



## **Avaliação microbiológica de fórmulas infantis manipuladas em Unidade Centralizada de Produção**

**Andrea da Costa Pereira<sup>1</sup>, Michelle Salies Boucinhas<sup>2</sup>, Emanuele de Matos Nasser<sup>3</sup>, Juliana Flores Silva<sup>4</sup>, João Carlos Mattos Silva Peixoto<sup>5</sup>, Marcia Caetano Jandre<sup>6</sup>**

A contaminação dos alimentos servidos nos hospitais pode ocorrer durante o preparo, transporte, armazenamento e administração. As fórmulas infantis à base de leite são produtos, líquidos ou em pó, destinados à alimentação de crianças ou recém-nascidos quando não puder ser utilizado o leite materno ou humano. No hospital, essas fórmulas são geralmente manipuladas no lactário ou em Unidades Centralizadas de Produção terceirizadas. A manipulação de fórmulas infantis deve receber atenção especial considerando que os pacientes a quem são destinados são, geralmente, mais suscetíveis a infecções, a desidratação e suas conseqüências. O objetivo do estudo consistiu em avaliar a carga microbiana de fórmulas infantis segundo parâmetros da RDC 63 e RDC 12 em diferentes intervalos de tempo e faixas de temperatura por até 40 horas após o preparo. Os resultados mostraram que fórmulas preparadas em condições higiênicas sanitárias adequadas garantem a qualidade final das formulações por até 40 horas após o horário de preparo, quando mantidas sob-refrigeração com temperaturas entre 2 a 8<sup>o</sup> C. E, as formulações podem ficar até 6 horas à temperatura ambiente média de 23 a 25<sup>o</sup> C. Podemos concluir que este estudo ratificou a necessidade da aplicação efetiva de pré-requisitos higiênico-sanitários utilizados durante a cadeia produtiva de preparo das fórmulas infantis para lactentes resultando em um produto seguro do ponto de vista microbiológico.

**Palavras-chave:** fórmulas infantis, microrganismos, neonatologia, pediatria, processo.

## **Microbiological evaluation of infant formula manipulated in Centralized Production Unit**

Contamination of food served in hospitals may occur during preparation, transport, storage and administration. Infant formulas are milk-based products, liquid or powder, for feeding of children or infants when breast or breast milk can not be used. At the hospital, this formula is generally handled in a lactarium or in an outsourced Centralized Production Unit. The preparation of infant formulas should have special attention, since its users are generally more susceptible to infections, dehydration, and their consequences. The aim of the study was to evaluate the microbial load of infant formulas within the parameters of the RDC63 and RDC 12 in different time intervals and temperature ranges for up to 40 hours after their preparation. The results showed that formulations prepared in hygienic manner guarantee sanitary quality for up to 40 hours after the time of their preparation when kept under cooling temperature

<sup>1</sup>Mestre em Ciências Médicas pelo programa de Pós Graduação em Nutrologia da UFRJ, Especialista em Terapia Nutricional Enteral e Parenteral pela Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro, Especialista em Nutrição Clínica pela UGF. Correspondência: Av. Guilherme Briggs nº 59, São Domingos, Niterói, RJ – Brasil CEP 24210-175. *E-mail:* andrea.pereira@gan-nutricao.com.br.

<sup>2</sup>Especialista em Terapia Nutricional Enteral e Parenteral pela Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. *E-mail:* michelle.salies@gan-nutricao.com.br.

<sup>3</sup>Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos pela UFRRJ, Especialista em Terapia Nutricional pela UERJ. *E-mail:* emanuele.nasser@gan-nutricao.com.br.

<sup>4</sup>Especialista em Nutrição Clínica pela UFF. *E-mail:* juliana.flores@gan-nutricao.com.br.

<sup>5</sup>Mestre em Medicina – Nutrologia e Diretor de Pesquisa do TNC-GAN. *E-mail:* jc.peixoto@gan-nutricao.com.br.

<sup>6</sup>Mestre em Medicina – Nutrologia e Diretora Executiva do TNC-GAN. *E-mail:* marcia.caetano@gan-nutricao.com.br.

between 2<sup>o</sup> C and 8<sup>o</sup> C. Thus, formulations may be up to 6 hours at room temperature of 23-25<sup>o</sup> C. In conclusion, this study reinforces the need of using an effective implementation of hygienic-sanitary prerequisites during the preparation chain production of infant formulas, resulting in a safe product in microbiological terms.

**Key-words:** infant formula, microorganisms, neonatology, pediatrics, process.

## INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal é a melhor opção para alimentação de pacientes hospitalizados inclusive crianças, entretanto pode tornar-se importante via para a entrada de patógenos e estabelecimento de infecção hospitalar. Os cuidados com detalhes como a manutenção da via de acesso apropriada, o preparo, a conservação, transporte e a administração da dieta, são responsáveis pelo sucesso da prevenção das complicações infecciosas quando se utiliza a nutrição enteral [1].

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) afetam o bem estar e a saúde de muitos indivíduos, apresentando maior severidade em pessoas debilitadas, notadamente as crianças hospitalizadas [1].

No Brasil as DTAs são notificadas ao Ministério da Saúde por meio de sistema informatizado denominado SINAN – Sistema de Informação de Agravo de Notificação – sendo que de janeiro de 2007

a junho de 2011 foram notificados 12.272 casos de intoxicações por ingestão de alimentos e bebidas [2]. A maior parte das DTAs que ocorre no Brasil ainda não é notificada e as identificações do agente etiológico aparecem descritas em poucos casos. Quando essas doenças são evidenciadas, em ambiente hospitalar, ocorre agravamento do quadro piorando o prognóstico clínico e nutricional do paciente podendo resultar em sérias complicações, aumento no tempo de permanência hospitalar, seqüelas e até mesmo evoluir para o óbito [3].

As fórmulas infantis em pó a base de leite também têm sido relacionadas com surtos de DTA, ocorridos principalmente em ambiente hospitalar, onde esse tipo de alimento é freqüentemente administrado às crianças internadas. A tabela a seguir (Tabela 1) mostra alguns surtos de DTA cujas fontes de contaminação detectadas foram às fórmulas infantis em pó.

