UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

AVALIAÇÃO DE PERIGOS MICROBIOLÓGICOS NO PREPARO DE FÓRMULAS INFANTIS EM LACTÁRIO HOSPITALAR

PAMELA ROSSI
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Campinas
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Rossi, Pamela
R735a Avaliação de perigos microbiológicos no preparo de fórmulas infantis em lactário hospitalar/ Pamela Rossi. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fórmula infantil. 2. Leite. 3. Higiene. 4. Perigos microbiológicos. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Título em ingles: Evaluation of microbiological hazards in the preparation of infant formulas in a hospital lactary
Palavras-chave em inglês (Keywords): Infant formula, Milk, Hygiene, Microbiological hazards
Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos
Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Maria Helena Castro Reis Passos
Valéria Christina Amstalden Junqueira
José Luiz Pereira
Data de defesa: 17/08/2007
Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

_____

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
(Membro)

_____

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)

_____

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

"A vida é uma peça de teatro
que não permite ensaios
Por isso cante, ria, dance, chore
e viva intensamente cada momento,
antes que a cortina se feche
e a peça termine sem aplausos"
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, que é minha fortaleza.

Aos meus pais, responsáveis pela minha vida e por tudo o que conquistei até hoje.

Aos meus irmãos amados, Danuza e Giuliano, por serem meus melhores amigos, aos meus cunhados Luciene e Juliano, por fazerem parte da minha vida e à minha avó Noemia, pela sabedoria que me passa a cada dia.

Ao Heber, meu grande amor, por caminhar junto comigo, sempre me incentivando, me ajudando e enchendo meus dias de alegria.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela orientação e confiança.

À Dra. Dirce Kabuki, pelo apoio, pela grande ajuda na realização deste trabalho e pela amizade, da qual espero desfrutar sempre.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Maria Helena, Dra. Valéria e Prof. Dr. José Luiz, pela atenção que sempre encontrei e por todas as correções e sugestões, que contribuíram para melhorar a qualidade deste trabalho.

Aos funcionários do Lactário do HC da UNICAMP, que permitiram a realização deste trabalho, em especial para Márcia, pela confiança e para meus amigos Sara, Welinton e Dilma pelo apoio, amizade e colaboração.

Às amigas do Laboratório de Higiene: Dirce, Isabela, Luciana, Vanessa, Maristela e Denir, por estarem sempre dispostas a ajudar, e pelo divertido convívio que tivemos.

A todos os amigos do departamento de Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Ciência de Alimentos, pela companhia e amizade.

Às amigas Mariana Kikuchi, Luciene Nishi e Isabela pela amizade terna e especial e pelo apoio que sempre encontrei.

À técnica do Laboratório de Microbiologia do DCA, Norma Miya, pela atenção e colaboração.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS viii

RESUMO x

ABSTRACT xi

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) 4
3.2 Infecção hospitalar 5
3.3 Sistema APPCC e seus pré-requisitos 7
3.4 Microbiologia do leite e produtos lácteos 9
3.5 Microrganismos indicadores em fórmula infantil em pó a base de leite 12
3.5.1 Bactérias do grupo Coliforme 12
3.5.2 Enterobactérias totais 13
3.5.3 Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos totais 15
3.6 Microrganismos patogênicos em fórmula infantil em pó a base de leite
3.6.1 *Bacillus cereus* 16
3.6.2 *Salmonella* sp 19
3.6.3 *Staphylococcus aureus* 20
3.7 Contaminação ambiental 21

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa 25
4.2 Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias 25
4.3 Elaboração e validação do fluxograma de preparo da fórmula láctea infantil (FLI) reconstituída 26
4.4 Amostragem 27
4.5 Avaliação microbiológica 29
4.5.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos totais 31
4.5.2 Contagem de enterobactérias totais 31
4.5.3 Contagem de coliformes 32
4.5.4 Análise de microrganismos patogênicos 32
4.5.5 Identificação de *Staphylococcus* 33
4.5.6 Identificação de enterobactérias 33

4.5.7 Avaliação microbiológica do ar 33
4.7 Avaliação da temperatura de refrigeração 34
4.8 Identificação de pontos críticos de controle 34

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias 35
5.2 Avaliação microbiológica
5.2.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais
5.2.1.1 Equipamento e utensílios 38
5.2.1.2 FLI em pó e reconstituída 40
5.2.2 Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos totais 43
5.2.3 Contagem de enterobactérias totais
5.2.3.1 Equipamento e utensílios 44
5.2.3.2 FLI em pó e reconstituída 45
5.2.4 Contagem de bactérias do grupo coliforme 47
5.2.5 Contagem de *Bacillus cereus* 51
5.2.6 Detecção e identificação de *Salmonella* 52
5.2.7 Detecção e identificação de Staphylococcus 53
5.2.8 Identificação de enterobactérias 56
5.2.9 Avaliação microbiológica do ar 58
5.3 Avaliação da temperatura de refrigeração da FLI reconstituída 59
5.4 Identificação de perigos e de pontos críticos de controle 62

6 CONCLUSÃO 65

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

APÊNDICE A - Fluxograma geral do preparo de fórmula láctea infantil reconstituída para lactentes 74

APÊNDICE B - Layout do lactário em estudo 76

APÊNDICE C - Análise dos perigos biológicos 77

APÊNDICE D – Formulário para a determinação dos pontos críticos de controle (PCC).... 78

APÊNDICE E - Resumo do plano APPCC para o preparo de fórmulas láctea infantis reconstituídas para lactentes 79

ANEXO A - Lista de verificação das boas práticas de manipulação em lactário..... 80

ANEXO B - Árvore decisória para a identificação de pontos críticos de controle..... 86

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1: Principais não conformidades e melhorias propostas 37

Tabela 1: Surtos de DTAs relacionados com fórmulas infantis em pó 11

Tabela 2: Limites microbiológicos para fórmulas infantis em pó ou reconstituída 30

Tabela 3: Resumo da avaliação das condições higiênico-sanitárias de lactário institucional 35

Tabela 4: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais no equipamento e nos utensílios utilizados no preparo da FLI reconstituída 39

Tabela 5: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais na FLI em pó e reconstituída 41

Tabela 6: Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos totais na FLI reconstituída 43

Tabela 7: Contagem de enterobactérias totais no equipamento e nos utensílios utilizados no preparo da FLI reconstituída 45

