

Nutrição Brasil 2017;16(4):219-24

## ARTIGO ORIGINAL

### Avaliação microbiológica de fórmulas infantis para lactentes comercializadas em Joinville/SC

#### *Microbiological assessment of infant formulas sold in Joinville/SC*

Beatriz Granza de Mello\*, Tânia Regina de Oliveira Rosa, M.Sc.\*\*

\*Acadêmica do curso de Nutrição da Associação Educacional Luterana Bom Jesus/IELUSC,

\*\*Docente do curso de Nutrição da Associação Educacional Luterana Bom Jesus/IELUSC

Recebido 15 de dezembro de 2016; aceito 15 de setembro de 2017

**Endereço para correspondência:** Beatriz Granza de Mello, Rua Belém do Pará, 252, Aventureiro, Joinville/SC, E-mail: beatriz\_g\_mello@hotmail.com; Tânia Regina de Oliveira Rosa: taniarprof@gmail.com

## Resumo

Em virtude de sua imaturidade imunológica o recém-nascido se torna mais vulnerável a infecções, estando ainda mais expostos a possíveis contaminações em fórmulas infantis (FI). O objetivo deste trabalho foi analisar microbiologicamente FI de partida e comparar os resultados às recomendações da resolução RDC nº12 de 2001 da ANVISA. Foram adquiridas 9 fórmulas de partida; 4 para lactentes saudáveis, 3 antirrefluxo e 2 de soja. O perfil microbiológico foi realizado por cultura em placas de ágar sangue, MacConkey e chocolate, além de provas confirmatórias. Observou-se crescimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Staphilococcus sp*, *Salmonella sp* e fungo *Aspergillus sp*. Das 9 fórmulas, apenas duas (22,22%) podem ser consideradas dentro dos padrões da resolução citada. Assim, fica clara a importância do correto processamento e manipulação destes produtos para prevenir surtos infecciosos e garantir a proteção dos lactentes.

**Palavras-chave:** fórmulas infantis, vigilância sanitária, microorganismos, recém-nascido.

## Abstract

Because of its immune immaturity the newborn is more vulnerable to infections, being more exposed to possible formula contaminations. The objective of this study was to analyze, from the microbiological view, samples of starting infant formulas available at Joinville/SC and compare them to the Anvisa resolution RDC nº12/2001 parameters. We acquired 9 starting formulas; 4 for healthy infants, 3 for antireflux and 2 soy made. The microbiological profile was performed in blood, MacConkey and chocolate cultures and results were verified. We detected bacteria as *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Staphilococcus sp*, *Salmonella sp* e fungus *Aspergillus sp*. From the 9 formulas, only two of them (22,22%) could be considered in accordance to the resolution. This result turns clear the need for a correct manipulation and making process to avoid infection outbreaks and to turn effective the new born protection.

**Key-words:** infant formula; sanitary surveillance, microorganisms, newborn.

## Introdução

A amamentação equivale a uma das mais precoces experiências nutricionais do bebê e nenhum alimento ou leite industrializado e modificado consegue oferecer todos os ingredientes e benefícios do leite materno, apesar disso, inúmeras crianças necessitam de alternativas seguras [1].

O aleitamento materno é recomendado pelo Ministério da Saúde como fonte de alimentação exclusiva do recém-nascido (RN) até os 6 meses e complementado até os dois anos ou mais. Porém, diante da impossibilidade da amamentação utilizam-se fórmulas infantis (FI) que busquem atender às suas necessidades; para crianças menores de 6 meses são utilizadas fórmulas de partida e, a partir disso, de segmento [2].

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), FI de partida para lactentes é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes sadios durante

os primeiros 6 meses de vida (5 meses e 29 dias). Estas podem ser de origem animal ou vegetal (soja) e as FI de origem animal podem ser hidrolisadas, antirregurgitação ou isentas de lactose [3,4].

As FI usuais são criadas a partir de modificações industriais no leite bovino ou de outros mamíferos para que se assemelhem ao leite materno. Contudo, sua composição é fixa, diferente da do leite humano, que sofre pequenas adaptações de acordo com mãe e filho [5].

As fórmulas à base de soja são indicadas em casos de intolerância à lactose, galactosemia e alergia à proteína do leite de vaca (APLV) [6]. Apesar de ser amplamente indicada a crianças com APLV, em 2010, a organização mundial de alergias (OMA) divulgou um documento no qual desaconselha o uso de soja para crianças menores de 6 meses devido aos riscos a reações adversas, sendo recomendada aos lactentes alérgicos o uso de fórmulas extensamente hidrolisadas que, além de serem utilizadas nestes casos, também são indicadas em casos síndromes disabsortivas, hipoalbuminemia, transição de nutrição parenteral para enteral e na realimentação de pacientes críticos [4,7].