**Tabela 1.** Surtos de DTAs relacionados com fórmulas infantis em pó

Local	Ano de ocorrência	Nº de casos	Nº de óbitos	Agente etiológico	Ambiente	Fonte
Chile	1984	-	-	<i>Bacillus cereus</i>	hospital	Baston, 1997 [4]
Islândia	1989	3	1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	hospital	Bierling, 1989 [5]
-	1989	4	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	Simmons, 1989 [6]
Canadá	1992	-	-	<i>Salmonella</i>	-	ICMSF, 1998 [7]
Alemanha	1994	-	-	<i>Citrobacter freundii</i>	hospital	Thurm e Gericke, 1994 [8]

As Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal têm aumentado a sobrevivência de recém-nascidos devido aos avanços na neonatologia. Porém, com o aumento da permanência dos bebês nos hospitais e o aumento do uso de procedimentos invasivos, começaram a ser mais freqüentes os casos de infecções hospitalares. Uma das mais freqüentes fontes exógenas responsáveis por surtos epidêmicos

em UTI neonatal inclui o leite materno e as fórmulas infantis a base de leite [3].

A preocupação com a segurança dos alimentos vem aumentando não apenas para as autoridades sanitárias, que estão mais próximas dos dados de ocorrências das DTAs, como também para os produtores de alimentos, cujo programa de

*marketing* inclui o termo “alimento seguro”, e mais recentemente para os consumidores, que estão adquirindo um pouco mais de informação sobre as DTAs através de meios educativos e de comunicação.

Os principais problemas microbiológicos relacionados com leite em pó e produtos derivados, como as fórmulas infantis em pó, ocorrem devido à contaminação acidental durante ou após a reconstituição do produto. A qualidade higiênico-sanitária das condições de processamento pode ser monitorada pela análise do produto pronto utilizando indicadores como a contagem de coliformes [7,9]. Entretanto, a contaminação dos alimentos servidos nos hospitais pode ocorrer durante o preparo, transporte, armazenamento e/ou administração. A matéria-prima também pode ser uma fonte de contaminação, sendo necessário o controle higiênico sanitário, não apenas nos locais de manipulação, mas em todas as etapas do processo produtivo [9,10].

As fórmulas infantis à base de leite são produtos, líquidos ou em pó, destinados à alimentação de crianças ou recém-nascidos, quando não puder ser utilizado o leite materno ou humano. No hospital, essas fórmulas são geralmente preparadas no lactário, unidade destinada ao preparo, higienização e distribuição das mamadeiras com leite e seus substitutos para alimentação infantil [11].

Estão disponíveis no mercado diversos tipos de fórmulas infantis em pó à base de leite, que foram elaboradas a partir de leite de vaca e de outros mamíferos, visando à substituição do leite humano. Como as fórmulas infantis são, geralmente, as únicas fontes de nutrientes para crianças menores de um ano internadas em hospitais, é de extrema importância que esses alimentos sejam adequados às suas necessidades nutricionais e que sejam seguros microbiologicamente, uma vez que as infecções que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida são as principais causas da elevação do índice de morbi-mortalidade entre os lactentes [12].

A ANVISA, por meio da RDC 63 de 6 de julho de 2000, determina que a manipulação da nutrição enteral deve ser realizada com técnica asséptica, seguindo procedimentos escritos e validados e estabelece a necessidade da existência de um rigoroso acompanhamento das condições de preparo, o qual deve ser realizado por meio de controles microbiológicos do processo. E o prazo de validade das formulações pode ser baseado em informações de

avaliações da estabilidade da composição e considerações sobre a sua qualidade microbiológica e ou através de realização de testes de estabilidade [13].

Assim, de acordo com as premissas levantadas a maior relevância deste trabalho é garantir um processo de preparo seguro de fórmulas infantis em lactários ou Unidades Centralizadas de Produção terceirizadas de modo a evitar possíveis riscos à saúde de crianças, em situações clínicas especiais, que irão consumir os produtos ali preparados.

O objetivo do estudo consistiu em avaliar por meio dos parâmetros determinados pelas normas da ANVISA (RDC 63 de 06 de julho de 2000 e RDC 12 de 01 de janeiro de 2001) [14] a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em amostras de fórmulas lácteas e dietas enterais pediátricas no tempo inicial, logo após o preparo, e depois de 40 horas, mantidas 34 horas sob refrigeração e 6 horas a temperatura ambiente. Foi ainda avaliado se as amostras atendem a outros parâmetros microbiológicos considerados como limite seguro pelas legislações referenciadas para *Salmonella sp.*, coliformes a 35 e 45° C, *Staphylococcus aureus*, contagem *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes*.

## METODOLOGIA

O estudo foi realizado em três ensaios (dias) consecutivos sendo contemplado em cada ensaio 6 fórmulas distintas com um total de 18 amostras analisadas. O período do estudo que consistiu entre a coleta, análise e avaliação das amostras levou cerca de 60 dias. As fórmulas infantis foram selecionadas considerando as seguintes classificações: prematuros; fórmulas de primeiro semestre; fórmula hidrolisada; fórmula a partir de 1 ano; fórmula infantil a base de proteína de soja adicionada de módulos de proteína, carboidrato e lipídio e dieta enteral pediátrica. O objetivo de diversificar os tipos de formulações se fundamentou na necessidade de avaliar todos os parâmetros da RDC 12, já que a mesma diferencia margem de contagem para todos os microrganismos de acordo com o tipo de formulação analisada. Os parâmetros da RDC 12 e da RDC 63 utilizados na análise microbiológica das amostras estão descritos na ficha padrão abaixo utilizada para identificar as mesmas após o preparo.

