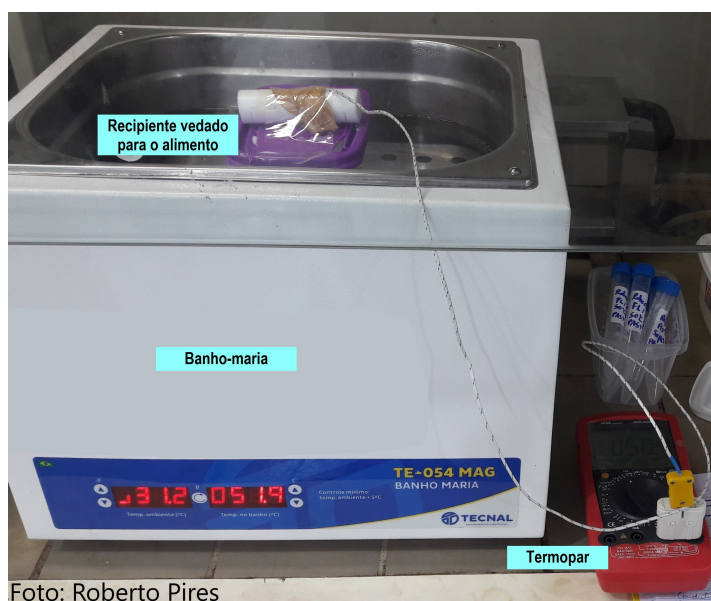


Foto: Roberto Pires

Figura 7 – Equipamento de Aquecimento Convencional (banho-maria) do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do IFRJ - *Campus* Rio de Janeiro.

Os dados coletados durante o experimento foram registrados em um gráfico de concentração de *Salmonella* spp. ( $\log$  UFC mL<sup>-1</sup>) por tempo de aquecimento (minutos), para posterior análise dos resultados.

## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA ENTERICA*

O procedimento que foi realizado foi adaptado da metodologia proposta por Silva *et al.* (2010). Coletas da amostra foram realizadas (seguindo os intervalos de tempo descritos na Tabela 4) com pipetas estéreis descartáveis em tubos tipo *Falcon* estéreis. Foram realizadas diluições seriadas (de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) utilizando solução de NaCl a 0,85% (p/v). Foram inoculadas (em duplicata) alíquotas de cada diluição da amostra pelo método de *spread plate* em placas de petri contendo ágar bismuto sulfito (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Todas as placas de petri foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas. Foi realizada a contagem das colônias para determinação da concentração de *Salmonella* spp. (em  $\log$  UFC mL<sup>-1</sup>) na amostra original no momento de cada coleta, e assim, descrita a curva de inativação da *Salmonella* spp. em fórmulas lácteas infantis utilizando o aquecimento ôhmico.

Este procedimento também foi utilizado para o aquecimento convencional (em banho-maria).

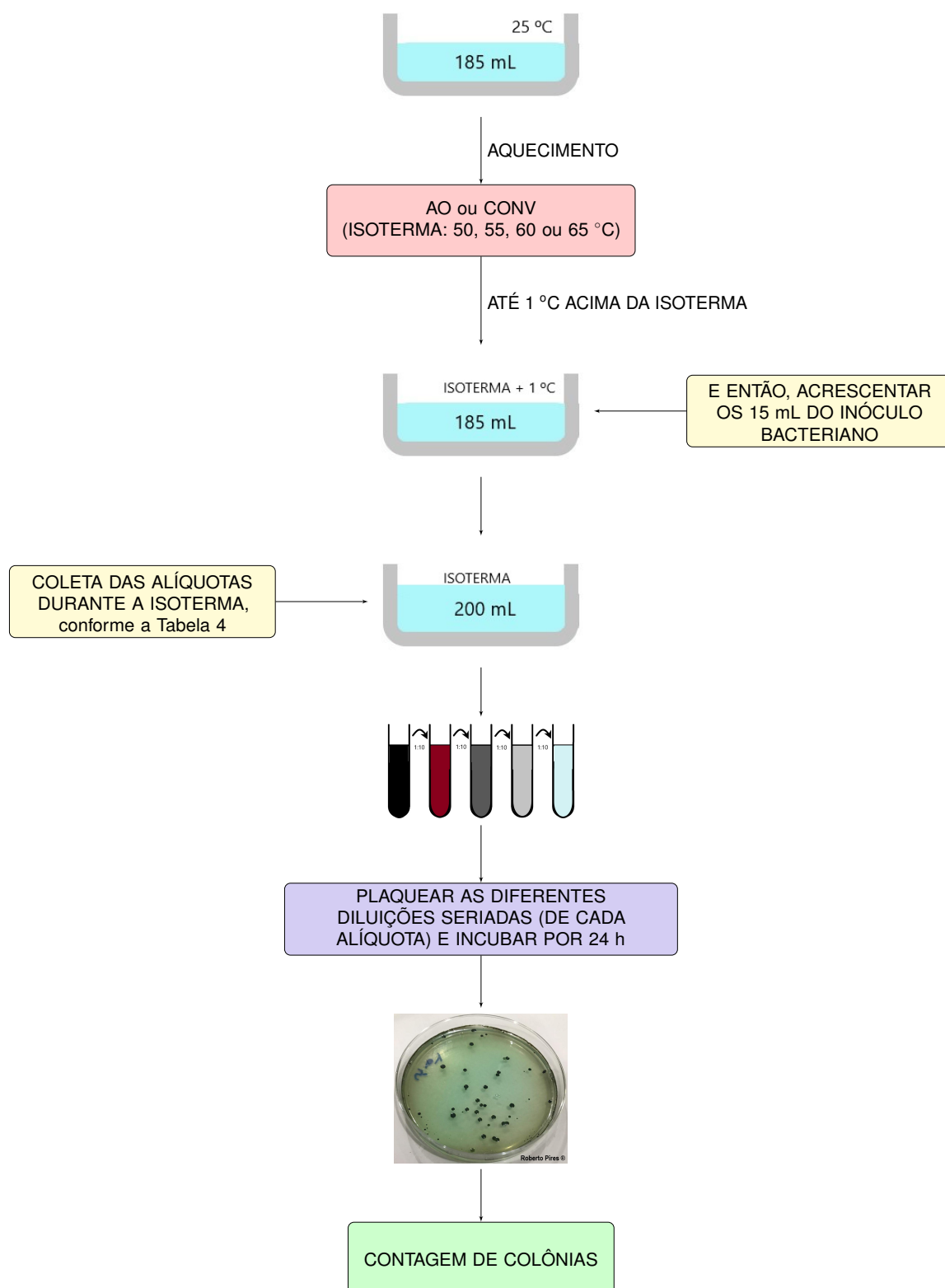


Figura 8 – Fluxograma do Aquecimento (Ôhmico ou Convencional) até a contagem bacteriana.



## 5.6 CONSTRUÇÃO DO MODELO PREDITIVO

Os resultados estatísticos serviram como base para o desenvolvimento de um modelo preditivo de inativação em função da variação da isoterma no tratamento térmico por aquecimento ôhmico, utilizando-se o *software* GlnaFiT versão 1.7.

Foi criada uma tabela no Microsoft® Office Excel® com as colunas Tempo (minutos) e  $\log_{10}(N)$  (onde N é a Concentração de *Salmonella* spp. na FLI em UFC mL<sup>-1</sup>) (conforme Figura 9) para cada isoterma utilizada (conforme Tabela 4), e foi empregado o suplemento GlnaFiT para criar gráficos (conforme Figura 10) de acordo com os dez modelos existentes, para que se verificasse qual era o mais apropriado para o experimento.

Este procedimento também foi utilizado para o aquecimento convencional (em banho-maria).

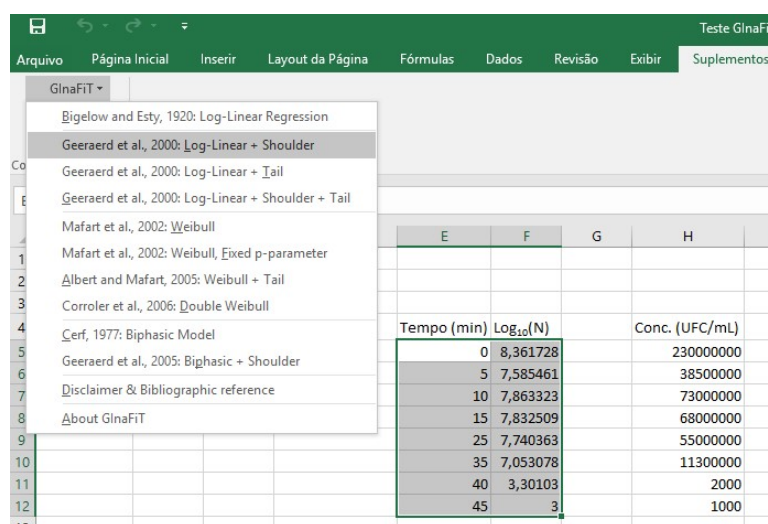


Figura 9 – Opções para escolha do modelo de decaimento com suplemento GlnaFiT do Excel®.

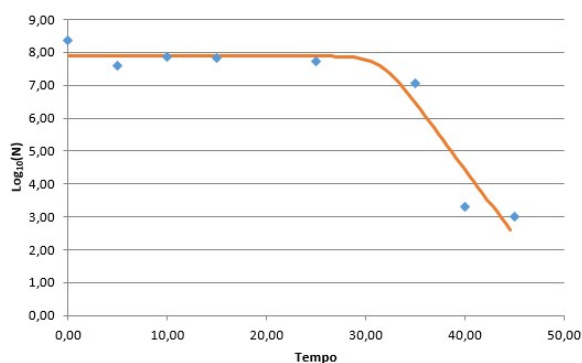


Figura 10 – Exemplo de gráfico de decaimento do “Modelo Log-Linear + Ombro” gerado com o suplemento GlnaFiT do Excel®.

## 5.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA FLI APÓS PROCESSAMENTO

### 5.7.1 Concentração de hidroximetilfurfural

De acordo com a metodologia proposta por Keeney e Bassette (1959 apud NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2016), a concentração de HMF livre foi realizada através de análise espectrofotométrica em meio acidificado, após a amostra de FLI (depois da submissão aos diferentes tratamentos térmicos) ser desproteïnizada com ácido tricloroacético seguida de filtração e de adição de ácido tiobarbitúrico (reagente cromogênico), seguindo-se da leitura da absorvância da amostra em 443 nm. A verificação da concentração de hidroximetilfurfural (em  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) foi possível a partir da construção de uma curva analítica criada com diferentes concentrações padronizadas de hidroximetilfurfural *versus* absorvância.

### 5.7.2 Índice de soroproteína não desnaturada

Segundo metodologia proposta por Kuramoto *et al.* (1959 apud NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2016), o índice de soroproteína não desnaturada (WPNI, em inglês) foi verificado com análise turbidimétrica, depois da amostra de FLI (após submissão aos diferentes tratamentos térmicos) ser submetida ao processo de *salting out*<sup>1</sup> com excesso de cloreto de sódio, seguida de filtração e de adição de ácido clorídrico e solução supersaturada de cloreto de sódio, seguindo-se da leitura da transmitância da amostra em 420 nm. A verificação do WPNI (representado em mg WPN mL<sup>-1</sup> de FLI) foi possível a partir da construção de uma curva analítica criada com diferentes concentrações padronizadas de WPNI *versus* transmitância.

### 5.7.3 Compostos Bioativos

Para as análises dos compostos bioativos, foram preparados extratos segundo metodologia de Rufino *et al.* (2010) com modificações. Aproximadamente 1 g das amostras foram pesadas e os compostos foram extraídos usando 1:10 como a razão amostra/solvente (etanol e água 1:1). Em seguida, foram centrifugados a  $1,25 \times g$  (Mesa Agitadora Orbital Digital modelo SL180/D, Solab, Piracicaba, SP, Brasil) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo e colocados sob refrigeração para posterior análise.

