

Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis sob diferentes condições de preparo e armazenamento

Evaluation of the growth of *Salmonella enterica* in infant milk formulas under different preparation and storage conditions

RESUMO

Marcelo Soares de Moraes¹

Brendon Chaves Araújo¹

Leonardo Emanuel de Oliveira Costa¹

Janaina dos Santos Nascimento^{1,*}

Salmonella enterica é um dos mais importantes patógenos associados a fórmulas lácteas infantis (FLI). Neste trabalho, foi avaliada a sobrevivência e crescimento de uma estirpe padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi em duas FLI reconstituídas (F1 e F2) sob diferentes condições de preparo e armazenamento similares às utilizadas em lactários hospitalares. Para ambas as FLI inoculadas e incubadas à temperatura ambiente, observou-se um aumento de 3,3 log na população de *S. enterica* logo nas primeiras 24 horas de incubação e um aumento superior a 4,5 log ao término de 72 horas. A 4°C, nas primeiras 48 h de incubação, houve leve aumento populacional (< 1,0 log) e, após 72 horas, o crescimento foi similar ao observado sob temperatura ambiente. Em relação ao aquecimento em banho-maria, verificou-se que a 60°C/ 5 min houve uma redução de um pouco mais de 1 log UFC/ml, entretanto, a 60°C/ 10 min, a queda observada foi de 2,8 log em F1 e de 2,3 log em F2. Já a 70°C/ 5 min, ocorreu redução de cerca de 3 log UFC/ml para F1 e F2, enquanto que por 10 min, essa redução foi cerca de 1 log maior. O aquecimento em forno de micro-ondas mostrou ser a forma mais rápida e eficiente de redução da população de *Salmonella* nas FLI, uma vez que não foi detectada contagem celular após nenhum dos tratamentos utilizados. Os resultados sugerem que FLI contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de refrigeração se mantidos por tempo prolongado e que determinados métodos de tratamento térmico não são suficientes para inibição completa de *S. enterica*.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella enterica*; Fórmulas Lácteas Infantis; Tratamento Térmico; Armazenamento

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the most important pathogens associated with infant milk formulas (IMFs). In this study, the survival and growth of an *S. enterica* serovar Typhi strain in two reconstituted IMFs (F1 and F2) under different conditions of preparation and storage, similar to those used in hospital lactaries, was evaluated. For both IMFs inoculated at room temperature, there was 3.3 log increase in the population of *S. enterica* by the first 24 h of incubation and > 4.5 log increase at the end of 72 h. At 4°C, in the first 48 h of incubation, there was a slight increase in population (< 1.0 log) and after 72 h, growth was similar to that observed at room temperature. A heated water bath was used to test the effect of thermal treatment methods on bacterial viability. At 60°C for 5 min, there was a reduction of slightly more than 1 log CFU/mL; however, at 60°C for 10 min, the observed decrease was 2.8 log for F1 and 2.3 log for F2. At 70°C for 5 min, there was a reduction of approximately 3 log CFU/ml for both IMFs and for 10 min, this reduction was approximately 1 log higher. Heating in a microwave oven was the most efficient way of reducing populations of *Salmonella* in the IMFs, as bacterial cell counts were not detected after any of the treatments used. Our results suggest that IMF contamination during the preparation step may support bacterial growth even under refrigeration if kept for a prolonged time and that some thermal treatment methods are not sufficient for the complete inhibition of *S. enterica*.

¹ Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: janaina.nascimento@ifrj.edu.br



INTRODUÇÃO

Diferentes situações de saúde podem resultar na impossibilidade de amamentação natural ou ainda, trazer riscos para saúde dos lactentes. Nestes casos a alternativa é a utilização das fórmulas lácteas infantis (FLI), que atenderão as necessidades nutricionais, sem comprometer o crescimento e desenvolvimento dos lactentes^{1,2,3,4}.

De acordo com Arsalan et al.⁵, a fabricação de FLI comercialmente estéreis nem sempre é possível de ser realizada utilizando-se a tecnologia de processamento atual. Com isso, existem riscos potenciais de infecção dos bebês através do consumo deste alimento. Estes riscos são maiores quando as fórmulas lácteas não são preparadas, manuseadas ou armazenadas de modo apropriado.