Fórmulas antirregurgitamento são recomendadas para o tratamento não medicamentoso do refluxo gastro-esofágico e possuem, usualmente, amido em sua composição, que gera espessamento quando em contato com o suco gástrico [8].

A lactose é o principal carboidrato do leite e das fórmulas. Geralmente, nos leites sem lactose, este carboidrato é substituído por hidratos de carbono. Estas FI são indicadas para lactentes que possuem deficiência primária de lactase, lesão da mucosa intestinal, desnutrição grave ou má absorção de lactose [4].

Durante os processos de produção, elaboração, transporte e armazenamento, qualquer alimento ou produto alimentício fica vulnerável a contaminações físicas, químicas e microbiológicas, que quando protagonizadas por microorganismos (MO) patogênicos não causam nenhuma alteração nas características habituais, sendo quase impossível a identificação ao olho nu [9]. Particularmente, as FI oferecem excelente substrato para o desenvolvimento de MO, pois constituem um ambiente rico em nutrientes, gorduras e carboidratos [10].

Em virtude de sua imaturidade imunológica, o RN se torna mais vulnerável a infecções, sendo imprescindível a proteção conferida pelo aleitamento materno. Essa fragilidade torna-os ainda mais expostos a possíveis contaminações em fórmulas, que por ser fonte exclusiva de nutrição nos primeiros 6 meses, é consumida em elevada quantidade, criando a possibilidade de que uma pequena quantidade de MO cause alguma patologia [1,11].

O objetivo deste trabalho foi analisar microbiologicamente amostras de FI de partida comercializadas na cidade de Joinville/SC e comparar os resultados às recomendações da resolução RDC nº12 de 2001 da Anvisa [12]. Para a pesquisa foram selecionadas fórmulas de partida à base de soja, antirregurgitação e para lactentes saudáveis.

## Material e métodos

Trata-se de um estudo experimental, observacional e analítico realizado no Laboratório de Microbiologia Geral e de Alimentos, da faculdade de Nutrição da Associação Educacional Luterana Bom Jesus/IELUSC na unidade Saguaiçu III. Para o desenvolvimento do estudo foram adquiridas 9 fórmulas de partida; 4 para lactentes saudáveis, 3 antirrefluxo e 2 de soja (Quadro 1).

**Quadro 1** – Descrição das FI utilizadas no estudo.

Fórmula	Descrição
FI 01	Fórmula à base de leite – de 0 a 6 meses
FI 02	Fórmula à base de leite – de 0 a 6 meses
FI 03	Fórmula à base de leite – de 0 a 6 meses.
FI 04	Fórmula à base de leite – de 0 a 6 meses
FI 05	Fórmula à base de leite e espessada – de 0 a 6 meses
FI 06	Fórmula à base de leite e espessada – de 0 a 6 meses
FI 07	Fórmula à base de leite e espessada – de 0 a 6 meses
FI 08	Fórmula à base de proteína isolada de soja – de 0 a 6 meses
FI 09	Fórmula à base de proteína isolada de soja – de 0 a 6 meses

O perfil microbiológico das amostras foi efetivado por cultura em placas de ágar sangue, MacConkey, chocolate e meios bioquímicos confirmatórios segundo a metodologia de Mortimore e Wallace [13]. A preparação da amostra foi realizada com a dissolução de 1 medida no medidor padrão de cada marca para 30 ml de água esterilizada (redução proporcional do indicado nas embalagens).

Foram realizadas duas amostras com diferentes lotes (20/09 e 25/09), utilizando-se de materiais previamente esterilizados em autoclave, ao redor de halo estéril. Logo em seguida, as amostras foram alocadas em estufa à 36° C e acompanhadas durante o período de 72 horas.

Todos os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml), os dados obtidos foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel 2016®, representados em tabelas no mesmo programa e comparados à RDC nº12/2001 da Anvisa.

## Resultados

Após realizadas as análises, pode-se perceber o mesmo padrão nas duas coletas, desta forma os resultados foram representados apenas no Quadro 2, onde observou-se bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Salmonella sp* e o fungo *Aspergillus sp*.