<sup>1</sup> Processo de desnaturação de proteína devido a um aumento brusco de força iônica no meio.



### 5.7.3.1 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante em termos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Onde 2,85 mL de uma solução de DPPH (0,006  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados a 150  $\mu\text{L}$  de cada extrato. Os tubos foram então homogeneizados e mantidos no escuro por 60 min. A absorbância foi verificada a 545 nm utilizando metanol como um branco e os resultados foram expressos em termos de Equivalente de Trolox/g de amostra.

A avaliação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Swain e Hillis (1959) com modificações. Resumidamente, uma alíquota de 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu foi adicionada a um frasco de 10 mL e misturada com 1 mL do extrato. Após 5 minutos, foram adicionados 1,5 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10%. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 725 nm e os resultados expressos em Equivalente de Ácido Gálico por 100 g de peso fresco.

### 5.7.3.2 Capacidade de inibição de $\alpha$ -amilase e de $\alpha$ -glicosidase

Os testes de inibição de  $\alpha$ -amilase e de  $\alpha$ -glicosidase foram realizados de acordo com Lavelli *et al.* (2016), Zhang *et al.* (2011), onde a  $\alpha$ -glicosidase foi determinada usando uma técnica espectrofotométrica pelo 4-nitrofenil-D-glicopiranosídeo (pNPG) como substrato. Tanto o substrato quanto a enzima ( $\alpha$ -glicosidase) foram preparados usando um tampão fosfato (pH 6,8). Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (pH 6,8), 100  $\mu\text{L}$  da solução de enzima (10 unidades  $\text{mL}^{-1}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram misturados em um tubo Eppendorf, sendo incubados a 37 °C por 10 minutos. Seguido pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do substrato (5,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e incubação a 37 °C por 20 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 1 mL de solução de glicina (pH 11). A absorbância foi lida a 400 nm. Todos os resultados foram realizados em triplicata e expressos em média  $\pm$  DP.

A percentagem de inibição foi determinada usando a Equação 5.1:

$$\text{Inibição da } \alpha\text{-glicosidase (\%)} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{fundo}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100, \quad (5.1)$$

onde  $A_{\text{controle}}$  representa a absorbância com a enzima e com o substrato,  $A_{\text{amostra}}$  representa a absorbância com a enzima, com a amostra e com o substrato, e  $A_{\text{fundo}}$  representa a absorbância com a enzima e com a amostra.

Os testes de inibição da  $\alpha$ -amilase foram realizados pela mistura de 100  $\mu\text{L}$  da enzima ( $\alpha$ -amilase) que foi previamente preparada em tampão fosfato pH 6.8) com 100  $\mu\text{L}$  da amostra seguida de 250  $\mu\text{L}$  de solução de amido a 1%, em seguida os tubos

foram incubados a 37 °C por 5 minutos. Depois, a reação continuou com a adição de 150 µL de reagente dinitro salicílico, a mistura foi novamente incubada a 100 °C por 30 minutos. Após o processo de aquecimento, os tubos foram resfriados em banho frio, onde foram adicionados 2 mL de água destilada. As absorbâncias foram lidas a 540 nm. Todos os resultados foram realizados em triplicata e expressos em média ± DP.

A percentagem de inibição foi determinada usando a Equação 5.2:

$$\text{Inibição da } \alpha\text{-amilase (\%)} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100, \quad (5.2)$$

onde  $A_{\text{controle}}$  representa a absorbância com a enzima e com o substrato, e  $A_{\text{amostra}}$  representa a absorbância com a enzima, com a amostra e com o substrato.

### 5.7.3.3 Capacidade de inibição de enzima conversora de angiotensina

A atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada nos filtrados de FLI pelo método de Cushman e Cheung (1971) com algumas modificações. Resumidamente, 200 µL de Hip-His-Leu (5 mmol L<sup>-1</sup> em tampão de borato 0,1 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados com 60 µL de tampão borato (pH 8,3). Depois, 30 µL do filtrado foram incubados a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, 20 µL de ECA (0,1 unidade mL<sup>-1</sup>) foram adicionados e os frascos foram colocados a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 250 µL de uma solução de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl foram adicionados para inativar a enzima. O Ácido Hipúrico foi recolhido utilizando 1,7 mL de acetato de etila para o diluir. Os frascos foram colocados para secar e suspensos em água deionizada para posterior medição da absorbância a 228 nm. A percentagem de inibição foi determinada usando a Equação 5.3:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[ 1 - \frac{C - D}{A - B} \right] \times 100, \quad (5.3)$$

onde  $A$  representa a absorbância com a enzima e nenhuma amostra,  $B$  representa a absorbância sem a enzima e nem amostra,  $C$  representa a absorbância tanto com a enzima quanto com a amostra, e  $D$  representa a absorbância sem a enzima mas com a amostra.

## 5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Baseado no método de Sun *et al.* (2018), as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% preparada com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) durante 24 horas.

As amostras foram então lavadas com tampão fosfato 0,1 M durante 3 vezes. Depois disso, as amostras foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 4 horas, e depois lavadas com água por 4 minutos. Uma série de soluções graduais de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, p/v) foram preparadas para desidratar as amostras, 30 minutos para cada amostra em cada solução de etanol. Após desidratação seriada, as amostras foram secas em um secador de ponto crítico (Leica EM CPD300, Leica Microsystems, Germany). Após secagem, as amostras foram fixadas em stubs de MEV e revestidas por aspensão usando 3 nm de liga de Au / Pd (80/20). As microestruturas da amostra foram examinadas por MEV (Quanta SEM, Thermo Scientific, Oregon, USA) a 5 e 10 kV.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 MICROBIOLOGIA PREDITIVA: AQUECIMENTO ÔHMICO *VERSUS* AQUECIMENTO CONVENCIONAL

A FLI é um importante substituinte nutricional para os lactentes que não conseguem ser nutridos com o aleitamento materno, e dessa forma, devemos garantir que este alimento seja seguro, testando diferentes formas de processamento do mesmo.

Os perfis de tempo  $\times$  temperatura durante os diferentes tratamentos térmicos, tanto nos processamentos ôhmicos quanto nos convencionais, estão demonstrados na Figura 11. É importante verificar que não houve grandes variações entre os pares de isotermas (por exemplo, 60 °C sob aquecimento ôhmico e 60 °C sob aquecimento convencional), pois o que se pretende avaliar são os efeitos não térmicos do aquecimento ôhmico. E tendo em vista que os perfis térmicos são coincidentes, as diferenças nos resultados entre os tratamentos se devem aos efeitos elétricos associados ao tratamento ôhmico, pois é um fator de acréscimo em relação à inativação microbiana.

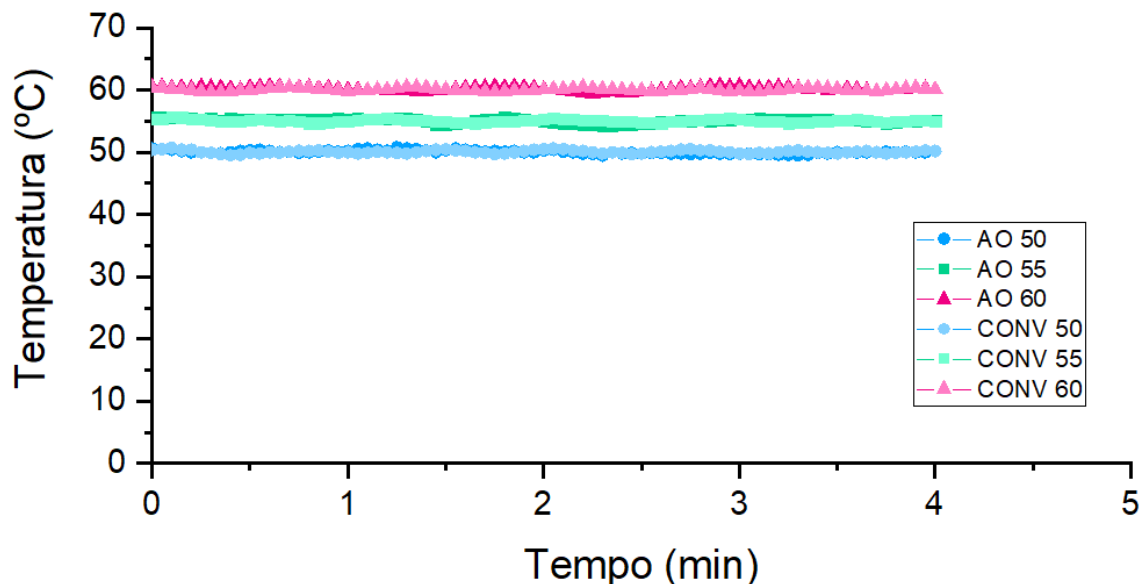


Figura 11 – Perfis de tempo  $\times$  temperatura (com os primeiros 4 minutos de aquecimento isotérmico) dos processamentos ôhmico (AO) e convencional (CONV) conduzidos a 50, 55 e 60 °C.

A contagem bacteriana inicial em todos os tratamentos era de aproximadamente  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. As contagens de todos os experimentos foram realizadas durante as isotermas conforme descrito na Tabela 4, para que ao compararmos as curvas

dos diferentes tratamentos (AO e CONV) de mesma temperatura, fosse possível evidenciar somente os efeitos não térmicos do tratamento ôhmico, como por exemplo a eletroporação.

Desta forma, na Figura 12 podem-se comparar as diferentes curvas de inativação do *pool* de *Salmonella enterica* nas fórmulas infantis durante as mesmas isotermas (nos dois tratamentos, em cada subfigura), além de verificarmos o panorama geral entre as diferentes isotermas (em cada tratamento).

Durante os tratamentos ôhmicos, as reduções parciais (RP) (conforme Equação 6.1) alcançaram valores de 3,04, 4,69 e 5,97 log UFC mL<sup>-1</sup> para as isotermas de 50, 55 e 60 °C, respectivamente. Durante os tratamentos convencionais, as reduções parciais alcançaram valores de 0,91, 3,00 e 5,21 log UFC mL<sup>-1</sup> para as isotermas de 50, 55 e 60 °C, respectivamente. Em comparação, Rodrigues *et al.* (2017) encontraram valores de redução parcial aproximados de 2,20 e 4,30 log UFC mL<sup>-1</sup> na concentração de *Escherichia coli* (bactéria gram negativa assim como a *Salmonella* sp. e também susceptível às mudanças térmicas do meio) em fórmula infantil, utilizando aquecimento ôhmico e aquecimento convencional, respectivamente, a partir do início da isoterma de 60 °C. Mas levando-se em consideração que as bactérias eram dispersas na FLI desde o início do aquecimento (durante a rampa até que se inicie a isoterma), a redução total (RT) (conforme Equação 6.2) utilizando aquecimento ôhmico e aquecimento convencional, respectivamente, foi de aproximadamente 6,50 e 5,80 log UFC mL<sup>-1</sup>. Desse modo, acredita-se que a *Salmonella* spp. é ainda mais resistente aos efeitos térmicos e elétricos que a *Escherichia coli*, o que causa mais preocupação ainda quanto à qualidade das FLI servidas aos lactentes.

$$RP = \log_{10}(C_{I_0}) - \log_{10}(C_{I_F}), \quad (6.1)$$

$$RT = \log_{10}(C_{T_0}) - \log_{10}(C_{I_F}), \quad (6.2)$$

onde  $C_{I_0}$  é a concentração microbiana (em UFC mL<sup>-1</sup>) no início da isoterma,  $C_{I_F}$  é a concentração microbiana (em UFC mL<sup>-1</sup>) ao final da isoterma, e  $C_{T_0}$  é a concentração microbiana (em UFC mL<sup>-1</sup>) no início do tratamento (ainda à temperatura ambiente).