Os micro-organismos e/ou suas toxinas geram grande preocupação quanto à administração das fórmulas lácteas, uma vez que a sua presença pode causar doenças e, até mesmo, resultar na morte dos lactentes^{6,7}.

Cronobacter spp. (antigamente descrito como *Enterobacter sakazakii*) e *Salmonella enterica* são os mais preocupantes patógenos associados às fórmulas lácteas, uma vez que existem claras evidências de que suas presenças podem resultar em graves doenças na população de risco que consome esse alimento^{5,6,8}.

Para os fabricantes de alimentos, a *Salmonella* sp. é uma das bactérias de mais difícil controle, pois sua sobrevivência em alimentos não depende apenas da atividade de água do ambiente ou alimento, mas também de outros fatores, como a composição da matriz e a temperatura de preparo e armazenamento⁹.

Muitos trabalhos têm investigado a sobrevivência de *Cronobacter* spp. nas fórmulas lácteas, mas pouca atenção tem sido dada quando o patógeno é *Salmonella*. Este trabalho, portanto, visa avaliar a sobrevivência e o crescimento de uma estirpe padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi em FLI sob diferentes condições de aquecimento e armazenamento, simulando as formas de preparo das FLI na rotina de um lactário.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estirpes e condições de cultivo

A estirpe de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, sorotipo Typhi ATCC19214, foi utilizada nos estudos de sobrevivência em FLI sob diferentes condições de preparo e armazenamento comumente empregadas em lactários nos hospitais do Brasil. A cultura foi estocada em caldo Casoy com 40% (p/v) de glicerol a -20°C até o momento do uso.

Fórmulas lácteas infantis (FLI)

As latas de duas marcas de FLI desidratadas mais comumente empregadas nos lactários de hospitais públicos foram adquiridas em farmácias locais da cidade do Rio de Janeiro. Para todos os experimentos, as fórmulas foram reidratadas com água destilada estéril de acordo com as instruções dos fabricantes encontradas no rótulo.

Avaliação do crescimento de *S. enterica* em FLI sob diferentes formas de preparo

Aquecimento em banho-maria

As FLI foram reconstituídas, em condições de assepsia, em água destilada estéril. As FLI foram distribuídas em frascos estéreis (50 ml) e inoculadas de modo a se obter a concentração final de 10⁶ UFC/ml da estirpe de *S. enterica*. O tratamento térmico foi realizado em banho-maria (marca Quimis, modelo Q304M-2105,160 W) a 60°C e 70°C por 10 e 5 minutos. Após esse tempo, a amostra foi removida do banho-maria e imersa em banho de gelo por 5 min. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) após o tratamento térmico foi quantificado conforme descrito adiante.

Aquecimento através de forno de micro-ondas

A fim de se reproduzir o que acontece normalmente em um lactário, foi seguida a metodologia descrita por Al-Holy et al.¹⁰, com pequenas modificações. A FLI foi reconstituída em água destilada e porções de 50 ml foram dispensadas em frascos estéreis, que foram, em seguida, esterilizados a 121°C por 5 min. Os frascos foram inoculados com 100 mL da cultura de *S. enterica*, isoladamente, de modo a se obter a concentração inicial de células de aproximadamente 10⁶ UFC/ml. Um forno de micro-ondas caseiro (marca Midea, modelo MM30EL1VW, tensão 127 V, potência 1000 W) foi utilizado para aquecer os frascos durante 30, 45, 60 e 90 segundos (sendo, este último tempo, dividido em dois períodos de aquecimento de 45 segundos, interrompidos por um intervalo de 30 segundos). Um frasco de FLI reconstituída e inoculada, porém sem aquecimento, serviu como controle. Após o aquecimento, os frascos foram agitados vigorosamente e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a quantificação das UFC sobreviventes de *S. enterica*.

Crescimento de *S. enterica* em FLI armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeração

Mais uma vez a fim de se mimetizar as condições de armazenamento que ocorrem na rotina de um lactário, investigou-se a capacidade de sobrevivência das estirpes de *S. enterica* em FLI reconstituídas armazenadas à temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) e sob refrigeração (4°C). A estirpe de *S. enterica* foi inoculada, separadamente, em tubos contendo 10 ml de FLI reconstituída estéril de modo a atingir a concentração inicial de 10⁶ UFC/ml. Os tubos foram agitados vigorosamente em um vórtex (marca Biomatic modelo 1005) e o crescimento da bactéria foi monitorado por plaqueamento (após 24, 48 e 72 h) em ágar Casoy (Micromed).

