



AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *Cronobacter* EM ALIMENTOS DE BAIXA ATIVIDADE DE ÁGUA

Palavras-Chave: *Cronobacter*, Resistência dessecativa, Alimentos de Baixa Atividade de água

Autores(as):

Pedro Artur Zanotto, Diana Mara Dias Arroyo

Prof^(a). Dr^(a). Maristela da Silva Nascimento (orientador(a))

INTRODUÇÃO:

Cronobacter é um gênero de bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae que inclui sete espécies, sendo estas: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimentii*.

Cronobacter vem sendo uma grande preocupação para indústria de alimentos, especialmente para alimentos de baixa umidade, uma vez que apresenta sobrevivência a longo prazo em matrizes secas (BURGESS et al., 2016). São considerados alimentos de baixa umidade, alimentos com atividade de água (aw) < 0,85 (YOUNG et al., 2015). Outro grande problema causado por *Cronobacter* é a frequente presença em alimentos para o público infantil e casos de infecção em recém-nascidos e crianças apresentam uma elevada taxa de letalidade (GAN et al., 2021). O Codex Alimentarius estabelece como critério a ausência de *Cronobacter* em 10 g de fórmula infantil (CODEX, 2008). No entanto, uma dose infecciosa muito baixa (0,36–66 UFC/100 g) poderia ocasionar surtos em neonatos (DODD, 2017).

Entre os anos de 1961 e 2018, 183 casos de infecções infantis por *Cronobacter* foram relatados em todo o mundo, sendo a maioria dos casos nos EUA (79) e Reino Unido (35) (STRYSKO et al., 2020). Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA) notificou a presença de *Cronobacter* em fórmulas infantis produzidas nos EUA e comercializadas em diversos países (FDA, 2022). Além disso, as infecções por *Cronobacter* possivelmente são subnotificadas, devido à identificação errônea do microrganismo e a não obrigatoriedade da notificação de casos de infecções na maioria dos países (HOLY; FORSYTHE, 2014; PATRICK et al., 2014).

A partir do conhecimento sobre o comportamento de *Cronobacter* em alimentos de baixa umidade é possível estabelecer medidas de controle e prevenção mais efetivas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de *Cronobacter* em matrizes de baixa atividade de água por inoculação a seco.

METODOLOGIA:

As amostras em estudo foram adquiridas no varejo de Campinas-SP: leite em pó integral, fórmula infantil em pó, farinha de trigo e fubá mimoso. Para a preparação do inóculo, foram utilizadas cinco cepas de *Cronobacter sakazakii* isoladas de matrizes secas (farinha de rosca e farinha láctea, todos isolados de origem brasileira) concedidas pela Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, cuja codificação original das cepas de 1 a 5 foi respectivamente: P4499, P4787, P4791, P4795, P4798.

Após a ativação das cepas em ágar tripticase de soja (TSA), foi preparado o inóculo composto por um "pool" dos microrganismos em solução salina 0,85%. Então, foi transferido 5 mL para tubos de ensaio contendo 15 g de pérolas de vidro estéreis (LIU et al, 2019; XU et al, 2020). Após 5 min de contato, retirou-se o excesso de líquido. Em seguida, as pérolas foram secas por 90 min em cabine de fluxo laminar. As pérolas de vidro previamente inoculadas foram transferidas para frascos estéreis contendo 5 g de cada alimento. E, em seguida, os frascos foram submetidos à agitação a 300 rpm por 5 min. Para determinação da viabilidade de *Cronobacter*, foram realizadas contagens nos tempos 0, 2, 5, 7 e 15 dias de incubação a 37°C. As células foram determinadas, por plaqueamento em superfície em ágar TSA e incubação a 37°C/18-27h. A atividade de água dos alimentos foi averiguada pelo medidor Aqualab em cada etapa do estudo. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes. Os dados foram tratados pelo software estatístico SAS, através de Anova e teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As contagens de *Cronobacter* obtidas ao longo de 15 dias de estocagem a 37°C em amostras de fórmula infantil, leite em pó integral, farinha de trigo e fubá inoculadas a seco, são apresentadas na Figura 1. As atividades de água das amostras estão dispostas na Tabela 1.