Tabela 8: Contagem de enterobactérias totais na FLI, obtida pelo método do NMP 46

Tabela 9: Contagem de enterobactérias totais na FLI, obtida pelo método de plaqueamento direto 45

Tabela 10: Contagem de coliformes totais na FLI em pó e reconstituída 48

Tabela 11: Condições higiênico-sanitárias das FLI em pó e reconstituída, com relação à presença de coliformes a 35ºC..... 49

Tabela 12: Identificação bioquímica de isolados de estafilococos coagulase negativa 54

Tabela 13: Identificação bioquímica de enterobactérias isoladas do equipamento e da FLI reconstituída 56

Figura 1: Evolução das contagens de microrganismos indicadores nas amostras da FLI em pó e reconstituída, obtidas pelo método do plaqueamento direto 50

Figura 2: Evolução das contagens de microrganismos indicadores nas amostras da FLI em pó e reconstituída, obtidas pelo método do Número Mais Provável 50

Figura 3: Variação da temperatura do líquido e da área interna do refrigerador durante o armazenamento da FLI reconstituída 60

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) colocam em risco o bem estar e a vida de muitas pessoas todos os dias, apresentando maior severidade em pessoas com estado de saúde mais debilitado, como crianças hospitalizadas. Para esta população alvo, uma das principais fontes de perigos é a alimentação preparada nos lactários dos hospitais. Assim é evidente a importância de um sistema preventivo de controle de qualidade que garanta a segurança dos alimentos fornecidos para esses pacientes. Este trabalho teve o objetivo de avaliar perigos microbiológicos existentes no preparo de fórmulas infantis em lactário de hospital público, a fim de adequar o estabelecimento aos pré-requisitos necessários para posterior implantação do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Esta avaliação foi feita através do diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do estabelecimento e do estudo do fluxograma de preparo da fórmula láctea infantil (FLI) reconstituída, onde foram estabelecidos dez pontos amostrais, nos quais foram realizadas análises microbiológicas do ar, de equipamento e utensílios e da FLI em pó e reconstituída. As amostras foram coletadas em seis lotes de preparação, compondo um total de 60 amostras às quais foram realizadas determinações de coliformes totais e fecais, estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, enterobactérias, e microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos totais. Os resultados das análises microbiológicas mostraram uma grande variação nas contagens dos microrganismos indicadores, porém nenhum dos microrganismos patogênicos analisados foi detectado pelos métodos utilizados. Todas as amostras da FLI em pó se mostraram adequadas para o consumo de acordo com a resolução legal vigente, porém as amostras das FLI reconstituída apresentaram contagens elevadas para a maioria dos microrganismos indicadores. A colher foi o único utensílio que se mostrou adequadamente higienizado em todas as determinações realizadas. As etapas de aquisição da matéria-prima; armazenamento sob refrigeração e aquecimento para distribuição, foram determinadas como pontos críticos de controle do processo. Com este estudo é possível concluir que a falta de pré-requisitos higiênico-sanitários durante o preparo da FLI reconstituída para lactentes, resulta em um produto microbiologicamente inadequado para crianças em estado de saúde debilitado e que a implantação do sistema APPCC só será possível se o estabelecimento se adequar a esses pré-requisitos.

Palavras chave: fórmula infantil, leite, lactário, higiene, perigos microbiológicos

SUMMARY

Every day foodborne diseases put a lot of people's lives at risk, this being more severe in people with weakened health conditions, such as hospitalized children. For this target population, one of the main sources of foodborne diseases is the food prepared in the hospital lactaries. Thus the importance of a quality control preventive system that guarantees the safety of foods destined for these patients is evident. This work aimed to evaluate microbiological hazards existent in the preparation of infant formula in the lactary of a public hospital, in order to adapt the establishment to the necessary prerequisites for the subsequent implantation of the Hazard Analysis and Critical Control Point system (HACCP). This evaluation was made by diagnosing the hygienic conditions of the establishment and by studying the preparation flowchart of the reconstituted infant dairy formula (IDF), for which ten sampling points were established so as to make microbiological analyses of the air, equipment and utensils, and powdered and reconstituted IDF. The samples were collected in six preparation batches, giving a total of 60 samples, which were analysed for total and faecal coliformes, coagulase negative staphylococci, *Bacillus cereus, Salmonella*, enterobacteriae, and the total aerobic mesophilic and psycrotrophic microrganisms. The results of the microbiological analyses showed considerable variation in the quantity of the indicative microorganisms, but no pathogens were found by the methods used. All of the powdered IDF samples were appropriate for consumption according to the norms in force, but the reconstituted IDF samples presented high quantities of all the indicative microorganisms, except for faecal coliformes. The spoon was the only utensil that was found to be appropriately clean. The stages: acquisition of the powdered formula; storage under refrigeration and heating for distribution, were identified as the critical control points of the process. From this study it was concluded that the lack of hygienic prerequisites during the preparation of the reconstituted IDF for infants resulted in a microbiologically inadequate product for children in a weakened health condition, and that implantation of the HACCP system would only be possible after the establishment had adjusted itself to attend these prerequisites.

Key words: infant formula, milk, lactary, hygiene, microbiological hazards

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) já são hoje consideradas pelas autoridades sanitárias como um problema de saúde pública, cuja prevenção é reconhecidamente mais vantajosa que a tentativa de cura, nem sempre bem sucedida.

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.

Apesar de se estimar uma alta incidência de DTAs, principalmente nas regiões mais quentes do país, que exigem uma melhor conservação dos alimentos, são poucos os casos notificados. A notificação é subestimada devido a fatores como a dificuldade do diagnóstico, as falhas no atendimento do sistema público de saúde e o período curto de duração de grande parte das DTAs, que não estimulam a vítima a procurar atendimento médico.

Uma porcentagem pequena, porém não menos importante, dessas DTAs é de origem hospitalar. Dos 198 surtos investigados pelo Serviço de Vigilância Sanitária de Alimentos no município de São Paulo nos anos de 1990 e 1991, 3% tiveram origem na alimentação servida em hospitais (GERMANO e GERMANO, 2003).

As doenças transmitidas por alimentos servidos nos hospitais são tratadas como infecção hospitalar, apresentando um grau de severidade mais elevado quando adquiridas por pacientes cujo estado de saúde já se apresenta debilitado, principalmente crianças menores de cinco anos.