Ao se realizarem os tratamentos térmicos a 50 °C, verificou-se que com o processamento ôhmico, a taxa de redução (TR) (conforme Equação 6.3) foi de aproximadamente 0,07 log UFC mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, enquanto que com o processamento convencional, a taxa de redução foi de aproximadamente 0,02 log UFC mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Ao se realizarem os tratamentos térmicos a 55 °C, verificou-se que com o processamento ôhmico, a taxa de redução foi de aproximadamente 0,19 log UFC mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, enquanto que com o processamento convencional, a taxa de redução foi de aproximadamente 0,12 log UFC mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Ao se realizarem os tratamentos térmicos a 60 °C, verificou-

se que com o processamento ôhmico, a taxa de redução foi de aproximadamente  $1,49 \log \text{ UFC mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , enquanto que com o processamento convencional, a taxa de redução foi de aproximadamente  $0,35 \log \text{ UFC mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

$$TR = \frac{\log_{10}(C_{I_0}) - \log_{10}(C_{I_F})}{t_{I_F} - t_{I_0}}, \quad (6.3)$$

onde  $C_{I_0}$  é a concentração microbiana (em  $\text{UFC mL}^{-1}$ ) no início da isoterma,  $C_{I_F}$  é a concentração microbiana (em  $\text{UFC mL}^{-1}$ ) ao final da isoterma,  $t_{I_F}$  é o tempo final (min.) da isoterma, e  $t_{I_0}$  é o tempo inicial (min.) da isoterma.

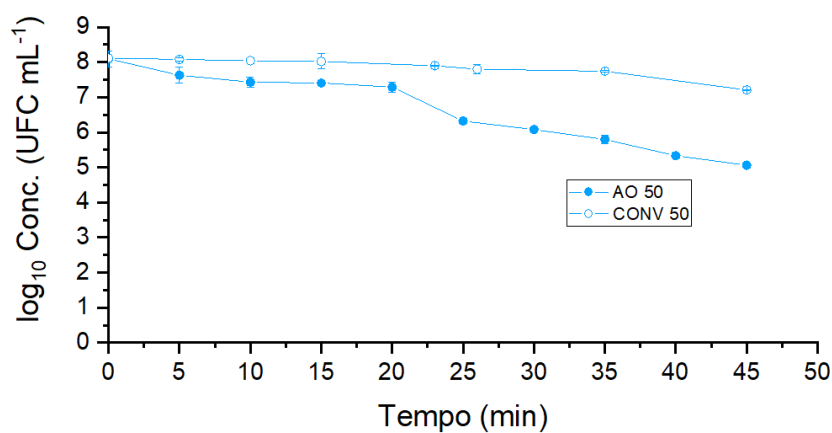
As curvas realizadas com o mesmo perfil de tempo  $\times$  temperatura descrevem um decaimento mais rápido para o tratamento ôhmico que para o tratamento convencional, para todas as isotermas, 50, 55 e 60 °C. As curvas de inativação durante os tratamentos térmicos (ôhmico e convencional) a 65 °C não estão presentes nos gráficos pois o decaimento da concentração de *Salmonella enterica* (em  $\log \text{ UFC mL}^{-1}$ ) teve uma taxa de redução mais alta que a dos demais tratamentos, não havendo tempo hábil para se coletar alíquotas suficientes entre o início da isoterma e o ponto onde não são mais detectadas as unidades formadoras de colônias (pois estavam abaixo do limite de detecção do método, que seria de  $10^1 \text{ UFC mL}^{-1}$  de *Salmonella enterica* na FLI).

Esses dados sugerem que o efeito elétrico adicional ao efeito térmico potencializa o tratamento, gerando uma taxa de decaimento populacional maior; mas em contrapartida, o efeito térmico ainda se mostra como o principal fator de morte celular, pois um tratamento convencional de temperatura superior a outro tratamento ôhmico de temperatura mais baixa, tem maior taxa de decaimento populacional, devido à maior transferência de calor para o meio.

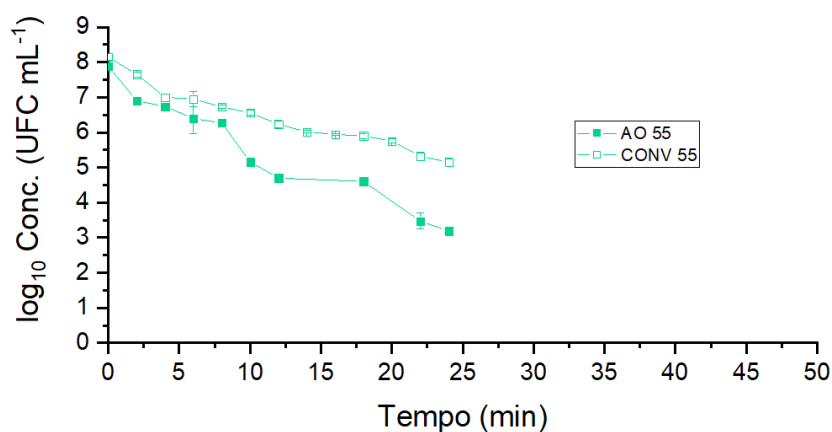
Pode-se averiguar na Figura 12 que as curvas seguem um padrão. Os efeitos não térmicos acrescidos aos efeitos térmicos fazem com que o decaimento das curvas durante os tratamentos ôhmicos sejam mais rápidos do que o decaimento dos seus respectivos pares durante os tratamentos convencionais. Mas pode-se observar que os efeitos térmicos ainda são os principais fatores para a inativação celular, pois quando se compara uma isoterma de tratamento ôhmico com outra isoterma (de temperatura maior) no tratamento convencional, vemos que o decaimento mais rápido é o da isoterma de temperatura maior (por exemplo, AO 50 e CONV 55). Apesar de ambas terem um decaimento de aproximadamente  $3 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ , a segunda curva tem duração próxima à metade da duração da primeira curva.

Lee, Ryu e Kang (2013) verificaram que a inativação de *Salmonella Typhimurium* em molho de tomate tratado por aquecimento ôhmico ocorreu em tempo inferior a 2 minutos quando tratado a 90 °C, corroborando que mesmo em diferentes matrizes

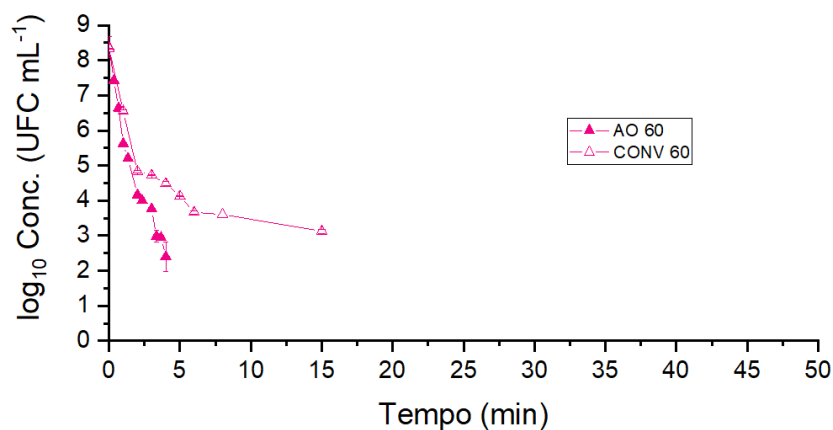
alimentares, os micro-organismos tendem a seguir um padrão de inativação, tendo em vista a sua resistência ao calor.



(a) 50 °C

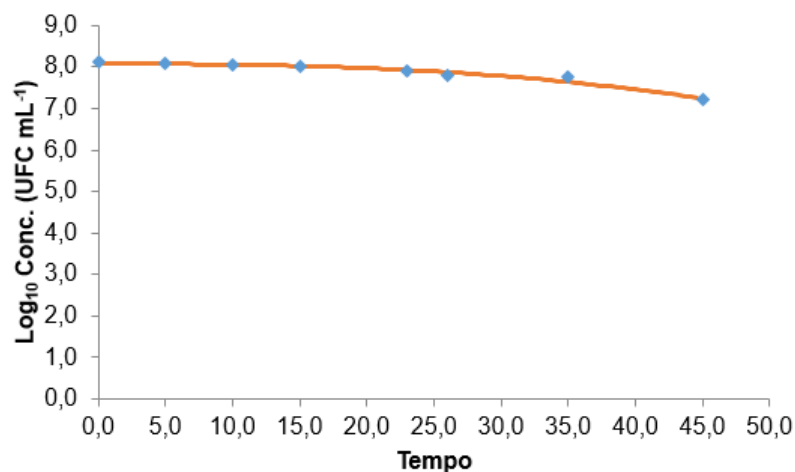


(b) 55 °C

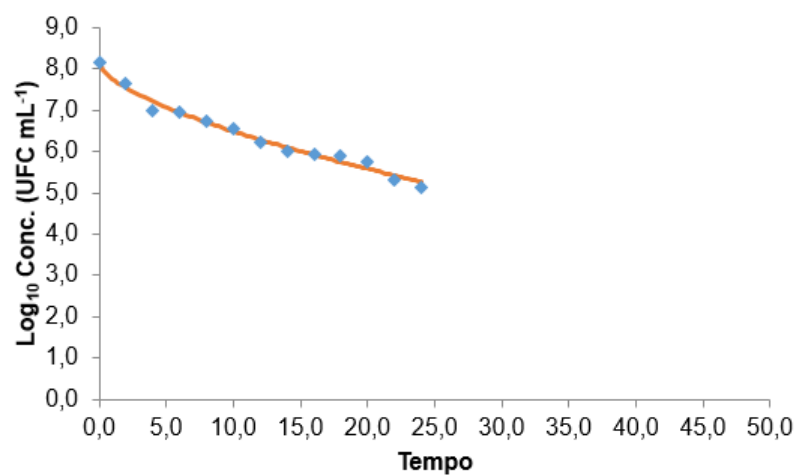


(c) 60 °C

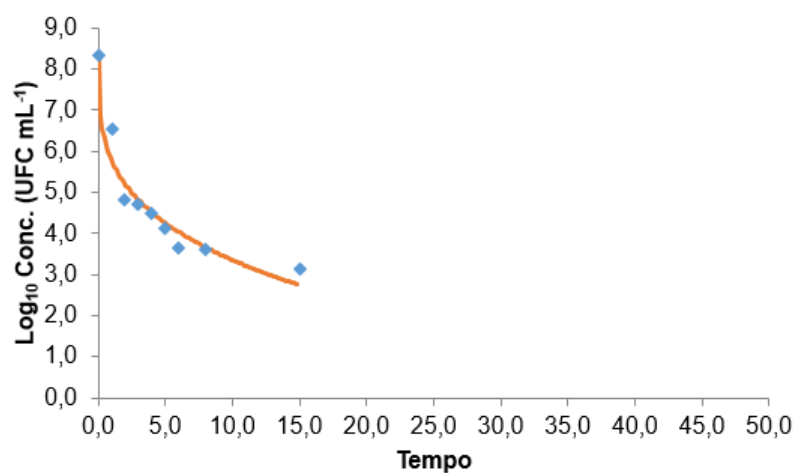
Figura 12 – Inativação de *Salmonella enterica* em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, conforme explicado no final da Figura 5. Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise realizada em duplicata.