**Figura 1.** Ficha de identificação de amostra para análise microbiológica

<b>Data:</b> _____	<b>Lote de Produção:</b> _____	<b>Nº da Amostra/T de análise</b> _____
<b>Tipo de Leite/dieta:</b> _____	<b>Lote/validade</b> _____	<b>Horário de preparo:</b> _____
<b>Contagem de viáveis ( ) + RDC 12: ( ) item a ( ) item b ( ) item c ou RDC 63 ( )</b>		
<b>Volume da amostra:</b> _____		
<b>Manipulador:</b> _____		
<b>Embalagem de acondicionamento:</b> _____		
<p><b>Contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis com padrão de &lt; 1000ufc/ml RDC 12 de 01 de Janeiro de 2001 de acordo com grupo 25: Alimentos Infantis item A:</b> Fórmulas Infantis para crianças acima de 1 ano, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas. (pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> ausência/25g ou mL; contagem de coliformes a 35°C &lt; 20NMP/g ou mL, contagem de coliformes a 45°C &lt; 1NMP/g ou mL, contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> &lt; 50 ufc/g ou mL; contagem <i>Bacillus cereus</i> &lt; 500 ufc/g ou mL. <b>Alimentos Infantis item B:</b> Fórmulas Infantis para crianças até 1 ano, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas. (pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> ausência/25g ou mL; contagem de coliformes a 35°C &lt; 10NMP/g ou mL, contagem de coliformes a 45°C e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ausência/g ou mL; contagem <i>Bacillus cereus</i> &lt; 100 ufc/g ou mL. <b>Alimentos Infantis item C:</b> Fórmulas Infantis para prematuros, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas. (pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> ausência/25g ou mL; contagem de coliformes a 35°C &lt; 10NMP/g ou mL, contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> e contagem de coliformes a 45°C ausência/g ou mL; contagem <i>Bacillus cereus</i> &lt; 50 ufc/g ou mL. E a amostra de dieta enteral será analisada <b>segundo RDC 63:</b> Contagem de <i>Bacillus cereus</i> &lt; 1000 ufc/mL, contagem de coliformes a 35, 45°C, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>. &lt; 3 NMP/mL, contagem de <i>Clostridium perfringens</i> &lt; 1000 ufc/mL, <i>Salmonella sp.</i>, pesq. <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i> ausência/25 mL.</p>		

Fonte: RDC 63 – ANVISA, 2000 e RDC 12 – ANVISA 2001 <sup>[13,14]</sup>.

A Resolução RDC nº 12 de 01 de Janeiro de 2001 não estabelece padrão microbiológico para contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais para fórmulas infantis Segundo o *Compliance Program Guidance Manual* da *Foodand Drug Administration* (FDA), a quantidade máxima aceitável para mesófilos totais em fórmula infantil é de 10.000 células por g ou mL de alimento <sup>[15]</sup>. Já a RDC 63 de 6 de Janeiro de 2000 preconiza uma contagem de até 1000 ufc/mL. Para este estudo utilizamos esse último parâmetro como limite máximo para todas as amostras analisadas.

Para cada formulação foi preparado um lote de 7 amostras identificadas como tempo zero (Amostra 1 – T0), analisada logo após o preparo. E, as

outras 6 amostras foram armazenadas a temperatura controlada de 2 a 8°C e analisadas, sucessivamente, 10 horas após o preparo (Amostra 2 – T10), 28 horas (Amostra 3 – T28) e 34 horas (Amostra 4 – T34). Após 34 horas sob-refrigeração, as 3 amostras restantes foram retiradas da refrigeração e mantidas, em laboratório, em temperatura ambiente média controlada de 20 a 25° C e analisadas após 2 horas – 36 horas após o preparo (Amostra 5 – T2), 4 horas – 38 horas após o preparo (Amostra 6 – T4) e 6 horas após o preparo – 40 horas (Amostra 7 – T6).

**Tabela 2.** Desenho Experimental

Tempo de Validade	F1 Fórmula para prematuro 115,73 g	F2 Fórmula infantil de primeiro semestre 100,33 g	F3 Fórmula infantil a partir de 1 ano - LVE 91g + 35g + 21g	F4 Fórmula infantil a base de proteína de soja adicionada de módulo de LIP, PTN e CH 102,67 g + 21mL + 3,5g + 14g	F5 Fórmula Infantil a base de proteína hidrolisada 100,33g	F6 Nutrição Enteral Pediátrica 231g
Amostra 1	T0 - 100mL	T0 - 100mL	T0 - 100mL	T0 - 100mL	T0 - 100mL	T0 - 150mL
Amostra 2	T10 (2 a 8°C) 50ml	T10 (2 a 8°C) 50ml	T10 (2 a 8°C) 50ml	T10 (2 a 8°C) 50ml	T10 (2 a 8°C) 50ml	T10 (2 a 8°C) 50ml
Amostra 3	T28 (2 a 8°C) 50ml	T28 (2 a 8°C) 50ml	T28 (2 a 8°C) 50ml	T28 (2 a 8°C) 50ml	T28 (2 a 8°C) 50ml	T28 (2 a 8°C) 50ml
Amostra 4	T34 (2 a 8°C) 100ml	T34 (2 a 8°C) 100ml	T34 (2 a 8°C) 100ml	T34 (2 a 8°C) 100ml	T34 (2 a 8°C) 100ml	T34 (2 a 8°C) 150ml
Amostra 5	T2 (20 a 25°C) 50ml	T2 (20 a 25°C) 50ml	T2 (20 a 25°C) 50ml	T2 (20 a 25°C) 50ml	T2 (20 a 25°C) 50ml	T2 (20 a 25°C) 50ml
Amostra 6	T4 (20 a 25°C) 50ml	T4 (20 a 25°C) 50ml	T4 (20 a 25°C) 50ml	T4 (20 a 25°C) 50ml	T4 (20 a 25°C) 50ml	T4 (20 a 25°C) 150ml
Amostra 7	T6 (20 a 25°C) 100ml	T6 (20 a 25°C) 100ml	T6 (20 a 25°C) 100ml	T6 (20 a 25°C) 100ml	T6 (20 a 25°C) 100ml	T6 (20 a 25°C) 150ml

Legenda: F1 = Fórmula 1, F2 = Fórmula 2, F3 = Fórmula 3, F4 = Fórmula 4, F5 = Fórmula 5, F 6 = Fórmula 6, LIP = Lipídio, PTN= Proteína, CH= Carboidrato

Para o preparo das formulações foi considerada a diluição padrão de cada produto segundo informação do fabricante. A Tabela 2 mostra o desenho utilizado no preparo das formulações numa Unidade Centralizada de Produção terceirizada. As formulações foram codificadas de 1 a 6 de acordo com o tipo de produto utilizado e as 7 amostras preparadas para cada tipo de fórmula foram devidamente acondicionadas na embalagem própria utilizada habitualmente no fornecimento dos produtos para as unidades hospitalares. Depois foram armazenadas em frascadeiras térmicas com temperatura controlada de 2 a 8<sup>o</sup> C e enviadas para o laboratório de análise com tempo de transporte máximo de 30 minutos.