Enumeração de *S. enterica*

As UFC de *S. enterica* foram enumeradas pela técnica de "spread plate". As amostras foram diluídas e plaqueadas em ágar Casoy, em duplicata, e incubadas durante 18-24 h a 37°C.



Análises estatísticas

Para todos os testes de significância, valores $p > 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. One-way ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças nos parâmetros estudados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O armazenamento sob refrigeração pode auxiliar na segurança do alimento ou, ainda, aumentar a vida de prateleira de diversos alimentos, evitando ou retardando o crescimento de patógenos¹¹. No entanto, *Salmonella* pode ser um problema em alimentos armazenados sob refrigeração, pois alguns estudos relatam o crescimento de estirpes de diversos sorotipos como Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg durante o armazenamento a 10°C, e em alguns casos, o crescimento até mesmo sob a temperatura de 4°C^{11,12}.

Neste trabalho, o crescimento de *Salmonella enterica* em duas FLI armazenadas sob temperatura ambiente e sob refrigeração foi avaliado através da quantificação celular em intervalos de 24 horas por um período de 72 horas, partindo-se de um inóculo inicial de 4,9 log UFC/ml. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados encontrados para as duas fórmulas empregadas (Figuras 1 e 2).

Quando as fórmulas foram armazenadas em temperatura ambiente, houve um aumento de 3,3 log na população de *Salmonella* presente nas primeiras 24 horas de incubação e de aproximadamente 3,8 log após 48 horas. Ao término de 72 horas de incubação, foi observado, para ambas as fórmulas lácteas, aumento superior a 4,5 log da concentração celular. Esses resultados sugerem que fórmulas lácteas contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano elevado, já nas primeiras 24 horas, se mantidas em temperatura ambiente.

Sob temperatura de refrigeração, nas primeiras 48 horas de incubação, foi detectado leve crescimento populacional (inferior a 1 log). Entretanto, ao final de 72 horas, observou-se crescimento similar

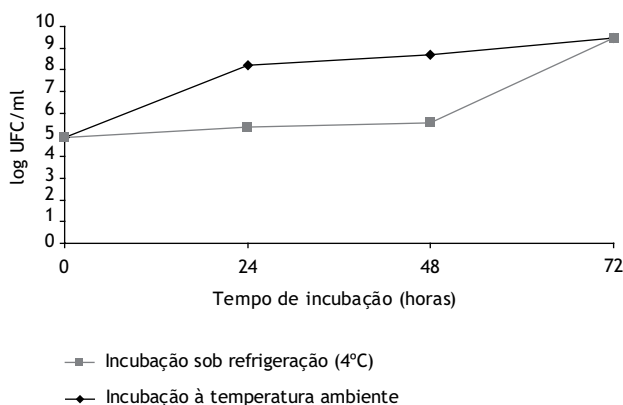


Figura 1. Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil 1 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C).

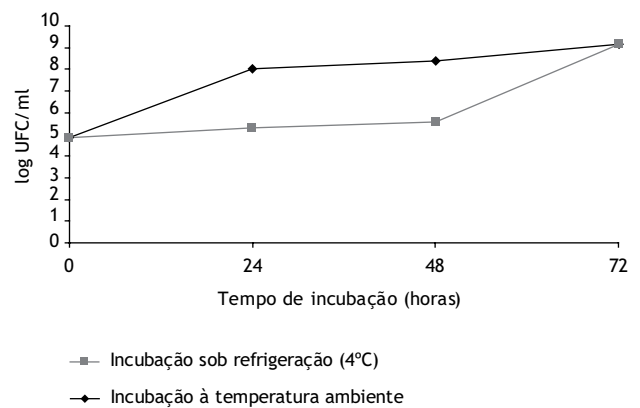


Figura 2. Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil 2 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

ao das fórmulas incubadas à temperatura ambiente, o que corresponde a um aumento de 4,5 log em relação ao inóculo inicial. Dessa forma, é possível concluir que a temperatura de refrigeração, que é um fator inibidor de crescimento bacteriano, não impede o crescimento de *Salmonella enterica* nas FLI avaliadas.