A única fórmula que apresentou resultados negativos tanto para crescimento bacteriano quanto para o fúngico foi a FI 04. Na FI 08 não foram encontradas bactérias, porém, houve sinal de presença residual de micélios de origem fúngica.

**Quadro 2 – Resultados das duas análises microbiológicas.**

Fórmula	Bactérias		Fungos
	Tipo	UFC/ mL	
FI 01	<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>5</sup>	Negativo
FI 02	<i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus sp</i>	10 <sup>5</sup>	Negativo
FI 03	<i>Enterococcus sp</i>	10 <sup>2</sup>	<i>Aspergillus sp</i>
FI 04	Negativo		Negativo
FI 05	<i>Streptococcus sp</i>	10 <sup>3</sup>	Negativo
FI 06	<i>Staphylococcus sp</i>	10 <sup>2</sup>	Negativo
FI 07	<i>Salmonella sp</i>	10 <sup>5</sup>	Negativo
FI 08	Negativo		Presença residual de micélios de origem fúngica
FI 09	<i>Streptococcus sp</i> e <i>Escherichia coli</i>	10 <sup>4</sup>	Negativo

Das 9 fórmulas analisadas, apenas duas (22,22%) podem ser consideradas dentro dos padrões estabelecidos pela resolução RDC 12/2001 da Anvisa [12]. As 7 restantes (77,78%), segundo esta resolução, não seriam adequadas para o consumo.

## Discussão

A Anvisa estabelece um limite máximo aceitável de contaminação microbiológica para fórmulas infantis em pó ou reconstituídas através da resolução RDC nº12/2001; 10 coliformes a 35°C/ml de amostra indicativa, *Bacilo cereus*/g (ml) a 10<sup>2</sup>, *Staphylococcus coagulase-positiva*/g (ml) e *Salmonella sp*/25g (ml) ausentes [12].

Em um estudo realizado por Rossi, Kabuki e Kuaye [14] foram analisadas 5 fórmulas em pó e reconstituídas em um lactário. Todas as amostras em pó estavam em concordância com a RDC da Anvisa, enquanto as reconstituídas encontravam-se com contagens elevadas de microorganismos mesófilos totais. Santos [15], nos lactários de quatro hospitais de Campinas, encontrou amostras reconstituídas contaminadas com *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus cereus* e bactérias do grupo coliforme.

Segundo a RDC nº 12 de 2001 [12] não devem haver contagens de *Staphylococcus* nas FI, porém, neste trabalho foram encontradas contagens de 10<sup>2</sup> UFC/ml. Linhares [16], em pesquisa realizada em lactário de um hospital infantil, encontrou contaminações de *Staphylococcus aureus* em duas fórmulas reconstituídas e relacionou este à falta de higiene durante a manipulação destas.

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva que produz uma toxina altamente termoestável que causa patologias em humanos, para isto, são necessárias entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g, sendo fundamental o controle de fatores que estão diretamente ligados à multiplicação da bactéria, como temperatura e tempo de exposição [17].

Na fórmula FI 07 foram encontradas *Salmonella sp.*, enquanto, segundo a resolução nº12 de 2001 [12], as FI deveriam ser ausentes deste MO.

A *Salmonella*, principalmente a entérica, é um dos patógenos mais preocupantes associado às FI, visto que existem várias evidências que o resultado para uma contaminação por este MO pode resultar em patologias graves, como a febre tifoide, febre entérica e salmoneloses [18].

Segundo o rótulo, para reconstituir as FI, deve-se aquecer a água, sem ferver, à uma temperatura de 70°C e deixar perder temperatura naturalmente antes de oferecer ao lactente, porém, estudos demonstraram que tratamentos térmicos com temperaturas entre 60 e 70°C por 5 ou 10 minutos não são suficientes para eliminar uma contaminação de  $10^6$  UFC/ml de *Salmonella sp.* (valor próximo ao encontrado neste estudo;  $10^5$  UFC/m) [18,19].

A *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo dos coliformes fecais, que são indicadores de contaminação fecal durante o processamento ou manuseio. A *E. coli* é o melhor indicador deste tipo de contaminação por estar presente tanto em fezes humanas quanto em de animais. É uma bactéria patogênica que causa dores abdominais, diarreias (às vezes hemorrágicas), febre e vômitos [20].

Em outra pesquisa realizado em lactário, os autores verificaram que 3 das fórmulas analisadas estavam contaminadas com *Escherichia coli*, assim como neste estudo que, em 3 fórmulas reconstituídas, foram encontradas contagens deste MO (todas acima do recomendado pela Anvisa) [21]. Já Momesso *et al.* [22] não registraram crescimento de *E. coli* ou qualquer outro coliforme.