As análises foram feitas segundo o *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods* e realizada contagem de bactérias aeróbias mesófilas pela técnica *pour plate* Agar padrão para viáveis com padrão <1000ufc/mL<sup>[6]</sup> em todas as amostras analisadas com objetivo de avaliar o perfil de crescimento microbiano ao longo do tempo. Nos dois extremos T0 e o T40 foram realizadas análises microbiológicas de acordo com os parâmetros definidos na RDC 12 por categoria de fórmula infantil como prematuros, primeiro ano de vida e a partir de 1

ano e dieta enteral segundo a RDC 63. Parâmetros descritos na ficha de identificação acima (Figura 1), que consiste na ficha de identificação das amostras.

Para descartar qualquer desvio no processo aplicado à validação foram retiradas amostras de 50g ou mL dos módulos adicionais utilizados nas formulações preparadas para análise em paralelo segundo técnica de contagem descrita acima.

Para cada fórmula preparada, em cada ensaio, foi utilizado um copo de liquidificador previamente lavado e higienizado de acordo com técnica definida em procedimento interno e validado na Unidade de Produção. Antes da utilização dos mesmos, um volume de 100 mL de água peptonada foi adicionado a cada copo de liquidificador levando-os à base e deixando bater por cerca de 1 minuto para avaliar a eficácia do processo de lavagem e sanitização. Depois foi transferido o conteúdo da água peptonada para o frasco estéril para realização de análise microbiológica considerando contagem de microrganismos viáveis com padrão <10 ufc/g ou mL.

Além das amostras avaliadas quanto ao tempo de prateleira os pontos de controle de processo, que podem caracterizar desvio de qualidade, foram

também analisados de acordo com critérios identificados abaixo:

- Análise microbiológica da água de preparo segundo Portaria 2914 [17] e RDC 12/2001 – parâmetros: *coliformes totais*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* ausência em 100 mL; contagem de bactérias heterotróficas <500 ufc/mL, Cloro residual livre 0,2 a 5 mg/l, Cor Aparente <15 uH, Turbidez 5 UNT, Sólidos Dissolvidos Totais 1000 mg/l e pH 6 a 9,5;
- Placa de toque de manipulador – parâmetro <10 ufc/g ou mL;
- Placa de superfície (Bancada de preparo e cuba de higienização de utensílios) – parâmetro <10 ufc/g ou mL (média de 5 pontos).

Os resultados foram analisados de acordo com os padrões das normas vigentes e submetidos a tratamento estatístico por meio da adoção do *test T*, para amostras pareadas entre o tempo inicial e o final para avaliação de diferenças quantitativas de crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos considerando o grau de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação de fórmulas nutricionais, incluindo as fórmulas lácteas utilizadas como substitutas do leite materno em crianças principalmente hospitalizadas, tem sido implicada na etiologia das infecções hospitalares, especialmente quando administradas a pacientes imunocomprometidos [18,19]. Um dos fatores diretamente relacionados à contaminação é o processo de manipulação, ou seja, diluição destas formulações em ambientes inadequados assim como processos não validados e controlados.

Os laudos microbiológicos de todas as amostras avaliadas neste estudo, em diferentes tempos, demonstraram resultados inferiores ao valor preconizado pela legislação utilizada. Ao aplicar o *test T* para amostras pareadas entre o T0 e o T6 (40 horas) verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa de crescimento microbiano entre as amostras nos três ensaios realizados.

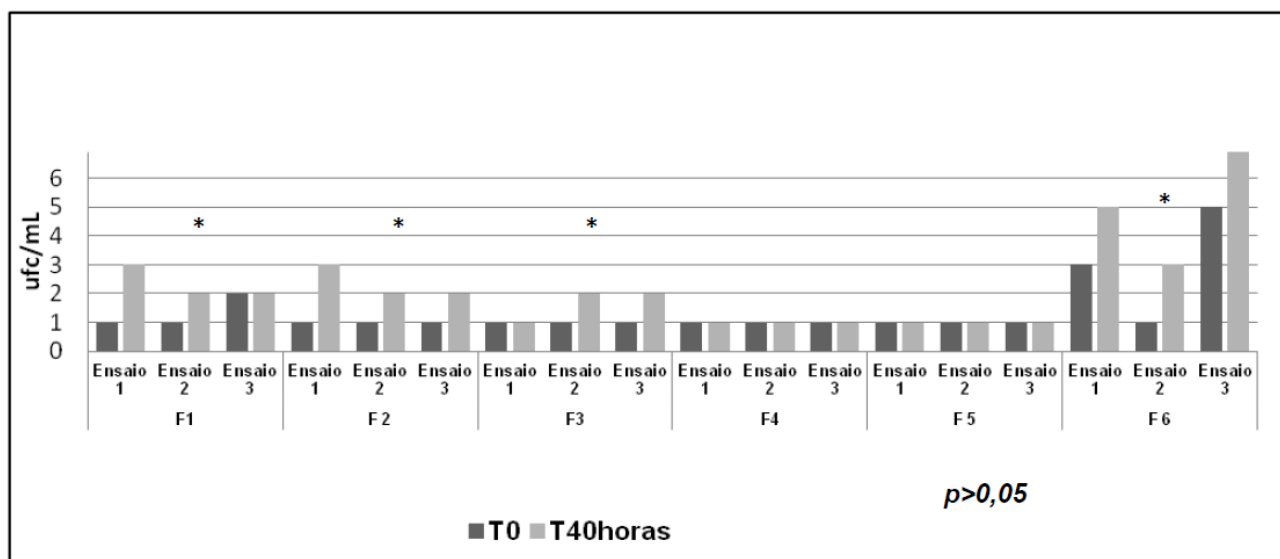
**Tabela 3.** Resultados de Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas Viáveis em Amostras de Leite e Dieta Enteral Pediátrica

Fórmulas/Ensaio	Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas Viáveis (ufc/g ou ml)						
	2 a 8°C				20 a 25°C		
	T0	T10	T28	T34	T2	T4	T6 (40 horas após preparo)
Fórmula 1 – 1ª Ensaio	<1	<1	3	3	2	4	3
Fórmula 1 – 2ª Ensaio	1	2	1	2	2	2	2
Fórmula 1 – 3ª Ensaio	2	3	2	2	2	2	2
Fórmula 2 – 1ª Ensaio	<1	<1	<1	<1	2	4	3
Fórmula 2 – 2ª Ensaio	1	2	1	2	1	2	2
Fórmula 2 – 3ª Ensaio	1	1	2	1	3	2	2
Fórmula 3 – 1ª Ensaio	<1	<1	1	1	1	1	1
Fórmula 3 – 2ª Ensaio	1	2	1	2	2	2	2
Fórmula 3 – 3ª Ensaio	1	1	2	1	1	2	2
Fórmula 4 – 1ª Ensaio	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Fórmula 4 – 2ª Ensaio	<1	<1	1	<1	<1	<1	1
Fórmula 4 – 3ª Ensaio	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Continua