(a) CONV 50



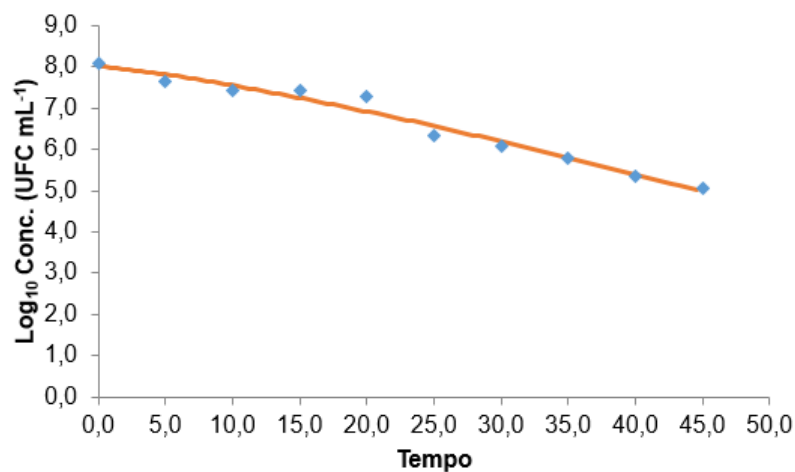
(b) CONV 55



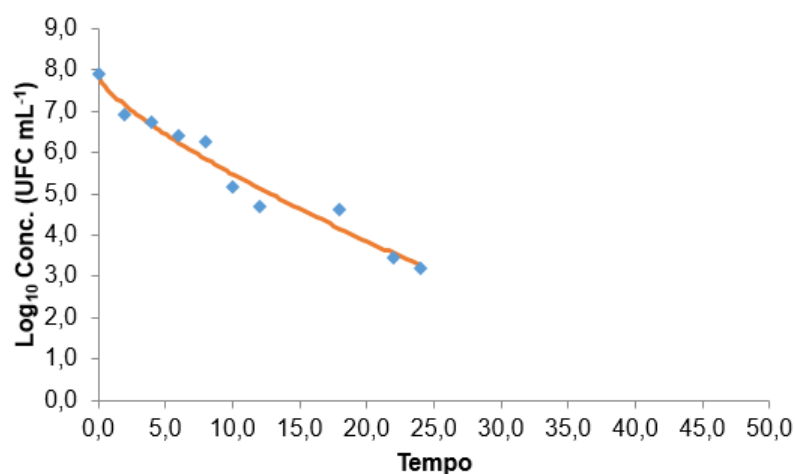
(c) CONV 60

Figura 13 – Inativação de *Salmonella enterica* em FLI tratadas por aquecimento convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, segundo o modelo de decaimento “Weibull”. Os valores correspondem à média de dois experimentos.

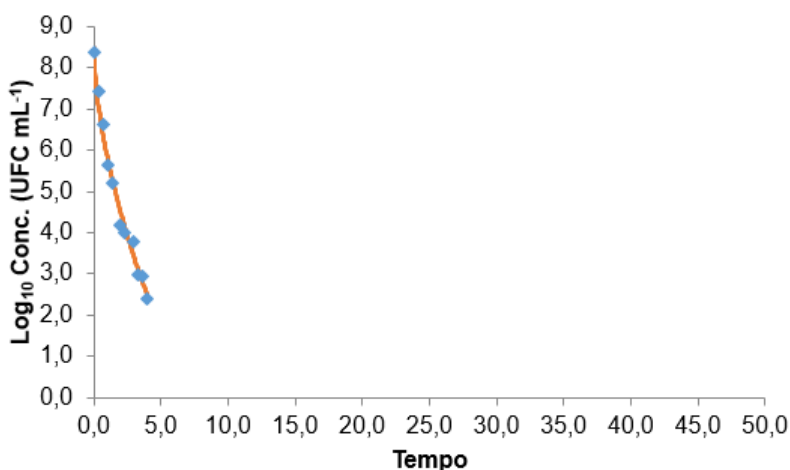




(a) AO 50



(b) AO 55



(c) AO 60

Figura 14 – Inativação de *Salmonella enterica* em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C, segundo o modelo de decaimento “Weibull”. Os valores correspondem à média de dois experimentos.

Na Figura 13 e na Figura 14, obtidas com o auxílio do software GlnaFiT (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005; KU Leuven, 2015), observam-se as representações gráficas das curvas de inativação de *Salmonella enterica* em FLI durante os 6 tratamentos térmicos, convencional e ôhmico, respectivamente. Apresentam-se os resultados obtidos experimentalmente e os estimados pelo modelo matemático de “Weibull” (modelo de decaimento que se encaixou para todos os tratamentos utilizados neste experimento), representado pela Equação 6.4 proposta por Mafart *et al.* (2002):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p, \quad (6.4)$$

onde  $N_0$  é a concentração microbiana inicial (em UFC mL<sup>-1</sup>),  $N$  é a concentração microbiana (em UFC mL<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  (em minutos), delta ( $\delta$ ) é o parâmetro relacionado à escala e pode ser representado como o tempo (em minutos) necessário para a primeira redução decimal (se  $p = 1$ ), e  $p$  é o parâmetro relacionado à forma da curva de inativação, pois se  $p < 1$ , o modelo de Weibull se apresenta como uma curva côncava para cima (formato de cauda) e se  $p > 1$ , o modelo de Weibull se apresenta como uma curva côncava para baixo (formato de ombro) (FURTADO, 2017).

Com os valores de  $\delta$  e de  $p$ , foram calculados os tempos necessários para ocorrer uma redução de  $5 \log(t_{5d})$  (US Food and Drug Administration *et al.*, 2001) como demonstrado na Equação 6.5, onde  $x$  é igual a 5:

$$t_{xd} = \delta \times x^{\left(\frac{1}{p}\right)} \quad (6.5)$$

Segundo Spector e Kenyon (2012), diversos fatores de resistência ao estresse térmico são encontrados nos vários sorotipos de *Salmonella enterica*, como a resposta de choque térmico citoplasmática controlada pelo fator sigma de choque térmico clássico  $\sigma^H$  e a resposta extracitoplasmática regulada pelo fator sigma de função extracitoplasmática (FEC) de choque térmico  $\sigma^E$ , responsáveis por evitar que más formações tanto no citoplasma quanto na membrana externa aconteçam devido ao aumento da temperatura a que os micro-organismos são expostos. Como alguns dos sorotipos de *Salmonella enterica* utilizados nesta pesquisa (ou mesmo variações mutantes) podem não ter algum destes fatores de resistência, isso pode sugerir o porquê da não linearidade das curvas de inativação da Figura 13 e da Figura 14. Segundo Yadav *et al.* (2016), os genes de tolerância ao estresse térmico são expressos em poucos minutos.

Rodrigues *et al.* (2017) citam que com tratamentos térmicos mais lentos, os micro-organismos conseguem se adaptar melhor ao aquecimento, tendo uma

taxa de inativação menor, como realmente é demonstrado na Figura 12a, onde os tratamentos a 50 °C tem um decaimento mais suave que os dos tratamentos com temperaturas mais altas. Para a inativação de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* em FLI por aquecimento ôhmico, constataram que o modelo de decaimento mais adequado segundo o software GlnaFiT (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005; KU Leuven, 2015) foi o modelo “log linear mais cauda”.

Com o auxílio da Tabela 5, verifica-se que as curvas ajustaram-se bem ao modelo de decaimento escolhido, tendo em vista que os valores dos parâmetros utilizados para avaliar esta adequação, Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) e Raiz do Erro Médio Quadrático (RMSE, em inglês), estavam altos (acima de 0,95) e relativamente baixos (abaixo de 0,5), respectivamente, para todos os seis processamentos. Pode-se perceber também que dentre todos os tratamentos realizados, somente aqueles sob isoterma de 50 °C geraram curvas em formato de ombro ( $p > 1$ ), tendo uma inativação mais suave do pool de *Salmonella enterica*. Nos tratamentos com as temperaturas maiores (55 e 60 °C), a inativação do pool de *Salmonella enterica* é mais intensa, gerando curvas em formato de cauda ( $p < 1$ ). Os valores de  $p$  são inversamente proporcionais às temperaturas, em ambos os tratamentos, demonstrando que quanto maior a temperatura, mais intenso é o decaimento da concentração bacteriana na FLI. Pode-se ver a mesma relação tanto entre as temperaturas e os valores de  $\delta$  (aproximadamente o tempo necessário para diminuição de 90% da concentração do patógeno) quanto entre as temperaturas e os valores de  $t_{5d}$  (aproximadamente o tempo necessário para diminuição de 5 log da concentração do patógeno).

De acordo com Silva e Gibbs (2012), o modelo de decaimento não linear de *Salmonella* sp. mais utilizado nos alimentos de origem animal com alta umidade é o Modelo de Weibull, geralmente em formato de cauda (como nos processos ôhmico e convencional a 55 e 60 °C). Bermúdez-Aguirre e Corradini (2012) reafirmam que o decaimento linear é exceção nos tratamentos térmicos isotérmicos, devido à mistura de diferentes sub-populações de micro-organismos, e aos efeitos protetores das células já mortas, ou de alguns componentes dos alimentos. Há ainda outras razões, como os fatores letais adicionais das tecnologias emergentes, e por isso, não se usam os parâmetros  $D$  e  $z^1$  para avaliação das curvas, e sim  $p$  e  $\delta$ , conforme analisado na Tabela 5. Principalmente não se utiliza o parâmetro  $z$  (que indica quantos graus são necessários que se aumente a temperatura do meio para que se decaia 90% da população microbiana), pois não há aumento de temperatura durante o tratamento. Pode-se calcular o  $T_R$  (similar ao  $D$ ), conforme mostrado na Tabela 5, que também representa o decaimento de 1 log UFC mL<sup>-1</sup>, através da Equação 6.6 adaptada de Liu *et al.* (2019):

<sup>1</sup>  $D$  e  $z$  - Parâmetros utilizados em curvas do tipo Log-Linear.

$$T_R = \delta \times 2,303\left(\frac{1}{p}\right) \quad (6.6)$$

Tabela 5 – Parâmetros estatísticos ajustados ao modelo Weibull para avaliação da sobrevivência de *Salmonella enterica* em FLI submetidas aos aquecimentos ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C.

Tratamento	Temperatura (°C)	R <sup>2</sup>	RMSE	p	δ (minutos)	t <sub>5d</sub> (minutos)	T <sub>R</sub> (minutos)
AO	50	0,9699	0,2082	1,27	18,75	66,58	36,16
	55	0,9645	0,3307	0,76	3,24	26,93	9,71
	60	0,9861	0,2583	0,59	0,19	2,91	0,78
CONV	50	0,9673	0,0634	2,60	48,25	89,60	66,50
	55	0,9835	0,1231	0,63	4,48	57,64	16,84
	60	0,9511	0,4200	0,28	0,03	9,41	0,59

Nota: R<sup>2</sup> - Coeficiente de Determinação. RMSE (em inglês) - Raiz do Erro Médio Quadrático. p - Indicação do formato da curva. δ e T<sub>R</sub> - Tempo aproximado para decaimento de 1 log UFC mL<sup>-1</sup>. t<sub>5d</sub> - Tempo aproximado para decaimento de 5 log UFC mL<sup>-1</sup>.

## 6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 6.2.1 HMF

Hidroximetilfurfural é um subproduto da Reação de Maillard (RM), e é utilizado como um marcador químico de aquecimento. Verificou-se que independentemente do processamento utilizado, as concentrações de HMF livre são relativamente menores quando a FLI é tratada a 50 °C do que nas temperaturas maiores, apresentando os menores valores de ambos (9,17 e 9,43 μmol L<sup>-1</sup>, CONV e AO, respectivamente, p<0,05), como demonstrado na Tabela 6. Quanto maior o aquecimento, maior tende a ser a formação de HMF, pois a RM tende a ser mais intensa. Independentemente da temperatura do tratamento, apesar da falta de significância, o tratamento ôhmico apresentou valores de HMF livre maiores do que o tratamento convencional. Com relação a este fator, sugere-se que o aquecimento ôhmico não tem diferença significativa na formação deste subproduto da RM, mas sim, a temperatura do tratamento em que a FLI será tratada, sendo mais preservado o valor nutricional da FLI a 50 °C (MESHRAM *et al.*, 2018; RITOTA *et al.*, 2017).