Estudos similares realizados com *Cronobacter* sp, que é o outro patógeno comumente associado à contaminação de fórmulas lácteas, mostraram que quando fórmulas reconstituídas eram contaminadas artificialmente com cepas deste patógeno e incubadas a 30°C, havia um crescimento de 2,5 a 3,14 log na concentração populacional logo nas oito primeiras horas de incubação¹³. No entanto, quando as fórmulas contaminadas eram incubadas sob temperatura de refrigeração, os autores não detectaram crescimento microbiano, provavelmente devido ao baixo inóculo inicial utilizado.

A avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* após o aquecimento das fórmulas lácteas em banho-maria e em forno de micro-ondas foi realizado utilizando-se recipientes plásticos contendo 50 ml de cada fórmula láctea utilizada, simulando as condições de aquecimento empregadas em lactários. Pequenas diferenças ($p < 0,05$) foram observadas nos resultados provenientes da utilização da fórmula 1 e da fórmula 2 (Figura 3).

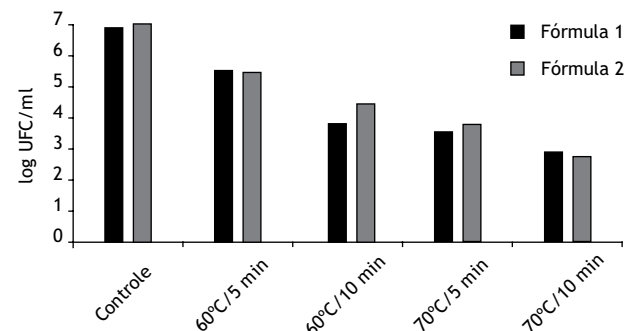


Figura 3. Concentração de *Salmonella enterica* em FLI artificialmente contaminadas submetidas a aquecimento em banho-maria. O controle não foi submetido a nenhum tratamento térmico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



O aquecimento em banho-maria a 60°C por 5 minutos não resultou em queda considerável da contagem de *Salmonella*, havendo redução de um pouco mais de 1 log UFC/ml em ambas as fórmulas. O aquecimento à mesma temperatura por 10 minutos resultou em uma queda do crescimento microbiano de 2,8 log na fórmula 1 e de 2,3 log na fórmula 2. Quando as fórmulas inoculadas foram submetidas ao aquecimento a 70°C por 5 minutos, observou-se, para ambas, uma redução de cerca de 3 log UFC/ml e, mediante o aquecimento por 10 min, essa redução foi de 3,7 log UFC/ml para a fórmula 1 e de 4,0 log UFC/ml para a fórmula 2.

Assim como os resultados encontrados no presente trabalho, Rowlands et al.¹⁴ também descrevem a redução da população de três sorotipos diferentes – Enteritidis, Panama e Infantis – em fórmulas lácteas infantis reconstituídas, experimentalmente contaminadas e submetidas às temperaturas de 60°C, 70°C e 80°C, por 5 minutos. As reduções obtidas variaram entre 4 e 6 ciclos logarítmicos, a 60°C. Já a 70°C e a 80°C, os autores não mais detectaram o crescimento de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

É possível, portanto, verificar que os tratamentos térmicos a 60°C e 70°C por 5 ou 10 minutos não são suficientes para eliminar toda a população de *Salmonella* spp. inoculada nas fórmulas lácteas, demonstrando a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação desses alimentos. Essa importância é enfatizada

Tabela. Concentração celular de *S. enterica* nas fórmulas lácteas após o aquecimento em forno micro-ondas convencional.

	Log UFC/ml de <i>Salmonella enterica</i>	
	Fórmula 1	Fórmula 2
Controle (sem tratamento)	6,04	6,04
Aquecimento por 30 s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 45 s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 60 s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 90 s	< 2,00	< 2,00

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

pelo fato de que alguns sorotipos de *Salmonella* têm o potencial de causar doenças em doses muito baixas, vindo a se tornar, assim, uma preocupação específica para os lactentes, particularmente aqueles na categoria de alta suscetibilidade, como os de baixo peso, os prematuros e os imunocomprometidos^{15,16}.