Considerando a fragilidade de pacientes internados e menores de cinco anos frente às DTAs, e que as fórmulas infantis são coadjuvantes ou mesmo medida terapêutica básica para a recuperação da saúde dessas crianças, a implantação de um sistema preventivo de controle da qualidade em um lactário, como o sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), torna-se fundamental para garantir a segurança dos alimentos ali preparados.

Para que a implantação do sistema APPCC seja efetiva é necessário que o estabelecimento obedeça às regras básicas para o controle higiênico-sanitário da manipulação e do estabelecimento, definidas por um Manual de Boas Práticas e por Procedimentos Operacionais Padronizados (POP).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar perigos microbiológicos existentes no preparo de fórmulas infantis em lactário de hospital público e propor melhoria para a adequação do estabelecimento aos pré-requisitos necessários para a posterior implantação do sistema APPCC. Esse objetivo pode ser especificado em:

- Realizar um diagnóstico higiênico-sanitário do estabelecimento e das práticas de manipulação utilizadas durante o preparo da fórmula infantil em pó escolhida;

- Avaliar a qualidade microbiológica de todo o processo de obtenção da fórmula infantil reconstituída, desde a matéria prima até o produto final, através de análises microbiológicas de equipamentos, utensílios, ar ambiente e do alimento em diversas etapas do processo.

- Identificar os perigos microbiológicos e os pontos críticos de controle (PCCs) existentes no preparo da fórmula infantil e propor um plano APPCC para o preparo deste tipo de alimento;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

Uma DTA é qualquer dano ou agravo à saúde de um individuo devido à ingestão de um alimento, ou água, contaminados. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS, 2005) do Ministério da Saúde do Governo Federal, define-se DTA como um termo genérico, aplicado a uma síndrome, geralmente, constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarréia, sendo atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados.

O quadro clínico das DTAs depende do agente causador da doença (agente etiológico), da quantidade ingerida do alimento contaminado e do estado de saúde da vítima, podendo variar desde leve desconforto intestinal até quadros extremamente sérios, com desidratação grave, diarréia sanguinolenta, insuficiência renal aguda (síndrome hemolítica urêmica) e insuficiência respiratória (botulismo). Reações alérgicas, causadas por hipersensibilidade individual a certos alimentos, não é considerada como DTA (SVS, 2005). A manifestação clínica mais comum das DTAs é a diarréia, considerada uma importante causa no quadro de morbi-mortalidade do país devido sua elevada incidência. Porém a notificação dos casos é ainda pequena, pois os quadros de diarréia são considerados como “normais” por grande parte da população, inclusive alguns profissionais da saúde (SÃO PAULO, 2002).

As DTAs causadas por microrganismos podem ser divididas em três tipos de manifestações: infecção alimentar, quando a doença é causada pela ingestão do alimento com o agente etiológico vivo; intoxicação alimentar, quando a doença é causada pela ingestão de toxinas produzidas pelo microrganismo presente no alimento e toxinfecção alimentar, quando a doença é causada pela ingestão do alimento com uma quantidade de microrganismos capaz de produzir a toxina após serem ingeridos (SVS, 2005).

A maior parte das DTAs que ocorrem no Brasil ainda não são notificadas e a identificação do agente etiológico ocorre em poucos dos casos conhecidos, dificultando assim a real caracterização do quadro de DTA neste país. Essa sub-notificação também ocorre nos países desenvolvidos como a Inglaterra, onde para cada caso de infecção intestinal diagnosticado, existem mais 136 casos não notificados na comunidade (FORSYTHE, 2002).

As ações de vigilância, prevenção e controle das DTAs no Brasil são tomadas pela SVS do Ministério da Saúde. Com o objetivo de melhorar a notificação dos surtos de DTAs no país e diminuir sua incidência, a SVS desenvolveu em 1999 o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, a fim de orientar a notificação e a investigação de surtos de DTAs pelas Secretarias Municipais de Saúde. Desta data até 2004, o sistema permitiu a notificação junto ao Ministério da Saúde de 3.737 surtos, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Esses dados, porém ainda não permitem o conhecimento do verdadeiro impacto das DTAs no país, pois o sistema ainda não se encontra amplamente implantado e a sub-notificação ainda é grande (SVS, 2005).

Grande parte das DTAs apresenta quadros clínicos leves porém com prejuízos econômicos elevados para a sociedade, como custos hospitalares e diminuição de produtividade. Doenças graves vêm ocorrendo principalmente devido à alimentação oferecida em hospitais, provocando sérias complicações, seqüelas e óbitos (SÃO PAULO, 2002).

Os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, coletados de 1999 a 2004, mostram a ocorrência de 3.410.048 internações por DTA no Brasil, com uma média de 568.341 casos por ano, estando as maiores taxas de incidência nas regiões Norte e Nordeste do país. Essas internações representaram um custo total de 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano para o país (SVS, 2005).

3.2 Infecção hospitalar

Define-se infecção hospitalar como qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital, que se manifesta durante a internação ou após a alta e que pode ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares [AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2006a].

A infecção hospitalar é atribuída a diversas origens, podendo ocorrer como conseqüência da contaminação do ambiente hospitalar (instalações, equipamentos e utensílios), ou da ingestão de medicamentos e alimentos contaminados servidos pelo hospital [SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM COMERCIAL (SENAC,) 2004].

Esses alimentos, por sua vez, podem ser contaminados durante o preparo, transporte, armazenamento e administração. A contaminação pode também vir da matéria prima, o que mostra a necessidade não apenas do controle higiênico sanitário dentro dos locais de manipulação, mas também na aquisição das matérias primas.

A garantia da segurança do alimento servido nos hospitais e maternidades, seja ela nutricional, química ou microbiológica, deve ser alcançada devido à maior susceptibilidade dos comensais desse grupo às doenças de origem alimentar. A severidade de uma DTA é maior para um paciente internado do que para uma pessoa sadia.

Os pacientes considerados de maior risco são aqueles que apresentam debilidade no sistema imunológico (transplantados, portadores de HIV e doentes oncológicos), alteração ou ausência da microbiota de proteção (bebês e pacientes submetidos a antibioticoterapia), limitações imunológicas e metabólicas relacionadas à idade (recém nascidos e idosos) e condições fisiológicas delicadas (gestantes) (ANVISA, 2006a).