Sabater *et al.* (2018) confirmaram que independentemente do tratamento térmico realizado, um dos fatores que mais interferem com as diferentes concentrações de HMF formadas nas FLI são as características das próprias FLI, como as diferentes fontes de proteínas e carboidratos, por exemplo. O aumento de subprodutos tóxicos

com o aumento da temperatura do tratamento pode mesmo que em baixo percentual ter interferido num maior decaimento das concentrações bacterianas nas FLI.

Tabela 6 – Índice de soroproteína não desnaturada (WPNI) e Concentração de Hidroximetilfurfural livre (HMF livre) de FLI submetidas aos aquecimentos ôhmico (AO) e convencional (CONV).

Tratamento	Temperatura (°C)	WPNI (mg WPN mL <sup>-1</sup> de FLI)	HMF livre (μmol L <sup>-1</sup> )
AO	50	6,32 <sup>a</sup> ± 0,02	9,43 <sup>a,b</sup> ± 0,30
	55	5,43 <sup>b</sup> ± 0,02	10,27 <sup>a</sup> ± 0,15
	60	6,24 <sup>a</sup> ± 0,03	11,27 <sup>a</sup> ± 0,07
	65	6,28 <sup>a</sup> ± 0,06	11,00 <sup>a</sup> ± 0,15
CONV	50	5,45 <sup>b</sup> ± 0,05	9,17 <sup>b</sup> ± 0,37
	55	6,85 <sup>a</sup> ± 0,03	9,90 <sup>a</sup> ± 0,22
	60	5,74 <sup>a,b</sup> ± 0,03	9,32 <sup>a,b</sup> ± 0,30
	65	6,09 <sup>a</sup> ± 0,02	10,64 <sup>a</sup> ± 0,07

Nota: Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Análises realizadas em triplicata. <sup>a-b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras (p<0,05) pelo teste de Fisher.

Segundo Chávez-Servín *et al.* (2015), HMF é citotóxico (em altas concentrações), sendo irritante para os olhos, trato respiratório superior, pele e mucosas, e seus níveis devem ser mantidos o mais baixo possíveis. Dessa forma, deve-se evitar ao máximo a formação deste composto nas FLI, pois ainda não se sabe o limite máximo seguro da ingestão de HMF na dieta, já tendo sido registrada a sua atividade nefrotóxica em camundongos. Zhu *et al.* (2018) afirmam que as FLI se deterioram a temperaturas mais baixas devido à oxidação lipídica, e em temperaturas mais altas devido à adição da Reação de Maillard, que tem como subproduto o HMF.

### 6.2.2 WPNI

Encontram-se na Tabela 6 os valores do WPNI nas fórmulas infantis submetidas aos aquecimentos ôhmico e convencional, que é outro marcador químico de aquecimento. Para os valores de WPNI, de modo geral, pode-se observar que com exceção dos tratamentos a 55 °C (5,43 e 6,85 mg WPN mL<sup>-1</sup> de FLI, AO e CONV, respectivamente, p<0,05), os tratamentos ôhmicos apresentam valores maiores do que os tratamentos convencionais em cada temperatura. Isso indica que os tratamentos que em geral têm uma duração menor (utilizando a mesma temperatura) mantêm a concentração de proteínas do soro não desnaturadas relativamente maior, o que

pode indicar que quanto mais tempo durar o aquecimento maiores são as chances de desnaturar as proteínas do soro. Todas as amostras tiveram resultados considerado-as como de baixo ou médio aquecimento, o que corrobora todos como bons resultados, pelo ponto de vista de que tratamentos considerados como de alto aquecimento geram interações entre  $\beta$ -lactoglobulinas e  $\kappa$ -caseínas por meio de ligações dissulfídicas. Isso tornaria as FLI mais hidrofóbicas, interferindo nas suas propriedades funcionais e sensoriais, gerando compostos tóxicos e diminuindo a biodisponibilidade de minerais ao consumidor (MESHRAM *et al.*, 2018; NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Liu *et al.* (2012) demonstraram que tratamentos mais intensos (com temperaturas mais altas e por menor tempo) geram menores valores de WPNI em fórmulas infantis, pois as proteínas se desnaturam mais facilmente com o aquecimento abrupto. Mas segundo a Tabela 6, a diferença entre as temperaturas de tratamento e os diferentes processamentos não parecem ter interferido significativamente na desnaturação das proteínas da FLI.

O aumento da desnaturação de proteínas tanto das da FLI quanto das células bacterianas com o aumento da temperatura do tratamento pode mesmo que em baixo percentual ter interferido num maior decaimento das concentrações bacterianas nas FLI.

### 6.2.3 Compostos Bioativos

Conforme a Tabela 7, com exceção da análise de inibição da  $\alpha$ -amilase ( $43,15 \pm 0,08$  a  $43,86 \pm 0,75\%$ , para CONV a  $50^\circ\text{C}$  e para AO a  $55^\circ\text{C}$ , respectivamente), foi observada uma diferença significativa entre o aquecimento ôhmico e o processamento convencional para todos os compostos bioativos ( $p < 0,05$ ). No geral, o AO apresentou maior preservação de compostos bioativos em relação ao processamento convencional ( $p < 0,05$ ), o que foi demonstrado com o DPPH ( $9,74 \pm 0,07$ ,  $9,74 \pm 0,03$  e  $9,61 \pm 0,03 \mu\text{M Trolox Eq/g}$ , a  $55$ ,  $60$  e  $65^\circ\text{C}$ , respectivamente), TPC (Compostos Fenólicos Totais) ( $88,31 \pm 1,47$ ,  $86,43 \pm 0,27$ ,  $87,58 \pm 0,52$  e  $85,56 \pm 0,38 \mu\text{g de Eq/g de Ácido Gálico}$ , a  $50$ ,  $55$ ,  $60$  e  $65^\circ\text{C}$ , respectivamente) e ECA (Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina) ( $35,00 \pm 0,26$ ,  $38,27 \pm 0,21$  e  $38,87 \pm 0,21\%$  a  $55$ ,  $60$  e  $65^\circ\text{C}$ , respectivamente), exceto para amostras tratadas a  $50^\circ\text{C}$  ( $9,29 \pm 0,01 \mu\text{M Trolox Eq/g}$  e  $23,37 \pm 0,47\%$ , para DPPH e ECA, respectivamente,  $p > 0,05$ ). Quanto ao nível de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, independentemente das tecnologias realizadas,  $65^\circ\text{C}$  ( $44,02 \pm 2,30$  e  $46,25 \pm 1,65\%$ , para AO e CONV, respectivamente) apresentaram os melhores valores para este estudo.

Tabela 7 – Compostos Bioativos presentes na FLI: Capacidade antioxidante e Capacidades de Inibição da  $\alpha$ -amilase, da  $\alpha$ -glicosidase e da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

Tratamento	Temperatura (°C)	DPPH ( $\mu$ M Trolox Eq/g)	TPC ( $\mu$ g Ácido Gálico Eq/g)	CI $\alpha$ -amilase (%)	CI $\alpha$ -glicosidase (%)	CI ECA (%)
AO	50	9,29 <sup>e</sup> $\pm$ 0,01	88,31 <sup>a</sup> $\pm$ 1,47	43,32 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	41,91 <sup>b</sup> $\pm$ 0,07	23,37 <sup>f</sup> $\pm$ 0,47
	55	9,74 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	86,43 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27	43,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,75	42,01 <sup>b</sup> $\pm$ 0,12	35,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,26
	60	9,74 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	87,58 <sup>a</sup> $\pm$ 0,52	43,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,78	42,93 <sup>b</sup> $\pm$ 1,93	38,27 <sup>b</sup> $\pm$ 0,21
	65	9,61 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	85,56 <sup>b</sup> $\pm$ 0,38	43,81 <sup>a</sup> $\pm$ 0,50	44,02 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,30	38,87 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21
CONV	50	9,41 <sup>d</sup> $\pm$ 0,00	81,45 <sup>e</sup> $\pm$ 0,07	43,15 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	41,97 <sup>b</sup> $\pm$ 0,17	13,63 <sup>h</sup> $\pm$ 0,21
	55	9,47 <sup>c</sup> $\pm$ 0,03	80,27 <sup>f</sup> $\pm$ 0,48	43,24 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	42,87 <sup>b</sup> $\pm$ 1,47	21,73 <sup>g</sup> $\pm$ 0,35
	60	9,65 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02	84,13 <sup>c</sup> $\pm$ 0,69	43,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,46	43,17 <sup>b</sup> $\pm$ 1,24	28,10 <sup>e</sup> $\pm$ 0,26
	65	9,59 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	82,62 <sup>d</sup> $\pm$ 0,48	43,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	46,25 <sup>a</sup> $\pm$ 1,65	33,93 <sup>d</sup> $\pm$ 0,55

Nota: Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Análises realizadas em triplicata. <sup>a-h</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Fisher.

### 6.3 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA BACTERIANA E DA FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) analisa tridimensionalmente a superfície das amostras submetidas a ela, e com isso, podem-se avaliar os danos nas células de *Salmonella enterica*, devido às deformações apresentadas em sua membrana citoplasmática. Pode-se verificar também a estrutura da fórmula infantil, que atua como provável proteção às células frente aos tratamentos térmicos.

Conforme observado na Figura 15, na Figura 16 e na Figura 17, pode-se perceber que os danos às células microbianas são cada vez mais intensos ao passo que a temperatura de tratamento aumenta. Corroborando o já percebido nos gráficos da Figura 12, da Figura 13 e da Figura 14, a microscopia eletrônica de varredura revela também um efeito mais deletério nas células tratadas por aquecimento ôhmico em relação às tratadas pelo aquecimento convencional, quando utilizada a mesma temperatura em ambos.

Os controles, presentes na Figura 15, demonstram como a superfície microbiana estava antes dos tratamentos térmicos, com poucas deformações na membrana citoplasmática, assim como também mostra a estrutura da FLI antes do aquecimento, mais concisa e sem *Salmonella enterica* (antes da contaminação proposital do experimento).

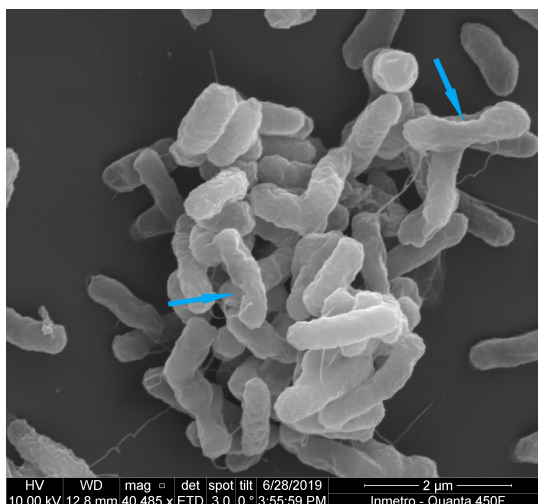
Verifica-se na Figura 16a que as células de *Salmonella enterica* tratadas a 50 °C no aquecimento convencional estão com danos na membrana quando se comparam aos controles, mas estes danos são mais leves quando comparados aos danos nas células da Figura 16b e aos danos nas células da Figura 17a, tratadas a 55 °C no aquecimento convencional e tratadas a 50 °C no aquecimento ôhmico, respectivamente.