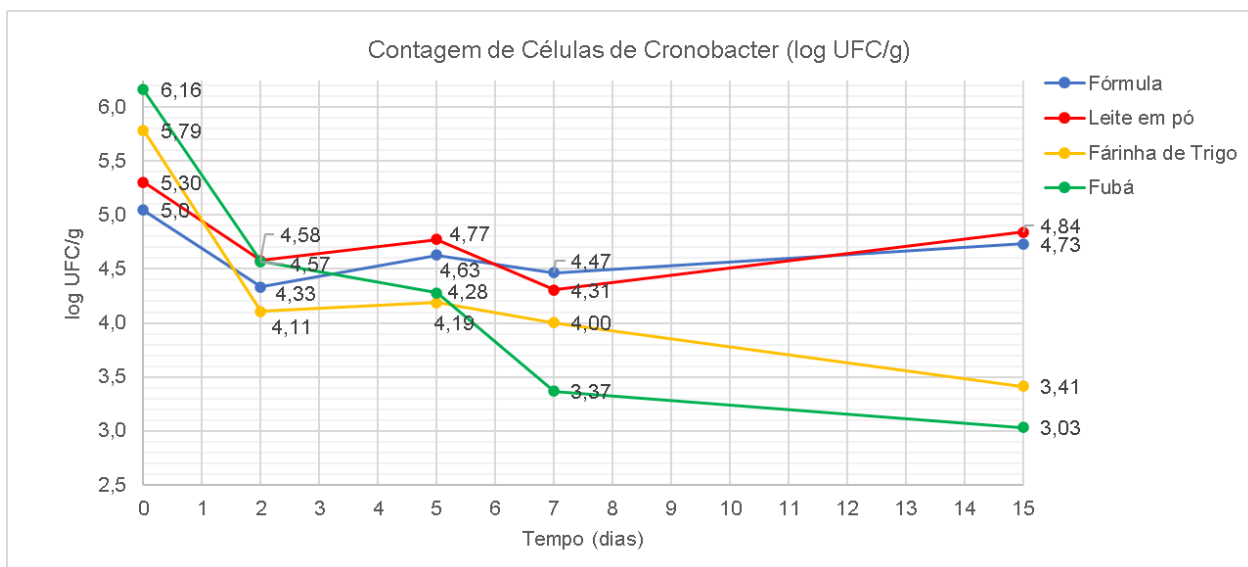


Figura 1. Contagem de *Cronobacter sakazakii* em amostras de fórmula infantil, leite em pó, farinha de trigo e fubá por 15 dias.

De acordo com os resultados obtidos das quatro matrizes estudadas, observou-se dois grupos com comportamentos semelhantes, sendo o primeiro grupo formado por leite em pó e fórmula infantil e o segundo grupo formado por farinha de trigo e fubá. Houve diferença significativa nas contagens de 0 e 2 dias para a farinha, porém não houve para os próximos tempos de armazenamento, de 2 a 15 dias ($p < 0,05$). Quanto ao fubá, observa-se a maior redução logarítmica entre as matrizes, verificou-se diferença significativa na contagem inicial para 2 dias, não diferiu significativamente até 7 dias e apresentou outra redução aos 15 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

Quanto ao leite em pó e fórmula infantil, não houve diferença significativa nas contagens de células em todos os períodos de armazenamento ($p < 0,05$).

Tabela 1. Atividade de água dos veículos armazenados a 37°C

Tempo (dias)	Atividade de Água			
	Fórmula Infantil	Leite em Pó	Farinha de Trigo	Fubá mimoso
0	0,308 ± 0,01 ^a	0,319 ± 0,01 ^a	0,485 ± 0,1 ^c	0,478 ± 0,09 ^c
2	0,255 ± 0,01 ^b	0,275 ± 0,01 ^a	0,473 ± 0,1 ^c	0,457 ± 0,09 ^c
5	0,272 ± 0,006 ^{ab}	0,279 ± 0,01 ^a	0,459 ± 0,1 ^c	0,445 ± 0,08 ^c
7	0,266 ± 0,02 ^{ab}	0,267 ± 0,02 ^a	0,435 ± 0,2 ^c	0,408 ± 0,08 ^{cd}
15	0,295 ± 0,02 ^{ab}	0,407 ± 0,1 ^a	0,367 ± 0,1 ^d	0,325 ± 0,06 ^d

*Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

Quanto à atividade de água, o mesmo fenômeno foi observado, indicando correlação entre atividade de água e sobrevivência do microrganismo. Houve a formação de dois grupos que não diferiram significativamente ($p < 0,05$), primeiro grupo composto por leite em pó e fórmula infantil e o segundo, farinha e fubá. Percebe-se que houve redução significativa da atividade de água entre 7 e 15 dias de armazenamento tanto para o fubá quanto para farinha ($p < 0,05$). Pode-se correlacionar com a maior redução na contagem de células nas duas matrizes, como citado anteriormente. O contrário é válido para 15 dias de armazenamento do leite em pó, que mesmo não diferindo significativamente, foi maior quando comparado aos outros períodos, podendo haver correlação com o aumento na contagem de células final.