Quando estudamos DTAs em pacientes internados, devemos nos preocupar não apenas com os microrganismos patogênicos universais (mais comuns), mas também com os patogênicos oportunistas, favorecidos pela baixa competição nos alimentos processados e pela condição debilitada dos pacientes, que além de apresentarem diminuição da eficiência do sistema imunológico também apresentam uma menor quantidade de microrganismos naturais simbiontes. Dentre esses microrganismos oportunistas podemos citar como os mais freqüentes as bactérias do gênero *Pseudomonas, Escherichia* spp*, Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (SENAC, 2004).

As Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal têm aumentado a sobrevida 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, começou a ser mais freqüente 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 (ANVISA, 2006a).

As fórmulas infantis a base de leite são produtos, líquidos ou em pó, destinados à alimentação de crianças ou recém nascidos em substituição ao leite materno. No hospital, essas fórmulas são geralmente preparadas no lactário, que é uma unidade destinada ao preparo,

higienização e distribuição das mamadeiras de leites e seus substitutos para alimentação de recém-nascidos e dos pacientes da pediatria (MEZOMO, 1987).

Para a compreensão deste trabalho, o termo "criança" refere-se desde bebês com um mês de vida até crianças de cinco anos (grupo de pacientes que consome a fórmula infantil reconstituída)

O leite em pó e as fórmulas infantis em pó a base de leite vêm sendo relacionados com surtos envolvendo crianças e recém nascidos. Segundo Pessoa (1978) a maioria dos surtos relacionados com fórmulas infantis, investigados em São Paulo, foi causada por bactérias entéricas, principalmente *Salmonella* sp*. e E. coli*.

3.3 Sistema APPCC e seus pré-requisitos

A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é um sistema preventivo de controle de qualidade reconhecido mundialmente, utilizado na área de alimentos para o gerenciamento da segurança e da qualidade dos produtos alimentícios.

A aplicação do sistema APPCC na área de alimentos iniciou-se na década de 60 para o programa espacial Norte Americano. Foi desenvolvido pela "Pillsbury Company" em conjunto com a "National Aeronautics and Space Administration" (NASA) e os Laboratórios das Forças Armadas dos Estados Unidos, com o objetivo de garantir a segurança dos alimentos consumidos pelos astronautas, uma vez que os programas tradicionais de controle de qualidade não eram capazes de fornecer uma alimentação sempre segura. Em 1973 esse sistema foi adotado pela "Food and Drug Administration" (FDA) para a inspeção de alimentos enlatados de baixa acidez e desde então vem sendo aplicado em todos os segmentos da indústria de alimentos (ADAMS e MOSS, 2000).

Através da identificação e do controle dos perigos existentes durante a produção de um alimento, o sistema APPCC busca garantir a qualidade e a segurança deste alimento para seu consumidor final, estabelecendo medidas preventivas a fim de minimizar falhas. É um sistema contínuo, pois as falhas são identificadas antes ou no momento em que ocorrem, possibilitando que ações corretivas sejam imediatamente aplicadas (SILVA, 2002).

Por ser um sistema preventivo e focalizar a atenção nos fatores que afetam diretamente a segurança e a qualidade física, química e microbiológica dos alimentos, a aplicação do sistema APPCC diminui os gastos com análises laboratoriais constantes do produto acabado (SENAC, 2004). Os programas de controle de qualidade que se baseiam somente na análise do produto final não são seguros para os alimentos preparados em locais como o lactário, pois os resultados de tais análises só são obtidos depois do consumo do alimento, colocando em risco a vida dos pacientes já debilitados (BRUM, 2004).

O sistema APPCC pode ser aplicado em toda a cadeia produtiva de qualquer alimento e utiliza como pré-requisitos para sua implementação as Boas Práticas de Manipulação (BPM) e os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) (FORSYTHE, 2002), ambos já exigidos à nível federal para serviços de alimentação pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216, de 15 de setembro de 2004 (BRASIL, 2004).

Este sistema é recomendado por organismos internacionais como a Organização Mundial do Comércio (OMC), a Organização Mundial da Saúde (OMS), a "Food and Agriculture Organization" (FAO) e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) e é exigido pela Comunidade Européia e pelos Estados Unidos da América. No Brasil, o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) já têm ações com o objetivo de adoção do sistema APPCC pelas indústrias alimentícias (ANVISA, 2006b), tais como a Portaria nº1428/93 do Ministério da Saúde, que estabelece regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos (BRASIL, 1993), e a Portaria nº46/98 do MAPA, que institui o sistema APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 1998).

A implementação do sistema APPCC em um processo de produção/obtenção de um alimento é fundamentada em sete princípios, descritos abaixo segundo o "Codex Alimentarius Commission" (FORSYTHE, 2002).

1 – Identificar os perigos potenciais existentes em toda a cadeia produtiva do alimento, avaliar os riscos associados e determinar as medidas preventivas para controlar os perigos;

2 - Identificar os pontos críticos de controle (PCCs) do processo para controlar os perigos identificados;

3 – Definir os limites críticos para as medidas preventivas de cada PCC;

4 – Estabelecer os procedimentos de monitoramento dos PCCs;

5 - Determinar as ações corretivas a serem aplicadas quando o monitoramento mostrar um desvio nos limites críticos de um PCC;

6 - Estabelecer os procedimentos de verificação para certificar que o sistema APPCC está sendo efetivo;

7 – Estabelecer o procedimento de registro de toda documentação gerada.

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2002), perigos são definidos como agentes de natureza biológica, física ou química, ou condição do alimento, com o potencial de causar um efeito de saúde adverso, ou agredir a integridade física do consumidor.

O local ou situação onde estão presentes um ou mais perigos que oferecem risco a saúde são chamados de Pontos Críticos, que passam a se chamar Pontos Críticos de Controle quando podem ser controlados, a fim de eliminar, reduzir ou prevenir os perigos a níveis aceitáveis, e que possam ser monitorados constantemente (SILVA, 2002).

Os PCCs podem ser determinados utilizando-se uma ferramenta chamada de árvore decisória e são essenciais para eliminação ou redução aceitável dos perigos previamente identificados (FORSYTHE, 2002).

3.4 Microbiologia do leite e produtos lácteos

Atualmente estão disponíveis no mercado diversos tipos de fórmula infantil em pó a base de leite, que foram elaboradas a partir de leite de vaca e outros mamíferos, a fim de substituir o leite humano. Como as fórmulas infantis são, geralmente, a única fonte de nutrientes para crianças internadas em um hospital, é de extrema importância que essas fórmulas sejam adequadas às necessidades nutricionais da criança e que sejam seguras 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 (SANTOS, 2006).