*Streptococcus sp* são MO fermentativos e produtores de ácido láctico. Por este motivo são amplamente utilizados como probióticos em FI, pois proporcionam diversos benefícios como controle de infecções gastrointestinais e diarreias, infecções do sistema respiratório, cólicas e irritabilidade, manifestações alérgicas, além de melhorar a frequência e consistência nas evacuações e contribuir positivamente na modulação da imunidade [23,24]. Apesar disso, não haviam indicações de adição de probióticos às formulas onde a presença destes foi averiguada.

A presença de *Streptococcus sp* foi observada em uma amostra de leite humano em um lactário de Minas Gerais, o que foi atribuído à microbiota natural da pele da lactente ou do manipulador [25]. No presente estudo observou-se a presença deste MO em 2 fórmulas (FI 05 e FI 09), e não existem parâmetros máximos para comparação.

Em duas fórmulas (FI 02 e FI 03) foram encontradas colônias de *Enterococcus sp.* O principal reservatório desta é o trato gastrointestinal de humanos, são comensais e atuam como oportunistas, causando infecções em populações com a imunidade comprometida como pacientes de longa internação [26].

Ao analisar o perfil epidemiológico de pacientes infectados por MO resistentes transferidos das unidades de pronto atendimento para o hospital da cidade de São Paulo, foi constatado que cerca de 4,5% destes foram contaminados por *Enterococcus sp* [27].

Os fungos produtores de micotoxinas, como o *Aspergillus*, são grandes contaminantes principalmente de grãos, estes constituem a principal matéria prima para a formulação de ração animal, sendo assim, os metabólitos destas toxinas podem ser encontrados em subprodutos como carne, ovos e leite [28].

A legislação brasileira e União Europeia [29] designam que o limite máximo tolerado de Aflotoxina M1 (micotoxina) no leite de vaca é de, respectivamente, 500 ng/kg e 50 ng/kg. No estado do Paraná, dois estudos encontraram valores superiores ao recomendado [30,31], já Silva, Janeiro, Bando, Machinski [32] descreveram concentrações médias de 19,6 ng/l, dentro dos limites estabelecidos.

Nas fórmulas FI 03 e FI 08 foram encontrados fungos, sendo que na primeira identificou-se como do gênero *Aspergillus*. Apesar de não ter sido realizada dosagens de micotoxinas, a presença de fungos produtores desta pode ser um indicativo da existência de contaminação por este componente.

## Conclusão

Lactentes de 0 a 6 meses possuem seu sistema imunológico ainda muito imaturo, assim se tornam especialmente propícios a infecções, as quais poderiam ser prevenidas através do aleitamento. Porém, muitos lactentes são dependentes de outras formas de alimentação, como as FI, não recebendo a proteção conferida pelo leite humano e sendo expostos a contaminações externa.

Desta forma, fica clara a importância do correto processamento e manipulação das FI, para prevenir surtos infecciosos e garantir a proteção deste indivíduo tão vulnerável.

## Agradecimentos

Agradecemos à Associação Educacional Luterana Bom Jesus/IELUSC pelo apoio, disponibilização de laboratórios, equipamentos e materiais, bem como aos monitores e coordenadora do laboratório pela atenção e disponibilidade.