Na Figura 16b, já começam a aparecer células lisadas de *Salmonella enterica* após o aquecimento convencional a 55 °C, além daquelas com relativo dano na membrana plasmática. Baseando-se na Figura 12, na Figura 13 e na Figura 14, nota-se que há uma quantidade superior de células mortas de *Salmonella enterica* quando tratadas a 60 °C no aquecimento convencional e tratadas a 55 °C no aquecimento ôhmico, mostradas na Figura 16c e na Figura 17b, respectivamente.

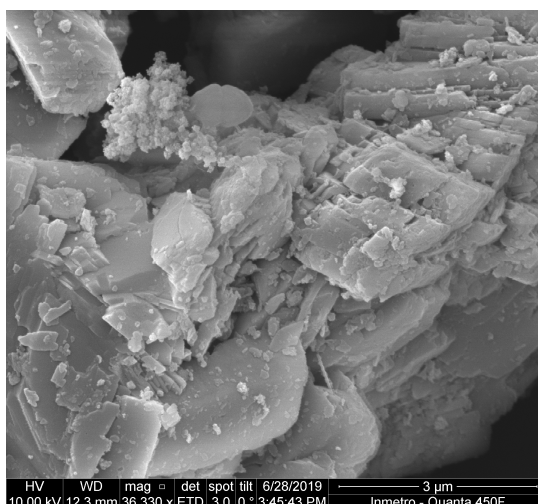
O pior cenário para a *Salmonella enterica* dentre os mostrados parece ser o tratamento a 60 °C no aquecimento ôhmico, como mostra a Figura 17c. Como já observado na seção 6.1, o efeito térmico parece se sobrepôr ao efeito elétrico. Da Figura 16a à Figura 17c, percebe-se que há maiores danos às membranas celulares quando se aumentam as temperaturas ainda mantendo-se o aquecimento convencional,



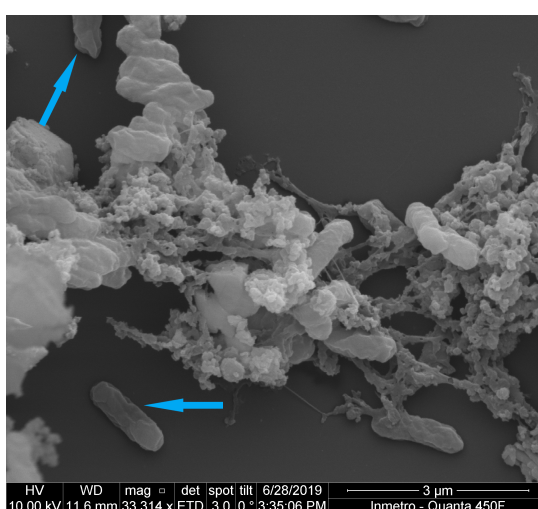
do que quando se utiliza a mesma temperatura mas no aquecimento ôhmico, que ainda conta com a eletroporação. Essa correlação entre as temperaturas e os diferentes tratamentos térmicos é constatado também quando se analisa  $t_{5d}$  na Tabela 5.



(a) SE pura sem tratamento

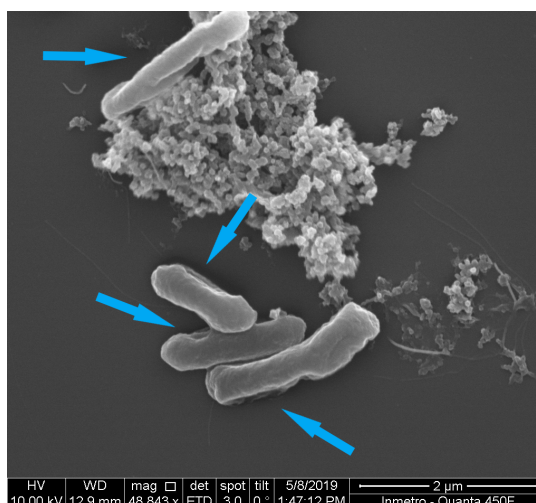


(b) FLI pura sem tratamento

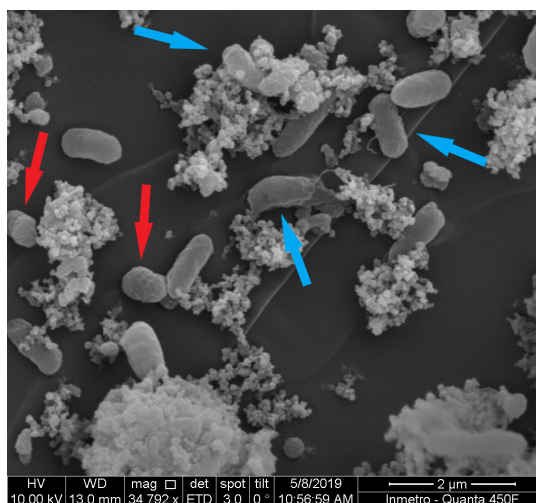


(c) SE em FLI sem tratamento

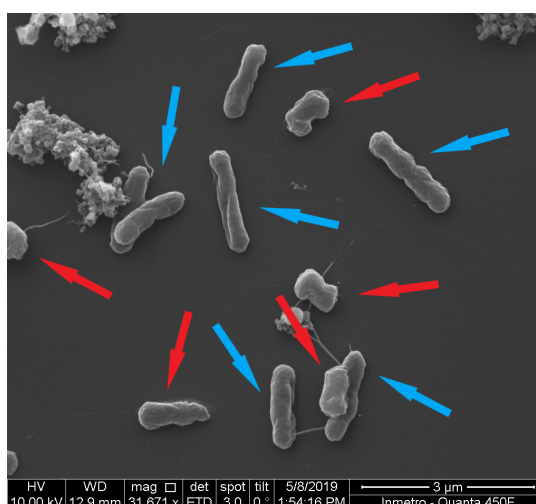
Figura 15 – Amostras controle de mudanças morfológicas nas células de *Salmonella enterica* (SE) em FLI antes dos tratamentos por aquecimento ôhmico (AO) e convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular.



(a) CONV 50

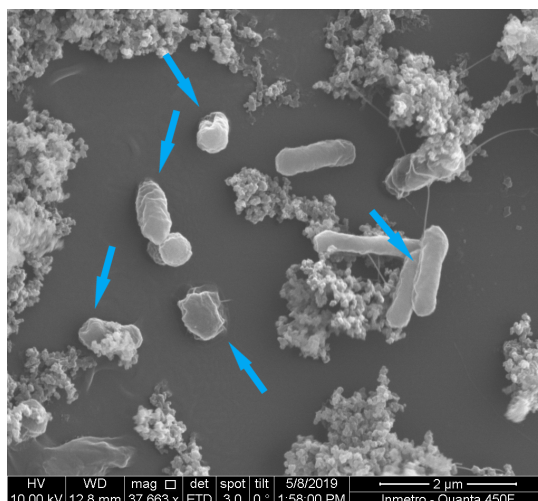


(b) CONV 55

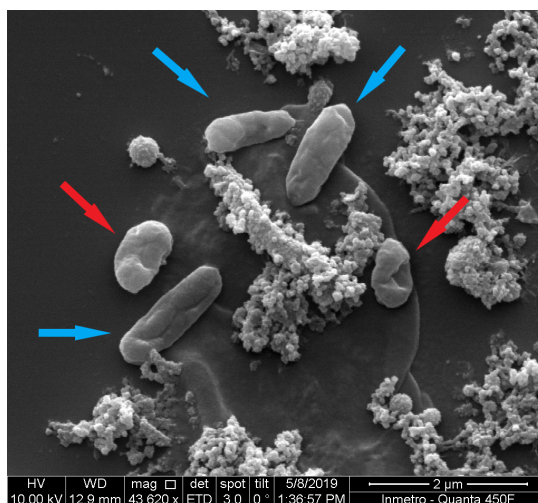


(c) CONV 60

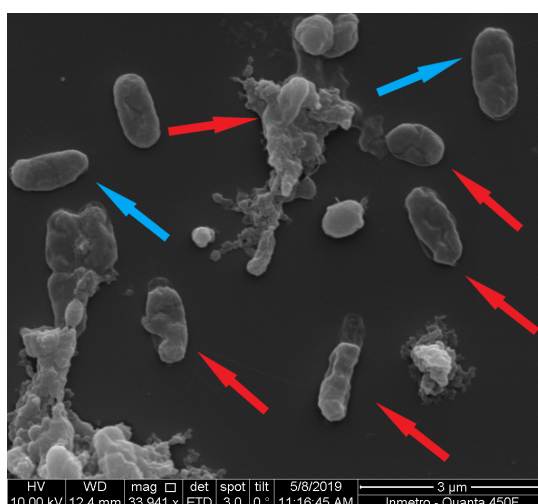
Figura 16 – Mudanças morfológicas nas células de *Salmonella enterica* (SE) em FLI tratadas por aquecimento convencional (CONV) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular. Seta vermelha: células lisadas e detritos (*debris*) celulares.



(a) AO 50



(b) AO 55



(c) AO 60

Figura 17 – Mudanças morfológicas nas células de *Salmonella enterica* (SE) em FLI tratadas por aquecimento ôhmico (AO) nas isotermas de 50, 55 e 60 °C. Seta azul: danos e rugosidades na superfície celular. Seta vermelha: células lisadas e detritos (*debris*) celulares.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados das análises realizadas, concluiu-se que os diferentes tratamentos térmicos (tanto ôhmico quanto convencional) a diferentes temperaturas (50, 55 e 60 °C) não apenas inativaram as células de *Salmonella enterica* na fórmula láctea infantil (FLI) de forma distinta, como também geraram transformações diferenciadas na FLI utilizada no estudo.

De acordo com o método de contagem em placa (*spread plate*), a maneira mais eficiente (dentre as testadas) de inativar a *Salmonella enterica* na FLI foi utilizando-se o aquecimento ôhmico com a isoterma de 60 °C. Para determinar com mais precisão os diferentes efeitos estruturais gerados nas células de *Salmonella enterica* após estes tratamentos térmicos, pretende-se realizar análises futuras com citometria de fluxo, para se confirmar o efeito de eletroporação, entre outros.

Quanto aos compostos bioativos, o aquecimento ôhmico apresentou melhores resultados na maioria das condições de preservação destes compostos.

Percebeu-se com a análise de Hidroximetilfurfural que o principal fator na formação deste subproduto da Reação de Maillard foi a temperatura e não o tipo de aquecimento utilizado. E neste caso, o mais indicado seria utilizar os tratamentos a 50 °C, em contraposição às vantagens dos tratamentos com a isoterma de 60 °C. Com a análise de Índice de soroproteína não desnaturada, não foi indicada diferença significativa entre os tratamentos.

Observando-se as imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura, pôde-se sugerir uma correlação com o resultado da contagem em placas, onde o resultado mais eficiente foi o obtido pela isoterma de 60 °C durante o tratamento ôhmico, assim como numa análise geral de todos os parâmetros analisados, este tratamento pareceu ser o mais indicado no tratamento térmico da FLI a ser servida ao lactente.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, E.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, H.; IRAJIAN, G.; GHAEMI, E. A. Predictive modeling of survival/death of *Listeria monocytogenes* in liquid media: Bacterial responses to cinnamon essential oil, ZnO nanoparticles, and strain. *Food Control*, Elsevier, v. 73, p. 954–965, 2017.

AGUAYO, E.; GÓMEZ, P.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; ARTÉS, F. *et al.* Chemical treatments to sanitize fresh-cut vegetables: ozone, electrolyzed water and peracetic acid. *Agrociencia (Montevideo)*, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, y del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay, v. 21, n. 1, p. 7–14, 2017.