Como o ingrediente base utilizado na formulação da fórmula infantil em pó é, na maioria dos casos, o leite bovino, cabe aqui expor uma revisão bibliográfica sobre os principais microrganismos que são encontrados no leite bovino e em alguns de seus derivados.

Por ser um alimento rico em carboidratos, proteínas e lipídeos, apresentar um pH próximo da neutralidade e uma elevada atividade de água, o leite bovino fluído é um ótimo meio para o desenvolvimento dos mais variados microrganismos, o que o caracteriza como um alimento muito perecível. Os microrganismos mais frequentemente encontrados no leite cru são: coliformes e outras bactérias Gram negativas, que podem estar relacionadas com práticas de produção e processamento não higiênicos; bactérias psicrotróficas; bactérias termodúricas, que podem sobreviver ao processo de pasteurização; bactérias formadoras de esporos; patógenos que causam mastite e diversos fungos e leveduras (HAYES e BOOR, 2001).

O leite em pó e outros produtos lácteos em pó são menos perecíveis que o leite fluido, apresentando uma vida de prateleira mais longa devido à baixa atividade de água. Porém, microrganismos patogênicos que sobreviverem ao processo de secagem, podem estar presentes no leite em pó e vir a se multiplicar no produto reconstituído, ameaçando a saúde das pessoas que irão consumir esse alimento (CLARK, 2001).

A microbiota do leite em pó é determinada pela combinação de tempo e temperatura aplicada no processo de pré-aquecimento e na secagem, pelas condições higiênico-sanitárias do processo, pela atividade de água do produto final, pelo tipo de microrganismo presente e pela qualidade do leite cru ["International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF), 2000].

Segundo a "American Public Health Association" (APHA, 1992), a microbiota típica de leite em pó é composta por micrococos termodúricos, estreptococos termófilos e aeróbicos formadores de esporos, como o *Bacillus cereus.* A presença de bactéria do grupo dos coliformes e bactérias psicrotróficas neste tipo de produtos pode indicar contaminação pós-processamento, transmitida pelo ar, por equipamentos ou utensílios ou pelo manipulador (APHA, 1992).

A ICMSF (2000) cita os seguintes microrganismos como sendo os mais envolvidos em doenças veiculadas por leite em pó: *Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* e *Enterobacter sakazakii*.

O leite em pó é considerado um produto de risco para a saúde pública, pois na maioria das vezes ele é consumido após a reconstituição e sem nenhum aquecimento adicional. Diversos surtos de DTA causados por *Salmonella* e toxinas de *Staphylococcus* foram veiculados por leite

em pó, tendo como destaque um surto ocorrido no Japão, em 2000, que envolveu 10.000 pessoas devido à ingestão de leite em pó contaminado com toxina estafilocócica (IKEDA, 2005). A falta de controle da temperatura durante o armazenamento do leite cru ou durante o processo de secagem, pode permitir a multiplicação de *Staphylococcus aureus* e a produção de toxinas, as quais resistem ao processo subseqüente de secagem (APHA, 1992).

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 frequentemente administrado às crianças internadas. Na **Tabela 1** estão apresentados alguns surtos de DTA cujas fontes de contaminação detectadas foram as 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	-	-	*Bacillus cereus*	hospital	BASTON, 1997
Islândia	1989	3	1	*Enterobacter sakazakii*	hospital	BIERLING et al., 1989
-	1989	4	-	*Enterobacter sakazakii*	-	SIMMONS et al., 1989
Canadá	1992	-	-	*Salmonella*	-	ICMSF, 2000
Alemanha	1994	-	-	*Citrobacter freundii*	hospital	THURM e GERICKE, 1994

DTA = Doenças Transmitidas por Alimentos

Os principais problemas microbiológicos relacionados com leite em pó e produtos derivados, como as fórmulas infantis em pó, ocorrem devido a contaminação acidental durante ou após a reconstituição do produto (ICMSF, 2000). A qualidade higiênico-sanitária das condições de processamento pode ser monitorada pela análise do produto pronto utilizando indicadores como a contagem de coliformes (APHA, 1992).

A Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA (BRASIL, 2001), estabelece como padrão para as fórmulas infantis, limites quantitativos para *Bacillus cereus* e coliformes a 35ºC e ausência de coliformes a 45ºC, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella sp.*

Em uma reunião realizada pela FAO e pela OMS, em 2004, Genebra, os especialistas concluíram que a contaminação de fórmula infantil em pó com *Enterobacter sakazakii* e *Samonella* tem sido a causa de adoecimento de crianças e recém nascidos, incluindo doenças graves, que causaram seqüelas e até a morte. Nesta reunião também ficou enfatizado que as

fórmulas infantis em pó, produzidas de acordo com os padrões atuais, não são produtos comercialmente estéreis e podem conter microrganismos patogênicos (FAO/OMS, 2004).

3.5 Microrganismos indicadores em fórmula infantil em pó a base de leite

Devido às dificuldades e ao elevado custo que envolve a detecção de microrganismos patogênicos, os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos.

Os microrganismos indicadores são espécies ou grupos de microrganismos que quando presentes em um alimento podem fornecer informações sobre a deterioração potencial do alimento ou sobre a possível ocorrência de microrganismos patogênicos, podendo também indicar condições higiênico-sanitárias indesejáveis durante o preparo, armazenamento e distribuição do alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Os grupos de microrganismos que são mais utilizados como indicadores são: coliformes totais e fecais, *Escherichia coli*, Enterobactérias e Estreptococos fecais (FORSYTHE, 2002).

3.5.1 Bactérias do grupo Coliforme

O grupo dos coliformes é composto por bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não esporulados, pertencentes à família Enterobacteriaceae e capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás (APHA, 2001). Esse grupo se divide em coliformes totais e coliformes fecais, abordado pela ANVISA, na RDC nº12/2001, como coliformes a 35ºC e coliformes a 45ºC, respectivamente (BRASIL, 2001).