**Tabela 3.** Continuação

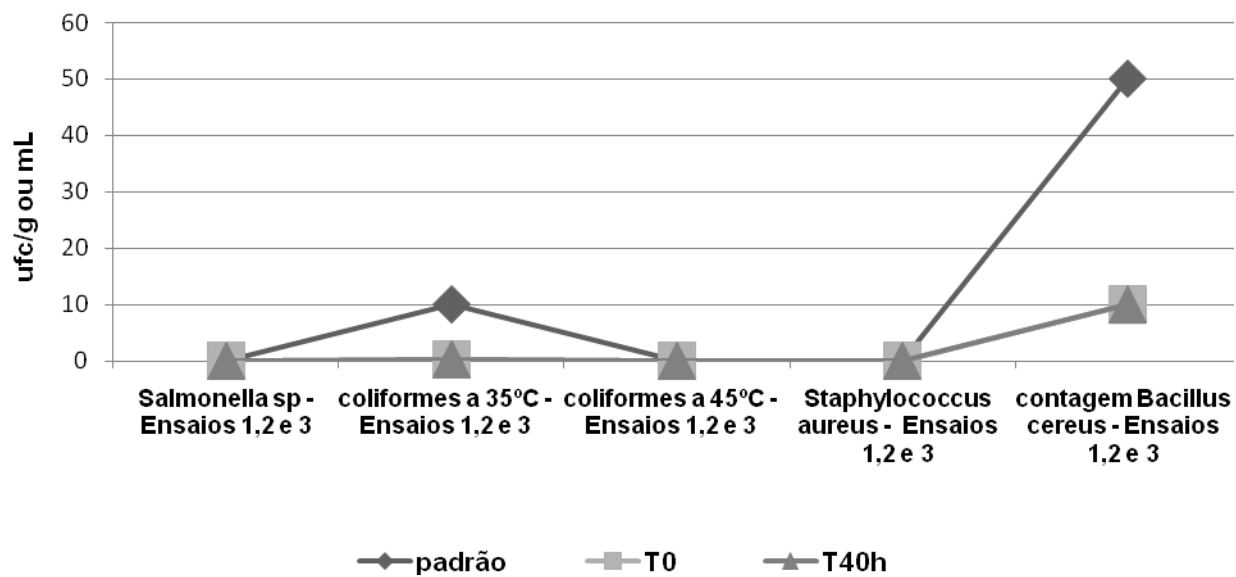
Fórmulas/Ensaio	Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas Viáveis (ufc/g ou ml)						
	2 a 8°C				20 a 25°C		
	T0	T10	T28	T34	T2	T4	T6 (40 horas após preparo)
Fórmula 5 – 1ª Ensaio	<1	<1	<1	<1	1	1	<1
Fórmula 5 – 2ª Ensaio	<1	<1	1	<1	1	<1	1
Fórmula 5 – 3ª Ensaio	<1	<1	1	<1	1	1	1
Fórmula 6 – 1ª Ensaio	3	3	5	5	4	4	5
Fórmula 6 – 2ª Ensaio	1	2	2	3	3	3	3
Fórmula 6 – 3ª Ensaio	5	5	7	8	7	6	7

**Figura 2.** Contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis nas formulações

A fórmula 1 apresentou  $p = 0,23$ , a 2  $p = 0,06$ , a 3  $p = 0,18$  e a 6  $p = 0,29$ . As fórmulas 4 e 5 não apresentaram nenhum tipo de crescimento entre o tempo inicial e o final. A amostra que apresentou maior crescimento foi a fórmula 6 com média de contagem no tempo final de 5 ufc/mL entre os três ensaios; isto representa menos de 1% de crescimento

comparado ao limite máximo preconizado para os microrganismos aeróbios mesófilos de 1000 ufc/mL. Os resultados que estão expressos na Tabela 3 e na Figura 2 mostram que não ocorreu crescimento microbiano significativo que comprometa a qualidade final do produto.

**Figura 3.** Padrão de crescimento das Fórmulas Infantis de 1 a 5, de acordo com os critérios da RDC 12



A Figura 3 representa a contagem específica por microorganismo segunda a RDC 12 e verificou-se que não houve crescimento de nenhum dos patógenos estudados.



**Tabela 4.** Resultados das análises microbiológicas de dietas enterais de acordo com a RDC 63

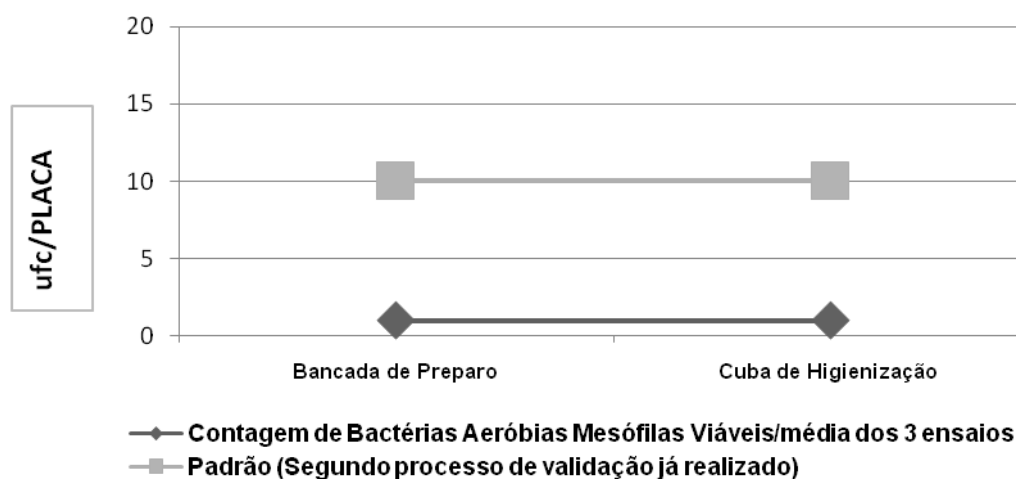
Microorganismos/ Ensaio	F 6 – 1º Ensaio			F 6 – 2º Ensaio			F 6 – 3º Ensaio		
	T0	T6 (40H)	Padrão	T0	T6 (40H)	Padrão	T0	T6 (40H)	Padrão
Coliformes totais	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL
<i>Escherichia coli</i>	<0,3	< 0,3	<3 NMP/mL	<0,3	<0,3	<3 NMP/mL	<0,3	<0,3	<3 NMP/mL
<i>Salmonella sp.</i>	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL
<i>Bacillus cereus</i>	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL
<i>Clostridium perfringens</i>	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL	<10	<10	<1000 UFC/g ou mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL	0	0	Ausência em 25g ou mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL	<0,3	<0,3	3 NMP/g ou mL

A Tabela 4 mostra que os resultados microbiológicos da formulação 6 estão de acordo com os microorganismos especificados pela RDC 63.