ANGULO, F. J.; CAHILL, S. M.; WACHSMUTH, I. K.; COSTARRICA, M. de L.; EMBAREK, P. K. B. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. *Clinical Infectious Diseases*, The University of Chicago Press, v. 46, n. 2, p. 268–273, 2008.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G. Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. *Food Research International*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 700–712, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Lei nº. 11.265. Regulamenta a comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância. *Diário Oficial da União*, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 46, de 25 de setembro de 2014. Altera a RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3637482/RDC\\_46\\_2014\\_.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3637482/RDC_46_2014_.pdf)>. Acesso em: 23 mar 2018.

BRODOWSKA, A. J.; NOWAK, A.; ŚMIGIELSKI, K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, p. 1–26, 2017.

BULA-RUDAS, F. J.; RATHORE, M. H.; MARAQA, N. F. *Salmonella* infections in childhood. *Advances in Pediatrics*, Elsevier, v. 62, n. 1, p. 29–58, 2015.

CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S.; GUIMARÃES, J. T.; PORTELA, J. B.; COSTA, A. L. R.; FREITAS, M. Q.; CUNHA, R. L.; OLIVEIRA, C. A. F.; MERCALI, G. D.; MARZACK, L. D. F. *et al.* Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, v. 62, p. 104–112, 2017.

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. da; GOMES, I. R. O Mercado de Leite em 2017. *Embrapa Gado de Leite - Circular Técnica (INFOTECA-E)*, Embrapa, Juiz de Fora, n. 118, p. 28, 2018. ISSN 1678-037X.

CHAVES, R. D. *et al.* Levantamento da contaminação por linhagens de *Staphylococcus em instalações de cozinhas, avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE), modelagem preditiva do tempo para produção e quantificação da expressão dos genes codificadores de SE*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CARBOT, K. de la T.; GARCÍA-GASCA, T.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Content and evolution of potential furfural compounds in commercial milk-based infant formula powder after opening the packet. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 166, p. 486–491, 2015.

COSTA, N. R.; CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S.; PIRES, R. P. S.; MORAES, J.; ESMERINO, E. A.; SILVA, R.; CUCINELLI NETO, R. P.; TAVARES, M. I. B.; FREITAS, M. Q.; SILVEIRA JÚNIOR, R. N.; RODRIGUES, F. N.; BISAGGIO, R. C.; CAVALCANTI, R. N.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Ohmic Heating: A potential technology for sweet whey processing. *Food Research International*, Elsevier, v. 106, p. 771–779, 2018.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. *Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. v. 4.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, Elsevier, v. 250, n. 1, p. 261–265, 1971.

European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. Multi-country outbreak of *Salmonella* Agona infections linked to infant formula. *EFSA Supporting Publications*, Wiley Online Library, v. 15, n. 1, p. 1365E, 2018.

FELTES, M. M. C.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P.; BLOCK, J. M. Food quality, food-borne diseases, and food safety in the Brazilian food industry. *Food Quality and Safety*, Oxford University Press, v. 1, n. 1, p. 13–27, 2017.

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

FOX, E. M.; JIANG, Y.; GOBIUS, K. S. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. *International Dairy Journal*, Elsevier, v. 84, p. 28–35, 2018.

FRANCISQUINI, J. D.; NUNES, L.; MARTINS, E.; STEPHANI, R.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. de. Efeito do tratamento térmico sobre fórmulas infantis: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 72, n. 4, p. 236–244, 2017.

FRANCISQUINI, J. D.; OLIVEIRA, L. N. de; PEREIRA, J. P. F.; STEPHANI, R.; PERRONE, Í. T.; SILVA, P. H. F. da. Avaliação da intensidade da reação de Maillard, de atributos físico-químicos e análise de textura em doce de leite. *Ceres*, v. 63, n. 5, p. 589–596, 2016.

FURTADO, M. M. *Salmonella em alimentos de baixa atividade de água: avaliação de protocolo para preparo de inóculo seco e determinação da resistência à dessecação e ao calor de diferentes sorotipos isolados da cadeia produtiva da soja*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

GABRIEL, A. A.; BALLESTEROS, M. L. P.; ROSARIO, L. M. D.; TUMLOS, R. B.; RAMOS, H. J. Elimination of *Salmonella enterica* on common stainless steel food contact surfaces using UV-C and atmospheric pressure plasma jet. *Food Control*, Elsevier, v. 86, p. 90–100, 2018.

GALLY, T.; ROUAUD, O.; JURY, V.; LE-BAIL, A. Bread baking using ohmic heating technology; a comprehensive study based on experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, Elsevier, v. 190, p. 176–184, 2016.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GinaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 102, n. 1, p. 95–105, 2005.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. d. M.; MARTINIS, E. C. P. D. Microbiological Food Safety Issues in Brazil: Bacterial Pathogens. *Foodborne pathogens and disease*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 10, n. 3, p. 197–205, 2013.

GRAHAM, K.; REA, R.; SIMPSON, P.; STACK, H. *Enterococcus faecalis* milk fermentates display antioxidant properties and inhibitory activity towards key enzymes linked to hypertension and hyperglycaemia. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, v. 58, p. 292–300, 2019.



- GREEN, K. *28 sick in salmonella outbreak linked to kratom, CDC says*. Portsmouth: Wavy.com, 2018. Disponível em: <<https://www.wavy.com/news/28-sick-in-salmonella-outbreak-linked-to-kratom-cdc-says/1078364526>>.
- GUIMARÃES, J. T.; SILVA, E. K.; FREITAS, M. Q.; MEIRELES, M. A. A.; CRUZ, A. G. Non-thermal emerging technologies and their effects on the functional properties of dairy products. *Current Opinion in Food Science*, Elsevier, v. 22, p. 62–66, 2018.
- GUNN, L.; FINN, S.; HURLEY, D.; BAI, L.; WALL, E.; IVERSEN, C.; THRELFALL, J. E.; FANNING, S. Molecular Characterization of *Salmonella* serovars Anatum and Ealing Associated with Two Historical Outbreaks, Linked to Contaminated Powdered Infant Formula. *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, v. 7, p. 1664, 2016.
- HANCOCK-ALLEN, J. Notes from the field: Typhoid Fever Outbreak Associated with an Asymptomatic Carrier at a Restaurant — Weld County, Colorado, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 23, p. 606–607, 2016.
- HICKEY, C. D.; SHEEHAN, J. J.; WILKINSON, M. G.; AUTY, M. A. E. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Frontiers in Microbiology*, Frontiers, v. 6, p. 99, 2015.
- HOFFMANN, M.; MURUVANDA, T.; PIRONE, C.; KORLACH, J.; TIMME, R.; PAYNE, J.; EVANS, P.; MENG, J.; BROWN, E. W.; ALLARD, M. W. First fully closed genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cubana associated with a food-borne outbreak. *Genome Announcements*, American Society for Microbiology, v. 2, n. 5, p. e01112–14, 2014.
- IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.
- ICIER, F. Ohmic heating of fluid foods. *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*, Academic Press, Elsevier Inc. USA, p. 305–367, 2012.
- JAEGER, H.; ROTH, A.; TOEPFL, S.; HOLZHAUSER, T.; ENGEL, K.-H.; KNORR, D.; VOGEL, R. F.; BANDICK, N.; KULLING, S.; HEINZ, V. *et al.* Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, v. 55, p. 84–97, 2016.
- KENT, R. M.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 7, n. 2, p. 1217–1244, 2015.

KIM, H.-S.; KIM, Y.-J.; CHON, J.-W.; KIM, D.-H.; YIM, J.-H.; KIM, H.; SEO, K.-H. Two-stage label-free aptasensing platform for rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, v. 239, p. 94–99, 2017.

KIM, S.-S.; KANG, D.-H. Comparative effects of ohmic and conventional heating for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in skim milk and cream. *Journal of Food Protection*, International Association for Food Protection, v. 78, n. 6, p. 1208–1214, 2015.

KOBAYASHI, T.; KUTSUNA, S.; HAYAKAWA, K.; KATO, Y.; OHMAGARI, N.; URYU, H.; YAMADA, R.; KASHIWA, N.; NEI, T.; EHARA, A. *et al.* An Outbreak of Food-Borne Typhoid Fever Due to *Salmonella enterica* Serotype Typhi in Japan Reported for the First Time in 16 Years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, ASTMH, v. 94, n. 2, p. 289–291, 2016.

KOYAMA, K.; HOKUNAN, H.; HASEGAWA, M.; KAWAMURA, S.; KOSEKI, S. Estimation of the probability of bacterial population survival: Development of a probability model to describe the variability in time to inactivation of *Salmonella enterica*. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 68, p. 121–128, 2017.

KU Leuven. *GINAFIT - A Microsoft © Excel tool for testing ten different types of microbial survival models on user-specific experimental data*. 2015. Acesso em: 10 mai. 2018. Disponível em: <<https://cit.kuleuven.be/biotec/software/GinaFit>>.

LAMAS, A.; MIRANDA, J. M.; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, Elsevier, v. 206, p. 60–73, 2018.

LAVELLI, V.; HARSHA, P. S. C. S.; FERRANTI, P.; SCARAFONI, A.; IAMETTI, S. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase—effect of food matrix and processing on efficacy. *Food & Function*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 3, p. 1655–1663, 2016.

LEE, S.-Y.; RYU, S.; KANG, D.-H. Effect of frequency and waveform on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in salsa by ohmic heating. *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, v. 79, n. 1, p. 10–17, 2013.

LEE, S.-Y.; SAGONG, H.-G.; RYU, S.; KANG, D.-H. Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *Journal of Applied Microbiology*, Wiley Online Library, v. 112, n. 4, p. 723–731, 2012.

LIU, G.; LI, Y.; CAO, J.; REN, D.; YUAN, D.; ZHANG, L. Changes of microbiological and physicochemical properties in Chinese infant formula caused by high heat treatment applied on concentrated milk. *Dairy Science & Technology*, Springer, v. 92, n. 6, p. 719–733, 2012.

LIU, Q.; JIN, X.; FENG, X.; YANG, H.; FU, C. Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on organic carrot (*Daucus carota* L.) treated with low concentration electrolyzed water combined with short-time heat treatment. *Food Control*, Elsevier, v. 106, p. 106702, 2019.

MAÇI, R.; BIJO, B.; XINXO, A.; SHEHU, F.; MEMOÇI, H. Prevalence of *Salmonella* spp. in Imported Powdered Infant Formula (PIF). *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, v. 14, n. 3, p. 236–240, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUÉRINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 72, n. 1-2, p. 107–113, 2002.

MESHARAM, B. D.; ASGAR, S.; ADIL, S.; RANVIR, S. Chemical markers for monitoring heat damage of processed milk: Review. *International Journal of Chemical Studies*, v. 6, n. 1, p. 2073–2081, 2018.

Microsoft®. *Adicionar ou remover suplementos no Excel®*. 2018. Acesso em: 10 mai. 2018. Disponível em: <<https://support.office.com/pt-br/article/adicionar-ou-remover-suplementos-no-excel-0af570c4-5cf3-4fa9-9b88-403625a0b460>>.

MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford University Press, v. 41, n. Supp\_1, p. S129–S153, 2017.

MUKHOPADHYAY, S.; RAMASWAMY, R. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 666–677, 2012.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 3, p. 41–51, 2000.

NEVES, L. N. O.; SILVA, P. H. F. da; OLIVEIRA, M. A. L. de. Determinação espectrofotométrica de WPNI e HMF em leite UHT através da análise por componentes

principais. *Química Nova*, Directory of Open Access Journals, v. 39, n. 6, p. 741–747, 2016.

NOVAES, S. F. de; SCHREINER, L. L.; OLIVEIRA, L. A.; FRANCO, R. M. Milk quality in Brazil: an overview of official analysis of sanitary monitoring. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 24, n. 1, p. 52–57, 2017.