Por definição, baseada em reações bioquímicas, o grupo dos coliformes totais são aqueles capazes de fermentar a lactose quando incubados a 35ºC durante 48h (APHA, 2001). Este grupo é formado por mais de 20 espécies, incluindo tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal do homem e de animais homeotérmicos, quanto bactérias não entéricas como as dos gêneros *Serratia* e *Aeromonas* (SILVA et al,, 1997). Assim, a presença de coliformes totais em uma amostra não indica necessariamente presença de microrganismos patogênicos.

O grupo dos coliformes fecais, também chamado de termotolerantes, é formado pelos coliformes totais que são capazes de continuar fermentando a lactose quando incubados a 44,5-

45,5ºC durante 24h. Os principais gêneros que compõem o grupo são *Escherichia, Enterobacter e Klebsiella*, sendo a *Escherichia coli* a principal representante do grupo e a única que apresenta como habitat natural o intestino do homem e outros animais homeotérmicos, portanto a única relacionada diretamente com contaminação de origem fecal (SILVA et al,, 1997).

A contagem de Enterobactérias, coliformes e *E. coli* permite avaliar a qualidade global de um alimento ou as condições higiênico-sanitárias presentes durante o processamento do alimento. A presença de microrganismos destes grupos em produtos pasteurizados, como o leite em pó, pode indicar ineficiência do processo de pasteurização ou ocorrência de contaminação pós-processamento (APHA, 2001).

3.5.2 Enterobactérias totais

As enterobactérias são bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae e que apresentam muitas propriedades em comum. Embora possam ser encontradas em uma diversidade de lugares, a maioria habita o intestino do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção. Os principais gêneros desse grupo são *Escherichia, Shigella, Salmonella, e Enterobacter* (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A presença de qualquer membro da família Enterobacteriaceae é indesejável em leite pasteurizado. O método para a contagem de enterobactérias totais apresenta uma maior sensibilidade à detecção de contaminação pós-processamento do que o teste de contagem de coliformes, além de ser mais rápido e englobar microrganismos patogênicos não fermentadores de lactose (MARSHALL, 1992).

Franco e Landgraf (2003) também apresentam algumas vantagens na utilização da contagem de enterobactérias totais em substituição a análise de coliformes, como:

- Pouca definição taxonômica das bactérias do grupo coliformes;
- Menor risco em obter resultados falso-negativos quando microrganismos patogênicos não fermentadores de lactose ou os de fermentação lenta estiverem presentes;

- Cepas de *Salmonella* podem ser mais resistentes aos tratamentos aplicados nos alimentos do que a *E. coli* e outros coliformes fecais.

A presença de um número considerável de enterobactérias em produtos processados pode indicar processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, ou armazenamento sob condições que favoreçam o crescimento dos microrganismos remanescentes (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

O regulamento nº 2073/2005 da Comunidade Européia, que dispõe sobre critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios, relata *Salmonella* e *E. sakazakii* como os microrganismos mais preocupantes em fórmulas para lactentes, nas fórmulas destinadas a fins medicinais específicos e nas fórmulas de transição. A presença destes agentes patogênicos constitui um risco considerável se as condições após a reconstituição das fórmulas permitirem a sua multiplicação. A análise da presença de membros da família Enterobacteriaceae, que inclui os agentes patogênicos citados, pode ser utilizada como um indicador do risco de ocorrência de microrganismos patogênicos e como controle de rotina (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2005).

Diversos surtos de infecção hospitalar envolvendo bebês recém nascidos têm evidenciado a bactéria *Enterobacter sakazakii* como o agente etiológico e a maioria deles relacionou as fórmulas infantis em pó e o leite em pó como as fontes de contaminação (ACKER et al., 2001; CLARK et al., 1990; LEHNER e STEPHAN, 2004).

E. sakazakii é um bacilo Gram negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, mesófilo, anaeróbio facultativo não esporulado e com flagelos que lhe confere motilidade. Pouco se sabe sobre seu habitat natural, mas não é restrito ao trato gastrintestinal como a *E. coli* (NAZAROWEC-WHITE e FARBER, 1997a).

Considerado como um patógeno oportunista, a bactéria *E. sakazakii* tem sido relacionado com surtos de meningites e enterocolites que acometem principalmente recém nascidos e crianças. Sua ocorrência é rara, porém muito severa apresentando taxas de mortalidade de 20 a 50%. Além disso, grande parte dos sobreviventes apresenta seqüelas neurais (LEHNER e STEPHAN, 2004).

Essa bactéria é preocupante em leite em pó e fórmulas infantis em pó a base de leite, por apresentar a capacidade de produzir uma cápsula de heteropolissacarídeo que lhe confere uma maior resistência ao processo de secagem do leite, podendo permanecer no produto desidratado durante sua vida de prateleira. Essa característica também pode permitir a adesão desse microrganismo nas superfícies de utensílios e equipamentos pela produção de um biofilme mais resistente aos agentes de limpeza (IVERSEN e FORSYTHE, 2003).

3.5.3 Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos totais

O grupo dos microrganismos aeróbios mesófilos totais engloba os microrganismos aeróbios cuja faixa de temperatura ótima de crescimento é de 30-40ºC. A contagem destes microrganismos pode ser utilizada como um indicador da qualidade higiênico-sanitária de um alimento, da aplicação de boas práticas de manipulação e das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios. Altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos totais podem indicar falhas higiênico-sanitárias durante a manipulação, ineficiência dos processos de higienização, ou uso de ingredientes contaminados, exceto para alguns tipos de alimentos, como os fermentados, que apresentam uma elevada contagem deste grupo de microrganismos devido ao processo de fermentação (APHA, 2001).

Para alimentos não fermentados e que sofreram tratamento térmico, como as fórmulas infantis em pó a base de leite, a análise desse grupo tem grande relevância quando nenhum resultado é encontrado para análises mais específicas de microrganismos patogênicos, pois mesmo que não tenham sido encontrados microrganismos patogênicos em uma amostra, uma contagem elevada de microrganismos aeróbios mesófilos indica que o alimento pode ser inadequado para o consumo (APHA, 2001).