O uso do aparelho de micro-ondas é uma prática corrente para aquecimento de fórmulas lácteas reconstituídas, tanto em domicílios quanto em hospitais. Neste trabalho, o aquecimento em forno de micro-ondas convencional pareceu ser a forma mais rápida e eficiente de redução da população de *Salmonella* nas FLI reconstituídas. Não foi observado crescimento bacteriano nas fórmulas aquecidas por 30, 45, 60 e 90 segundos, apresentando assim, uma redução superior a 4,0 log na concentração celular (Tabela).

A eficiência da inativação de *Cronobacter sakazakii* em FLI por meio de aquecimento em forno de micro-ondas foi recentemente relatada por Pina-Pérez et al.⁷. Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos citando a sobrevivência de *Salmonella* nas FLI mediante o aquecimento utilizando este equipamento.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que FLI contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de refrigeração se mantidos por tempo prolongado e que, na faixa de tempo estudada, determinados métodos de tratamento térmico não são suficientes para inibição completa de *S. enterica*.

Tendo em vista essa resistência térmica de *Salmonella*, é possível afirmar que a reconstituição das FLI a uma temperatura superior a 70°C por um tempo de exposição mínimo de 10 minutos e o aquecimento de pequenas porções em forno de micro-ondas convencional por pelo menos 30 segundos, pode proporcionar um nível mais alto de proteção contra a infecção por *Salmonella* adquirida por este tipo de alimento.

REFERÊNCIAS

1. Santiago MC. Avaliação da implantação do programa de distribuição de fórmula láctea infantil na cidade de Belo Horizonte, MG: estratégia de redução da transmissão vertical do vírus HIV através do aleitamento artificial [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz; 2006.
2. Townsend S, Forsythe SJ. The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. In: Farber J, Forsythe SJ, editors. *Enterobacter sakazakii*. Washington, DC: ASM; 2008.
3. Osaili TS, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol* 2009;136(2):214-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>
4. Bejarano Roncancio JJ. El banco de leche humana y el lactario hospitalari. *Rev Gastrohnp*. 2013;15(1):S30-40.
5. Arsalan A, Bagir S, Naqvi S, Ali SI, Anwar, Z. Contamination of microorganisms in pediatric infant formula marketed in Karachi. *Ann Food Sci Tech*. 2013;14(2):318-26.
6. Arsalan A, Anwar Z, Ahmad I, Saba A, Naqvi SBS. Microbes in pediatric infant formula. *Ann Food Sci Tech*. 2013;14(1):90-9.
7. Pina-Pérez MC, Benhocch-Tinoco M, Rodrigo D, Martinez A. *Cronobacter sakazakii* inactivation by microwave processing. *Food Bioproc Tech*. 2014;7(3):821-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1063-2>
8. Ha JW, Kang DH. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(6):1858-63. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03825-13>



9. Finn S, Condell L, McClure P, Amézquita A, Fanning S. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbiol.* 2013;4:331. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>
10. Al-Holy MA, Lin M, Abu-Ghoush MM, Al-Qadiri HM, Rasco BA. Thermal resistance, survival and inactivation of *Cronobacter spp.* (*Cronobacter spp.*) in powdered and reconstituted infant formula. *J Food Safety.* 2009;29(2):287-301. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00157.x>
11. Silva FVM, Gibbs PA. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Res Int.* 2012;45(2):695-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.018>
12. Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong ACL. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. *Int J Food Microbiol.* 1995;24(3):385-96. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00042-5](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00042-5)
13. Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin L-C, Ryu J-H, Richards GM. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int J Food Microbiol.* 2009;136(2):204-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029>
14. Rowlands REG, Papasidero AAS, Paula AMR, Cano CB, Gelli DS. Resistência térmica de *Salmonella enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2006;65(1):36-9.
15. Cahill SM, Wachsmuth IK, Costarrica ML, Embarek PKB. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):268-73. <http://dx.doi.org/10.1086/524737>
16. Bejarano-Roncancio JJ, Castillo-Quiroga YM. Principales contaminantes microbiológicos en fórmulas lácteas infantiles. *Ciênc UAT.* 2013;25(1):42-8.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.