Analisando as contagens obtidas ao longo de 15 dias de armazenamento a 37°C, é possível observar uma pequena redução nas contagens das matrizes do primeiro grupo, de 0,46 log UFC/g para o leite e 0,27 log UFC/g para fórmula infantil (Figura 1). Pode ser resultado do estresse osmótico que as cepas foram submetidas no período do estudo, também que o microrganismo sobrevive em baixa atividade de água pelo tempo estudado, representando preocupação, principalmente no público-alvo a que as matrizes se destinam, já que uma dose infecciosa muito baixa (0,36–66 UFC/100 g) poderia ocasionar surtos em neonatos (DODD, 2017).

Estudos comparativos relatam maior sobrevivência do microrganismo em fórmulas infantis quando comparado a caldo Tríplico de Soja desidratado, indicando que componentes da fórmula infantil possuem papel importante na tolerância à dissecação de *Cronobacter* (PHAIR *et al*, 2022). Dentre os mecanismos de tolerância identificados estão os genes de transporte de osmoprotetores, como glicina, betaína, prolina e trealose. Quando produzidos em conjunto com acúmulo de íons metálicos, auxiliam na manutenção da água ligada a membrana da bactéria (PHAIR *et al*, 2022).

No segundo grupo em estudo, observam-se maiores reduções nas contagens de células (3,13 log UFC/g para fubá e 2,38 log UFC/g para a farinha). Em ambos, a preocupação é menor devido ao processamento dos alimentos que os contém. Estes geralmente sofrem tratamento térmico como cocção ou forneamento, não sendo ingeridos crus. Reforça-se a necessidade de aquecimento adequado na reidratação de fórmulas infantis, recomenda-se atingir no mínimo 70°C durante o processo, para redução do risco de infecção após ingestão (PHAIR *et al*, 2022).

CONCLUSÕES:

Após inoculação a seco de *Cronobacter* em amostras de leite em pó integral, fórmula infantil em pó, farinha de trigo e fubá mimoso, foram avaliadas as contagens de células e atividade de água ao longo de 15 dias de armazenamento. Denota-se a formação de dois grupos, que não diferiram significativamente, tanto para contagem quanto para a atividade de água ($p < 0,05$). As reduções nas contagens foram menores no primeiro grupo, de 0,46 log UFC/g para o leite e 0,27 log UFC/g para fórmula infantil, quando comparadas ao segundo grupo, 3,13 log UFC/g para fubá e 2,38 log UFC/g para a farinha.

A redução da atividade de água de 7 a 15 dias de armazenamento da farinha e fubá pode ser indicativos das maiores reduções na contagem. Ressaltam-se estudos que explicitam maior sobrevivência do microrganismo em fórmulas infantis, indicando novamente relação entre matriz e sobrevivência de *Cronobacter* (PHAIR *et al*, 2022).

BIBLIOGRAFIA

BURGESS, C. M. et al. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 221, p. 37–53, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Food standards programme. Codex standard for infant formula: Codex Stan 72 1981. Geneva: WHO; 2008.

DODD, C. E. R. Infrequent Microbial Infections. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA Investigation of *Cronobacter* Infections: Powdered Infant Formula (February 2022). Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/fda-investigation-cronobacterinfections-powdered-infant-formula-february-2022>.

GAN, X. et al. Genomic Landscape and Phenotypic Assessment of *Cronobacter sakazakii* Isolated From Raw Material, Environment, and Production Facilities in Powdered Infant Formula Factories in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, n. July, p. 1–10, 2021.

HOLÝ, O.; FORSYTHE, S. *Cronobacter spp.* as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, v. 86, n. 3, p. 169–177, mar. 2014.

LIU, S. et al. Dry inoculation methods for nonfat milk powder. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 1, p. 77–86, 2019.

PATRICK, M. E. et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1520–1523, 2014.

STRYSKO, J. et al. Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961-2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 857–865, 2020.

XU, J. et al. Dry-inoculation methods for low-moisture foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 103, n. June, p. 68–77, 2020.

PHAIR, Katie et al. Insights into the mechanisms of *Cronobacter sakazakii* virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105643, 2022.