Em um alimento não perecível como a fórmula infantil em pó, a contagem elevada desse grupo de microrganismos indica o uso de matéria prima contaminada ou um processamento inadequado do ponto de vista higiênico-sanitário. Em alimentos perecíveis, como a fórmula infantil reconstituída, indica contaminação durante o preparo ou condições de tempo e temperatura de armazenamento inadequadas (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A contagem de aeróbios psicrotróficos é utilizada para avaliar o grau de deterioração de alimentos refrigerados. O grupo dos aeróbios psicrotróficos corresponde às bactérias mesófilas

capazes de crescerem à 7ºC ou menos, sendo que algumas são capazes de crescer a temperaturas negativas. As bactérias psicrotróficas mais comumente isoladas de leite e seus derivados pertencem aos gêneros: *Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter, Enterobacter, Klebsiella, Arthrobacter, Bacillus, Lactobacillus, Micrococcus* e *Streptococcus*, sendo que o gênero *Pseudomonas* é o maior determinante da qualidade de produtos derivados de leite. Algumas bactérias patogênicas isoladas de leite e seus derivados também são psicrotróficas, como a *Listeria monocytogenes* (MARSHALL, 1992) e o *Bacillus cereus* (SCHOENI e WONG, 2005).

Os microrganismos psicrotróficos não pertencem à microbiota natural do leite, sendo sua presença relacionada com contaminação durante o processamento. A maioria das bactérias psicrotróficas é sensível à pasteurização, logo a presença desses microrganismos em produtos que sofreram tratamento térmico indica um tratamento ineficiente ou uma recontaminação pós-tratamento térmico (MARSHALL, 1992).

É importante salientar que uma baixa contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos não garantem a segurança de um alimento, uma vez que a presença de microrganismos destes grupos não está diretamente relacionada com a presença de microrganismos patogênicos (APHA, 2001).

3.6 Microrganismos patogênicos em fórmula infantil em pó a base de leite

3.6.1 ***Bacillus cereus***

A bactéria *B. cereus* é um bastonete Gram positivo, aeróbio facultativo, móvel através de flagelos peritríquios, produtor de exo-enterotoxinas e formador de esporo que lhe confere resistência ao calor, ao processo de desidratação e aos agentes químicos como os desinfetantes. Esse microrganismo pode se multiplicar numa faixa de pH entre 4,3-9,3. A maioria das cepas é mesófila, com uma temperatura ótima de crescimento entre 25-37ºC, porém algumas cepas apresentam características psicrotróficas, podendo se desenvolver em alimentos refrigerados em temperaturas ao redor de 4ºC (SCHOENI e WONG, 2005).

Amplamente distribuída na natureza, essa bactéria esta relacionada a surtos de DTAs como causadoras de dois tipos de enfermidades, provocadas por diferentes toxinas: síndrome diarréica e síndrome emética.

A síndrome diarréica é causada por proteínas de elevado peso molecular, sensíveis a pH inferior a 4,0 e termosensíveis, podendo ser inativadas se submetidas a 55ºC durante 20 minutos. É causada pela ingestão de grande número de células ou da toxina já produzida no alimento durante a fase exponencial de crescimento do *B. cereus*. O período de incubação da doença varia de 8 a 16 horas após a ingestão do alimento contaminado e os principais sintomas são: diarréia intensa, dores abdominais e tenesmos retais. Os alimentos mais relacionados com essa síndrome são vegetais crus e cozidos, produtos cárneos, pescado, massas, leite, sorvetes, pudins a base de amido, entre outros (FRANCO e LANDGRAF, 2003; GRANUM, 1994).

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas a fim de isolar e caracterizar estas enterotoxinas diarréicas, atualmente são conhecidas apenas quatro delas*:* a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não-hemolítica (NHE), a enterotoxina K (CytK) e enterotoxina T (BceT). As três primeiras já foram identificadas em surtos alimentares (SCHOENI e WONG, 2005).

A síndrome emética é causada por um peptídeo de baixo peso molecular, estável numa faixa maior de pH (2-11) e termoestável, suportando uma temperatura de 126ºC durante 90 minutos (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Os sintomas mais comuns são náuseas e vômitos, com um período de incubação variando de 0,5 a 5 horas depois da ingestão da toxina emética pré-formada no alimento. Esta síndrome está mais associada com alimentos amiláceos, principalmente arroz (GRANUM, 1994).

A contaminação de um alimento por *B. cereus* é de difícil controle, principalmente na indústria de derivados de leite, onde este microrganismo pode estar presente no ambiente, ameaçando a segurança dos alimentos ali preparados. Os principais fatores que dificultam a eliminação de *B. cereus* nas indústrias de produtos lácteos são: a dificuldade em se obter leite cru isento de *B. cereus*, uma vez que esta bactéria está bastante disseminada na natureza; a resistência dos seus esporos ao processo de pasteurização; a capacidade dos esporos de se aderirem fortemente nas superfícies de utensílios e equipamentos, devido principalmente a sua

característica hidrofóbica; e a resistência destes esporos a condições ambientais de estresse (ANDERSSON et al., 1995).

Estudando a presença de *B. cereus* em bancadas de processamento de alimentos de um restaurante institucional, Mendes et al. (2004) detectaram a presença deste microrganismo em 27% das amostras analisadas.

Devido à capacidade de adesão nas superfícies e posterior formação de biofilme, a contagem de esporos de *B. cereus* pode ser utilizada como um indicador biológico para a eficiência de um processo de higienização (Penna, citado por Baston, 1997).

A presença de esporos de *B. cereus* no ambiente de manipulação de um lactário é crítica, pois uma vez inserido na fórmula infantil reconstituída o esporo pode ser ativado com o aquecimento realizado antes do consumo das mamadeiras, e as células vegetativas podem atingir elevadas contagens se o alimento não for consumido logo após a reconstituição. Segundo Rangasamy et al. (1993), a presença de *B. cereus* em leite em pó, mesmo em pequena quantidade, representa um risco de toxinfecção alimentar, pois condições inadequadas de armazenamento, como altas temperaturas, pode proporcionar a multiplicação do microrganismo.

O leite cru pode ser contaminado por diversas fontes de esporos de *B. cereus* incluindo o solo, esterco, feno e equipamentos de ordenha, podendo continuar presente nos produtos derivados como leite em pó e fórmulas infantis quando o tratamento térmico não for suficiente para destruir os esporos (BASTON, 1997).

Procurando verificar a presença de *B. cereus* em amostras de leite pó, Costa et al. (2004) encontraram 17,3 % das amostras analisadas, contaminadas com este microrganismo, sendo que 4% do total de amostras apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela RDCº1/2001 para este tipo de alimento. Rangasamy et al. (1993), também analisaram amostras de leite em pó e verificaram que 6 das 24 amostras analisadas estavam contaminadas com *B. cereus*.