## Referências

1. Soares RCS, Machado JP. Imunidade conferida pelo leite materno. Viçosa/MG. Minas Gerais: Anais SIMPAC 2012;4:205-10.
2. Sociedade Brasileira de Pediatria, Alimentação do lactente. In: Sociedade Brasileira de Pediatria (Brasil), editor. Departamento de Nutrologia. Manual de orientação: alimentação do lactente, alimentação do pré-escolar, alimentação do escolar, alimentação do adolescente, alimentação na escola. 1 ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2006. p.11-22.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes [portaria na internet]. Diário Oficial da União 22 set 2011 [acesso em 14 mar 2016].
4. Lopez FA, Nutrologia. In: Lopez FA, Campos JR, edS. Tratado de pediatria. 3 ed. Barueri: Manole; 2014. p. 1473-84.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Alimentação para Crianças não Amamentadas. In: Ministério da saúde. Saúde da criança: Nutrição infantil, aleitamento materno e alimentação complementar. 2 ed. Brasília/DF: Ministério da saúde; 2014. p 119-32.
6. Martín-Aragón MT, Marcos E. Fómulas lácteas especiales. Farmacia Profesional 2009;23:58-63.
7. Organização Mundial de Alergias (OMA). Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatr allergy imunol* 2010;21:1-125.
8. Pena FJ et al. Comparação entre uma fórmula infantil pré-espessada e fórmula de espessamento caseiro no tratamento do refluxo gastroesofágico. *J Pediatr* 2003;79:49-54.
9. Arbos KA, Freitas RJS, Stertz SC, Carvalho LA. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Cienc Tecnol Aliment* 2010;30:8215-20.
10. Rastogi S, Premendra DD, Sublash KK, Mukul D. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004;15:287-90.
11. World Health Organization (WHO). Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Geneva: Microbiological Risk Assessment Series; 2004.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos [portaria na internet]. Diário Oficial da União 10 jan 2001 [acesso em 11 nov 2016].
13. Roberts D, Microbiología Pratica de los alimentos. In: Mortimore S, Wallace C, eds. HACCP: Enfoque práctico. 1 ed. Zaragoza: Acribia; 1996. p.357-68.
14. Rossi P, Kabuki DY, Kuaye, A.Y. Avaliação microbiológica do preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2012;69:503-9.
15. Santos RFS. Ocorrência de Enterobacter Sakazakii em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades a região de campinas/SP. [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2006.



16. Linhares IW. Avaliação das condições higiênico sanitárias no preparo de fórmulas infantis em lactário hospitalar. [Dissertação] Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
17. Franco BDGM. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: Franco BDGM, Landgraf M, eds. Microbiologia dos alimentos. 1 ed. São Paulo: Ateneu; 2008. p 1-10.
18. Moraes MS, Araújo BC, Costa LEO, Nascimento JS. Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis sob diferentes condições de preparo e armazenamento. *Visa em Debate* 2015;3:48-52.
19. Rowlands RE, Papisidero 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;65:36-9.
20. Rodrigues CAP. Condições higiênico sanitárias de lactários hospitalares de Goiânia. [Dissertação] Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.
21. Reginato A, Pena FL, Trento FKS, Giordano LCRS, Kinchocu H, Antunes AEC. Qualidade microbiológica de fórmulas infantis administradas em hospital público do município de Campinas, São Paulo. *Segur Aliment Nutr* 2014;1:387-94.
22. Momesso NN, Lanziotti RS, Caproni PRR, Souza LH, Andrade MC. Estudo da contaminação microbiana no preparo de fórmulas lácteas infantis em lactário de um hospital universitário do Sul de Minas Gerais. *Rev Cienc Saude* 2016;6;1-16.
23. Vilarim JNA. Leite materno: ciência, mistérios e novas inspirações para fórmulas infantis. *Pediatr Mod* 2015;51:413-21.
24. Epifanio M. Prebióticos e probióticos nas fórmulas infantis: o que temos de evidência? *Bol Cient Ped* 2012;1:8-12.
25. Silveira LAM, D'Amorim MFG, Silva VRD, Terra APS. Controle Microbiológico do Leite Humano de um Hospital Universitário *Rev Baiana Saúde Pública* 2012;36:844-50.
26. Pesquero MA, Filho JE, Carneiro LC, Feitosa SB, Oliveira MAC, Quintana RC. Formigas em ambiente hospitalar e seu potencial como transmissoras de bactérias. *An Soc Entomol Bras* 2008;37:472-7.
27. Feijó RDF, Sassi SJG, Martino PB, Pinto CM. Avaliação da epidemiologia e da estrutura dos insumos para precauções e isolamentos em um hospital público no município de São Paulo. *Am J infect Control* 2012;1:151.
28. Neto LT, Ferreira RBH, Ferreira FD. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino brasileiro e ingestão diária estimada. *Chopinzinho/PR: Anais SIEPE* 2015;7:1-2.
29. Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) Nº 881 de 19 de Dezembro de 2006. Que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios [portaria na internet]. *Jornal Oficial da União Europeia* 20 dez 2006 [acesso em 11 nov 2016]. Disponível em: <http://www.analitus.com.br/Documentos/DocumentosSite/277328f0-aafe-4d87-9161-7e26336d10f1.pdf>
30. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem Toxicol* 2005;43:981-4.
31. Becker TA, Negrelo IF, Racoulte F, Drunkler DA. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. *Semina: Ciências Agrárias* 2010;31:707-16.
32. Silva MV, Janeiro V, Bando E, Machinski JRM. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 Intake in UHT cow milk in Paraná State. *Food Control* 2015;53:222-5.