No que se refere ao crescimento não significativo das amostras entre o T0 e o T final após 40 horas indica que o controle da temperatura média de estocagem controlada entre 2 a 8°C é necessária para evitar o crescimento microbiano em soluções extemporâneas, como, por exemplo, as fórmulas infantis manipuladas. Vale ressaltar a segurança do processo utilizado, pois no estudo as formulações foram mantidas 34 horas sob refrigeração em temperatura controlada, segundo a faixa descrita acima, e mais 6 horas à temperatura ambiente média de 23 a 25°C sem apresentar crescimento microbiano expressivo que justificasse comprometimento na utilização das formulações lácteas preparadas nestas condições.

Dois estudos mostraram que o controle da temperatura de estocagem deste tipo de formulação é realmente indispensável para evitar crescimento microbiano. O primeiro verificou uma redução no número de microrganismos mesófilos e coliformes após estocagem das fórmulas lácteas já diluídas a 4°C durante seis horas [19]. E, o outro, indicou redução também dos mesmos microrganismos após 20 horas de estocagem na mesma temperatura média [20]. Essa redução pode ser justificada pela baixa temperatura e a sua capacidade de promover a morte celular em microrganismos da família das Enterobacteriaceas [21]. Outra possível causa seria a presença de alta concentração de lactose nas fórmulas infantis cujo transporte para o interior da célula bacteriana poderia causar a morte do microrganismo devido ao colapso da forma quimiosmótica [22].

**Figura 4.** Análises microbiológicas das superfícies utilizadas no processo de validação



O crescimento microbiano num tipo de alimento como este, quando acima dos parâmetros sanitários, pode estar diretamente relacionado ao tempo e a temperatura de exposição do produto ao ambiente. Segundo Heuvelink em 2009 [23], evidências indicam claramente que se a fórmula é preparada em condições de higiene adequada assim como armazenadas em temperatura devidamente controlada quando não destinadas ao consumo imediato, o risco de ocorrer crescimento inesperado é significativamente menor. Isto corrobora com os resultados deste

trabalho no que tange a área produtiva de preparo das amostras cujos resultados mostraram que tanto as superfícies de preparo das formulações nos três ensaios quanto a cuba de higienização dos utensílios apresentaram contagem <1 ufc/mL, mostrando uma eficácia de quase 99,9% no processo de sanitização desses pontos (Figura 4).

Segundo a *American Public Health Association* (APHA), a microbiota típica do leite em pó é composta por micrococostermofílicos, estreptococos

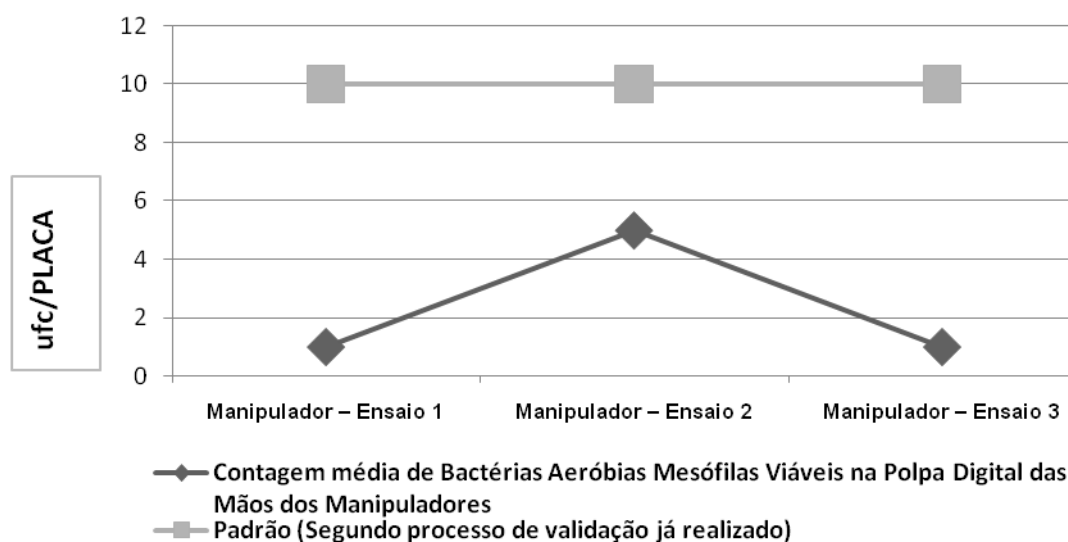
termófilos e micro-organismos aeróbios formadores de esporos, como o *Bacillus cereus*. A presença de bactéria do grupo dos coliformes e bactérias psicrotólicas neste produto pode indicar contaminação pós-processamento, transmitida pelo manipulador, pela água, pelo ar, por equipamentos e utensílios [24].

Os principais problemas microbiológicos relacionados ao leite em pó e derivados, como as fórmulas infantis em pó, ocorrem devido à

contaminação acidental durante ou após a reconstituição do produto [24].

Deste modo, controlar as etapas envolvidas diretamente na diluição das fórmulas é condição primordial para garantir a qualidade final do produto a ser consumido pelas crianças.

**Figura 5.** Análises microbiológicas da polpa digital dos manipuladores



Em todo o mundo, os indivíduos responsáveis pela preparação das fórmulas infantis no lactário dos hospitais foram considerados possíveis portadores assintomáticos de microorganismos patogênicos e podem representar uma fonte contínua de contaminação [25]. A lavagem das mãos com água e sabão (degermantes específicos) é uma das medidas mais simples e eficazes para prevenir infecções. O álcool a 70% também pode ser utilizado como desinfetante, de preferência após a lavagem das mãos com o degermante para complementar a antiseptia [26]. No estudo, os resultados de contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis na polpa digital da mão dos colaboradores que prepararam as amostras mostraram que a técnica validada e controlada rotineiramente de anti-sepsia utilizada é adequada para evitar qualquer tipo de desvio no processo de qualidade final do produto (Figura 5). Segundo a legislação vigente, não há exigência para classificação

de área para produção de dietas enterais e fórmulas infantis. Entretanto, a área utilizada na manipulação das fórmulas é classificada como 100.000 (ISO 8) e, o ponto de corte utilizado no processo validado de antiseptia dos manipuladores de até 10 ufc/mL, bastante seguro uma vez que para a USP (*United States Pharmacopeia*) [27] este valor é utilizado como limite máximo para áreas classe 10.000.