OLHA QUEM ESTÁ COMENDO. *Leite Materno, Fórmula Infantil ou Leite de Vaca?* 2013. Disponível em: <<http://olhaquemestacomendo.blogspot.com/2013/04/leite-materno-formula-infantil-ou-leite.html>>. Acesso em: 19 dez 2018.

OLIVEIRA, A. P. de; REZENDE, C. M.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, J. J. de. Microbiologia preditiva. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 190, 2013a.

OLIVEIRA, A. P. de; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; MOREIRA, N. M.; OLIVEIRA, J. J. de. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1947–1972, 2013b.

OLIVEIRA, L. N.; MARINHO, V. T.; ZAMAGNO, M. V.; LAURO, M. A.; BARBOZA, J. A. N.; SILVA, P. H. F. da. Avaliação do índice de soroproteína não desnaturada como um indicador de tratamento térmico para leite uht e leite em pó. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 70, n. 2, p. 78–84, 2015.

PARK, I.-K.; HA, J.-W.; KANG, D.-H. Investigation of optimum ohmic heating conditions for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *BMC Microbiology*, BioMed Central, v. 17, n. 1, p. 117, 2017.

PORTELA, J. B.; COIMBRA, P. T.; CAPPATO, L. P.; ALVARENGA, V. O.; OLIVEIRA, R. B. A.; PEREIRA, K. S.; AZEREDO, D. R. P.; SANT'ANA, A. S.; NASCIMENTO, J. S.; CRUZ, A. G. Predictive model for inactivation of *Salmonella* in infant formula during microwave heating processing. *Food Control*, Elsevier, v. 104, p. 308–312, 2019.

RAMASWAMY, H. S.; MARCOTTE, M.; SASTRY, S.; ABDELRAHIM, K. *Ohmic heating in food processing*. [S.l.]: CRC Press, 2014.

RITOTA, M.; COSTANZO, M. G. D.; MATTERA, M.; MANZI, P. New trends for the evaluation of heat treatments of milk. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Hindawi, v. 2017, 2017.

RODRIGUES, R. de Q.; DALMÁS, M.; MULLER, D. C.; ESCOBAR, D. D.; PIZZATO, A. C.; MERCALI, G. D.; TONDO, E. C. Evaluation of nonthermal effects of electricity

on inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during ohmic heating of infant formula. *Journal of Food Safety*, Wiley Online Library, v. 38, n. 1, p. e12372, 2017.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SABATER, C.; MONTILLA, A.; OVEJERO, A.; PRODANOV, M.; OLANO, A.; CORZO, N. Furosine and HMF determination in prebiotic-supplemented infant formula from Spanish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, Elsevier, v. 66, p. 65–73, 2018.

SAKR, M.; LIU, S. A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 39, p. 262–269, 2014.

SAVRAN, D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; HALKMAN, A. K. Modelling survival of *Salmonella* Enteritidis during storage of yoghurt at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 271, p. 67–76, 2018.

SCHLEI, K. P.; REITER, M. G. R.; BERTOLI, S. L.; LICODIEDOFF, S.; CARVALHO, L. F. de; SOUZA, C. K. de. Microbiologia preditiva: Aspectos gerais e tendências. *Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 52–68, 2018. ISSN 1984-5693.

SHOJI, H.; SHIMIZU, T. Effect of human breast milk on biological metabolism in infants. *Pediatrics International*, Wiley Online Library, v. 61, n. 1, p. 6–15, 2019.

SILVA, F. V.; GIBBS, P. A. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 695–699, 2012.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 4. ed. [S.l.]: Varela, 2010.

SILVA, N. J. da; FABRE, L.; ROBINSON, E.; FOURNET, N.; NISAVANH, A.; BRUYAND, M.; MAILLES, A.; SERRE, E.; RAVEL, M.; GUIBERT, V. *et al.* Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Eurosurveillance*, European Centre for Disease Prevention and Control, v. 23, n. 2, p. 17–00852, 2018.

SILVA, S. V. da; MATTANNA, P.; BIZZI, C. A.; RICHARDS, N. S. P. dos S.; BARIN, J. S. Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. *Journal of Dairy Science*, Elsevier, v. 96, n. 6, p. 3498–3505, 2013.

SIQUEIRA, A. A.; CARVALHO, P. G. S. de; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. MicroFit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. *Brazilian Journal of Food Technology*, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), v. 17, n. 4, p. 329, 2014.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 455–481, 2012.

SUN, X.; WANG, C.; WANG, H.; GUO, M. Effects of Processing on Structure and Thermal Properties of Powdered Preterm Infant Formula. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library, v. 83, n. 6, p. 1685–1694, 2018.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Wiley Online Library, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.

US Food and Drug Administration *et al.* Hazard analysis and critical control point (HACCP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice; Final Rule, 21 CFR Part 120, 66 FR 6137-6202, 19 January 2001. *US Food and Drug Administration, Washington, DC*, 2001.

YADAV, A. S.; SAXENA, G. K.; SAXENA, V. K.; KATARIA, J. M. Study on heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 11, n. 2, p. 114–121, 2016.

ZHANG, L.; HOGAN, S.; LI, J.; SUN, S.; CANNING, C.; ZHENG, S. J.; ZHOU, K. Grape skin extract inhibits mammalian intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 126, n. 2, p. 466–471, 2011.

ZHU, R.-g.; CHENG, H.; LI, L.; ERICHSEN, H. R.; PETERSEN, M. A.; SOERENSEN, J.; SKIBSTED, L. H. Temperature effect on formation of advanced glycation end products in infant formula milk powder. *International Dairy Journal*, Elsevier, v. 77, p. 1–9, 2018.

## ANEXOS

# ANEXO A - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (XXVI CBCTA)



XXVI CONGRESSO  
BRASILEIRO DE CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

O Uso Consciente da Biodiversidade: Perspectivas para  
o Avanço da Ciência e Tecnologia de Alimentos

13 a 16 de Agosto de 2018 - Belém. Pará. Brasil

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico,

**3881 - AQUECIMENTO ÔHMICO EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, ÓPTICAS, MOBILIDADE DA ÁGUA E PERFIL DE VOLÁTEIS** foi apresentado na forma de apresentação **E-PÔSTER** no **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, realizado no Hangar Centro de Convenções em Belém do Pará, no período de 16 a 16 de agosto de 2018, tendo como autores: **ROBERTO PESSANHA DA SILVA PIRES, FLAVIO NAPOLE RODRIGUES; RENATA SANTANA LORENZO RAICES; PAULO HENRIQUE FONSECA DA SILVA; JANAÍNA DOS SANTOS NASCIMENTO; ADRIANO GOMES DA CRUZ.**

Belém, Pará 16 de agosto de 2018.

*Luiza Helena Meiller da Silva*

Professora Dr<sup>a</sup> Luiza Helena Meiller da Silva  
Presidente do XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

*Lucia de Fatima Henriques Lourenço*

Professora Dr<sup>a</sup> Lucia de Fatima Henriques Lourenço  
Coordenadora de Trabalhos Científicos do XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Promoção:



Realização:



Patrocínio:



Organização:





## ANEXO B - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NA XII JORNADA INTERNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (XII JIT) DO IFRJ



### CERTIFICADO

O trabalho intitulado **INATIVAÇÃO DE SALMONELLA ENTERICA EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL POR AQUECIMENTO ÔHMICO: ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**, autoria de Bárbara Victor Souza, Roberto Pessanha da Silva Pires, Flavio Napole Rodrigues, Adriano Gomes da Cruz e Janaína dos Santos Nascimento, foi apresentado na XII Jornada Interna de Iniciação Científica e Tecnológica (XII JIT), evento concomitante à II Jornada de Pós-Graduação (II JPG) e ao VII Fórum de Inovação, Tecnologia e Educação (VII FÓRUM ITE), realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, nos dias 28 e 29 de agosto de 2018.

**Rodney Cesar de Albuquerque**  
Pró-Reitor de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação



## ANEXO C - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NA II JORNADA DA PÓS-GRADUAÇÃO (II JPG) DO IFRJ



### CERTIFICADO

O trabalho intitulado INATIVAÇÃO DE SALMONELLA ENTERICA EM FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL POR AQUECIMENTO ÔHMICO, autoria de ROBERTO PESSANHA DA SILVA PIRES, BÁRBARA VÍCTOR SOUZA, FLAVIO NAPOLE RODRIGUES, ADRIANO GOMES DA CRUZ e JANAINA DOS SANTOS NASCIMENTO, foi apresentado por ROBERTO PESSANHA DA SILVA PIRES, durante a sessão de comunicação oral da II Jornada da Pós-Graduação (JPG), evento concomitante à XII Jornada Interna de Iniciação Científica e Tecnológica (JIT), e ao VII Fórum de Inovação, Tecnologia e Educação (FÓRUM ITE), realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, nos dias 28 e 29 de agosto de 2018.

**Rodney Cesar de Albuquerque**  
Pró-Reitor de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação



ANEXO D - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO  
NO 1<sup>st</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOACTIVE COMPOUNDS  
(1<sup>st</sup> ICBC) / 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOACTIVE COM-  
POUNDS (2<sup>nd</sup> IWBC)



# Certificate

The Organizing Committee CERTIFIES that the abstract entitled

**BIOACTIVE COMPOUNDS IN INFANT FORMULA TREATED BY OHMIC HEATING: ANTIOXIDANT, ANTIHYPERGLYCEMIC, AND ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITIES**

authorship:

Roberto Pessanha da Silva Pires, Marcus Vinicius da Silva Ferreira, Ramon da Silva Rocha, Victor Hugo Camilo Evangelista, Fernanda Amaro Rodrigues Lopes Szpunar, Flavio Napole Rodrigues, Janaina dos Santos Nascimento, Adriano Gomes da Cruz

has been presented as poster at the 1<sup>st</sup> International Congress on Bioactive Compounds and 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bioactive Compounds: Food Design and Health Nutrition held on 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> November 2018 at UNICAMP, Campinas – São Paulo – Brazil.

Campinas, November, 2018.

  
 Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior  
 President of the Event

  
 Dra. Cinthia Baú Beitim Cazarin  
 Coordinator of the Scientific Committee

  
 Dr. Juliano Lemos Bicas  
 Programming Coordinator




2bc544c64f80d0cc4c912b886e326a8ba1

ANEXO E - CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO (2º LUGAR) DO TRABALHO NO 1<sup>st</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOACTIVE COMPOUNDS (1<sup>st</sup> ICBC) / 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOACTIVE COMPOUNDS (2<sup>nd</sup> IWBC)

**Certificate**

**1<sup>st</sup> ICBC**  
INTERNATIONAL CONGRESS ON  
BIOACTIVE COMPOUNDS  
Food Design and Health Nutrition

**2<sup>nd</sup> International Workshop on Bioactive Compounds:**  
Food Design and Health Nutrition

The Scientific Committee AWARD the work entitled:  
**BIOACTIVE COMPOUNDS IN INFANT FORMULA TREATED  
BY OHMIC HEATING: ANTIOXIDANT, ANTIHYPERGLYCEMIC,  
AND ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITIES**

for being the second top work presented at the 1<sup>st</sup> International Congress on Bioactive Compounds and 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bioactive Compounds: Food Design and Health Nutrition held on 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> November 2018 at UNICAMP, Campinas – São Paulo – Brazil.

Campinas, November, 2018.

  
 Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior  
 President of the Event

  
 Dra. Cinthia Baú Beitim Cazarin  
 Coordinator of the Scientific Committee

  
 Dr. Juliano Lemos Bicas  
 Programming Coordinator



97fc09cd165579288995b403d4023efc