A água utilizada para o preparo de dietas enterais também pode ser veículo de microorganismos, mostrando que as fontes de contaminação são amplas e variadas. Com base em revisão da literatura, Freedland *et al.* em 1989 [28] registraram uma taxa de 30% a 90% de contaminação em sistemas de alimentação enteral, normalmente associada à falta de atenção dos manipuladores para com as técnicas de higiene adequadas do mesmo modo com utilização de sistemas de água imprópria para o consumo e

utilização neste tipo de formulações. Weisstaub 2012 [29] mostrou, em sua revisão, que a água é um dos principais veículos de contaminação de fórmulas. Assim uma vez contaminada, se utilizada na diluição de fórmulas infantis, o crescimento microbiano pode

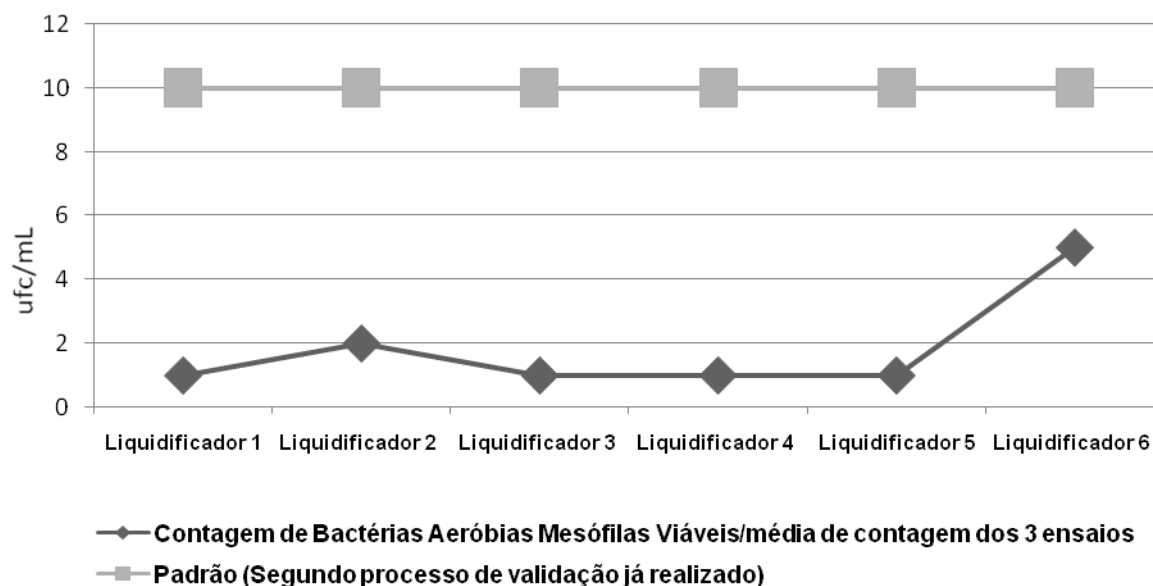
uplicar em 20 a 30 minutos após o preparo se mantidas a temperatura ambiente.

**Tabela 5.** Resultados das Análises Microbiológicas da Água Utilizada no Preparo das Formulações

Microrganismos	Análise de Água	Padrão – Portaria 2914 e RDC 12
<b>1º Ensaio</b>		
Coliformes Totais	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
Bactérias Heterotróficas	<1	500 UFC/mL
Cloro Residual Livre	0,2	0,2 a 5 mg/l
Cor Aparente	<2,5	15 uH
Turbidez	0,4	5 UNT
Sólidos Dissolvidos Totais	41	1000 mg/l
pH	7.0	6 a 9.5
<b>2º Ensaio</b>		
Coliformes Totais	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
Bactérias Heterotróficas	<1	500 UFC/mL
Cloro Residual Livre	0,5	0,2 a 5 mg/l
Cor Aparente	<2,5	15 uH
Turbidez	0,4	5 UNT
Sólidos Dissolvidos Totais	41	1000 mg/l
pH	6.9	6 a 9.5
<b>3º Ensaio</b>		
Coliformes Totais	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência em 100 mL
Bactérias Heterotróficas	2	500 UFC/mL
Cloro Residual Livre	0,5	0,2 a 5 mg/l
Cor Aparente	<2,5	15 uH
Turbidez	0,4	5 UNT
Sólidos Dissolvidos Totais	39	1000 mg/l
pH	6.9	6 a 9.5

Neste estudo, antes de cada ensaio foi analisada a qualidade da água utilizada e esta se mostrou adequada para o preparo das fórmulas, conforme mostra a Tabela 5, atendendo as especificações da portaria 2914 e da RDC 12. O tratamento da água utilizada no preparo das formulações baseia-se num mecanismo de ultra purificação que consiste de três fases de filtração, a primeira etapa a água passa por um filtro de 25 micra depois um de 5 micra e na etapa final, ou seja, na bica

de coleta da água um filtro de 1 *micron* com sistema final de refrigeração permitindo que a água saia em temperatura (2° a 8°C) própria para o preparo das formulações.

**Figura 6.** Análises microbiológicas de liquidificadores utilizados no preparo das amostras

No preparo de fórmulas lácteas podemos destacar que, dentro dos critérios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), alguns pontos são considerados críticos, quanto ao ponto de vista microbiológico, neste processo para a garantia de qualidade final dos produtos. Neste sentido, além da água de diluição das fórmulas os utensílios utilizados no preparo como, por exemplo, os copos de liquidificadores. Não existe na legislação da ANVISA limite seguro de carga microbiana para este tipo de utensílio. Entretanto, podemos considerar que os resultados da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos obtidos nos copos utilizados no estudo apresentaram uma contagem baixa quando comparado aos resultados obtidos em outros estudos

além de estar de acordo com as especificações aprovadas pela ANVISA em processo interno da Unidade Centralizada de Produção em questão (Figura 6). Estes dados diferem de outros trabalhos como o de Rossi em 2010 [17] que avaliou o processo de sanitização de copos de liquidificadores e verificou que estes apresentaram contagem de microrganismos mesófilos totais muito acima do limite recomendado pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (100 ufc/equipamento) com valores entre  $4,7 \times 10^3$  e  $6,2 \times 10^7$  ufc/equipamento.

**Tabela 6.** Resultados das análises microbiológicas de amostras de produtos utilizados nas formulações

Produtos	Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas Viáveis	Padrão RDC 63
Módulo de lipídio	<10	<1000ufc/mL
Cereal a base de arroz	<10	
Módulo de carboidrato	<10	
Leite em pó integral	<10	
Módulo de proteína	<10	

A utilização de insumos proveniente de fornecedores qualificados possibilita a qualidade final destes tipos de formulações após diluição. Estes tipos de produtos são utilizados mediante laudo analítico que garante padrão microbiológico dentro das especificações da legislação vigente, entretanto, foram avaliados os laudos analíticos dos produtos fornecidos pelos fabricantes para verificar se os mesmos estavam aprovados para serem utilizados. Aqueles produtos que não tinham laudo analítico foram realizadas análises segundo padrão de contagem de bactérias aeróbias mesófilas com ponto de corte <1000 ufc/g ou ml. Os resultados apresentaram contagem dentro dos padrões da legislação vigente (Tabela 6).

Para finalizar, destaca-se que apesar das amostras analisadas não apresentarem crescimento microbiano expressivo nos diferentes intervalos de tempo analisados e, não apresentarem crescimento fora das especificações da RDC 12 e 63 quanto à contagem de outros microrganismos indicadores de qualidade, este fato não diminui o risco que as fórmulas lácteas infantis reconstituídas representam. É necessário, neste tipo de segmento, controle sistemático de processo com implantação de indicadores de qualidade que promovam melhorias contínuas ao processo garantindo sempre produto final dentro dos padrões de qualidade exigidos legalmente.

## CONCLUSÃO

Podemos concluir que a falta da aplicação efetiva dos pré-requisitos higiênico e sanitários durante o preparo das fórmulas infantis para lactentes, resulta em um produto microbiologicamente inseguro para crianças em estado de saúde debilitado. Neste sentido, foi evidenciado no estudo que o processo de preparo das formulações infantis em Unidade Centralizada de Produção, que atende aos requisitos exigidos pelas legislações vigentes, garante a qualidade final das formulações por até 40 horas após o horário de preparo quando mantidas sob-refrigeração, em temperatura controlada de 2 a 8<sup>o</sup> C. As formulações podem ficar até 6 horas à temperatura ambiente média de 23 a 25<sup>o</sup> C.

## REFERÊNCIAS

[1] Correia MITD, Novais JAV, Cassiano MC. Controle de Infecção na Terapia Nutricional Enteral e Parenteral. In: Oliveira, AC. Infecções Hospitalares. Epidemiologia, prevenção e controle. São Paulo: Medsi, 2005. p. 562-573.

[2] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis por Alimentos no Brasil, 1989-2004. 2005 [acesso em 05 mar 2011]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf>

[3] CVE/SES-SP. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis por Alimentos – VEDTA. Normas e Instruções. DDTHA/CVE. São Paulo; 2002,

[4] Baston LML. Esporos de *Bacillus cereus*: indicadores biológicos na higienização de mamadeiras em lactário [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 1997.

[5] Bierling G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrímsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol. 1989;29:2054-2056.

[6] Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts I, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infection Control and Hospital Epidemiology. 1989;10:398-401.

[7] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens. London; 1998. v.5.

[8] Thurm V, Gericke B. Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. J Appl Bacteriol. 1994;76(6):553-558.

[9] American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. 3<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, 1992.

[10] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

[11] Mezomo IF. Serviço de nutrição e dietética. São Paulo: União Social Camiliana, 1987.

[12] Santos RFS. Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP [dissertação de mestrado]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP; 2006.

[13] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 63. Aprova o Regulamento Técnico que fixa os requisitos mínimos

- exigidos para a Terapia de Nutrição Enteral. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. 07 de julho de 2000.
- [14] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. 10 de janeiro de 2001.
- [15] U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration. Compliance Program Guidance Manual. In: Food Composition, Standards, Labeling and Economics. US: FDA; 2006.
- [16] Downes FP, Ito K. Compendium of Methods for de microbiological examination of foods. Washington: APHA; 2004.
- [17] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 2.914. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. 04 de janeiro de 2012.
- [18] Matlow A, Wray R, Goldman C, Streitenberger L, Freeman R, Kovach D. Microbial contamination of enteral feed administration sets in a pediatric institution. *Am J Infect Control.* 2003;31(1):49-53.
- [19] Nienov AT, Macedo MB, Félix C, Ramos D, Moreira AN, Silva PEA. Qualidade higiênico-sanitária de formulações ministradas a neonatos. *Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* 2009;34(2):127-138.
- [20] Carneiro LA, Silva AP, Meguior VL, Queiroz ML. Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMSMicrobiol Lett.* 2003;228(2):175-179.
- [21] Iversen C, Forsythe SJ. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology.* 2004;21:771-777.
- [22] Dykhuizen D, Hartl D. Transport by lactose permease of *Escherichia coli* as the basis of lactose killing. *J Bacteriol.* 1978;135(3):876-882.
- [23] Heuvelink AE, VanHeerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG, Hofhuis A, Hoekstra T, De Boer E. Two outbreaks of *campylobacteriosis* associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol.* 2009;134:70-74.
- [24] Rossi P, Kabuki DY, Kuaye AY. Avaliação microbiológica do preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(4):503-9.
- [25] Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. *J Food Prot.* 2008;71:2339-2373.
- [26] Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. US: MMWR; 2002.
- [27] The United States Pharmacopeia. 31<sup>th</sup> edition. <1116> Microbiological Evaluation of Clean Rooms and a Other Controlled Environments; 2008.
- [28] Freedland CP, Roller RD, Wolfe BM, Flynn NM. Microbial contamination of continuous drip feedings. *J Parenteral Enteral Nutr.* 1989;13(1):18-22.
- [29] Weisstaub G, Uauy R. Non-Breast Milk Feeding in Developing Countries: Challenge from Microbial and Chemical Contaminants. *Ann Nutr Metab.* 2012;60:215-219.