A notificação de casos de doenças causadas por *B. cereus* no Brasil é subestimada devido a fatores como: a rápida evolução para a cura (12 a 24h), o que leva os pacientes a não procurarem tratamento médico; os sintomas da doença que se assemelham ao de outras

toxinfecções; a dificuldade existente na identificação desse microrganismo devido a sua intensa atividade metabólica (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Nos últimos anos a bactéria *B. cereus* vem sendo reconhecido como um patógeno oportunista em pacientes hospitalizados debilitados, como os imunocomprometidos e os recém nascidos (GAUR e SHENEP, 2001).

Baston (1997) relata um surto diarréico ocorrido com recém nascidos em um hospital do Chile, em 1984, no qual o leite em pó foi apontado como a fonte de contaminação, com uma quantidade de *B. cereus* variando de 50 a 200 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de leite em pó, contagem essa que pode ter aumentado muito no leite reconstituído se este permaneceu à temperatura ambiente.

A patogenicidade do *B. cereus* ainda não está bem definida. A maioria das cepas é capaz de produzir metabólitos relacionados com mecanismos de virulência como hemolisinas, fosfolipases e proteases (SCHOENI e WONG, 2005). Várias técnicas baseadas em biologia molecular, como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), vêm sendo desenvolvidas a fim de verificar o potencial toxigênico de cepas de *B. cereus* (GHELARDI et al., 2002).

3.6.2 *Salmonella sp*

Os microrganismos do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São capazes de produzir ácido e algumas vezes gás através da glicose e a maioria tem como principal reservatório o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos (ICMSF, 1998).

São agentes causadores de três tipos de enfermidades: febre tifóide, causada pela *Salmonella* Typhi; febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi e enterocolites (salmoneloses), causadas pelos outros sorotipos (FRANCO e LANDGRAF, 2003). A quantidade de células necessárias para causar uma dessas infecções depende de alguns fatores, como o sorotipo da *Salmonella*, a susceptibilidade do individuo e o tipo de alimento envolvido. Em alimentos com alto teor lipídico, uma quantidade de 100 células por grama do alimento já pode causar uma infecção, pois as células da bactéria ficam envolvidas pelos glóbulos de gordura sendo menos atacadas pelas enzimas gástricas e pelo baixo pH do estômago (ICMSF, 1998).

A bactéria *Salmonella* é atualmente o microrganismo mais frequentemente envolvido em casos e surtos de infecção alimentar. No Brasil, o sorotipo mais encontrado nos alimentos é *Salmonella* Typhimurium.

Os alimentos mais relacionados com surtos de salmonelose são aqueles de alto valor protéico, incluindo o leite e seus derivados, e aqueles que não sofrem nenhum tratamento térmico, como as hortaliças (GERMANO e GERMANO, 2003).

3.6.3 ***Staphylococcus aureus***

As espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbio facultativos, não esporulados, cujo habitat natural são as mucosas e a pele do homem e de animais homeotérmicos, podendo contaminar um alimento em diversas etapas do seu processamento, principalmente através do manipulador. A espécie mais estudada é *Staphylococcus aureus*, responsável por grande parte das intoxicações causadas pela ingestão de alimentos contaminados. A importância de outras espécies como agente patogênico vem aumentando com as infecções oportunistas, principalmente nos imunocomprometidos (GERMANO e GERMANO, 2003).

Grande parte da população é portadora de *S. aureus*, sendo mais freqüente dentro dos hospitais. Williams (1963) encontrou uma proporção de adultos normais, portadores de *S. aureus* e não associados com hospitais de 30 – 50%. Essa proporção aumentou para 60 – 80% quando estudada em pessoal hospitalar, incluindo pacientes e funcionários.

Esses microrganismos podem estar presentes em qualquer tipo de alimento, principalmente em alimentos mais manipulados. A manifestação da intoxicação dá-se pela ingestão da enterotoxina estafilocócica (EE) pré-formada no alimento, com um período de incubação curto, podendo variar de 1 à 7 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os principais sintomas são: náuseas, vômitos intensos, dores abdominais e diarréia (ICMSF, 1998).

As EEs são moléculas protéicas termoestáveis, resistentes à cocção e a enzimas proteolíticas. Segundo Balaban e Rasooly (2000), a toxina pode ser produzida na faixa de temperatura entre 10 - 46ºC, quando a contagem de células está acima de 10^5 UFC/g de alimento,

e uma dose de toxina menor que 1,0 µg/kg de massa corpórea é suficiente para provocar os sintomas da intoxicação.

As EEs são identificadas por reações com anticorpos específicos e denominadas por letras maiúsculas. Atualmente são conhecidas 18 EEs: A, B, C (subdividida em C_1, C_2 e C_3), D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R e U. As EEs mais frequentemente relacionadas com surtos de intoxicação alimentar são a EEA e a EED (JAY, 2005).

A dificuldade em se analisar a capacidade das espécies de *Staphylococcus* em produzir EE levam os pesquisadores a procurarem propriedades que possam ser relacionadas com produção da enterotoxina. A principal propriedade relacionada com a capacidade de produzir EE é a presença de coagulase, porém a produção de enterotoxina por espécies coagulase negativa vem sendo relatada por diversos autores (VALLE et al., 1990). Das 342 espécies de *Staphylococcus* isoladas de carneiros sadios por Valle et al. (1990), 272 eram coagulase negativa, e destas, 60 apresentaram a capacidade de produzir EE.

Apesar das EEs serem produzidas principalmente pelas espécies de estafilococos coagulase positiva, como *S. aureus*, algumas espécies coagulase negativa, envolvidas em diversas infecções do homem e de animais, também têm mostrado a capacidade de produzir enterotoxinas. Embora essas espécies raramente estejam relacionadas com doenças de origem alimentar, podem facilmente contaminar um alimento, pois o homem é um carreador desses microorganismos, que podem produzir EE se o alimento permanecer em condições ideais para tal (CUNHA et al., 2006a).

Segundo Franco e Landgraf (2003), a quantificação de membros do grupo estafilococos coagulase positiva pode ser utilizada como um indicador de higiene na manipulação e de eficiência dos processos de higienização, visto que estão presentes em grande quantidade na pele e nas mucosas do homem e se dispersam pelo ar.

Apesar da RDC nº 12/2001 estabelecer padrão microbiológico para os produtos derivados de leite em relação à contagem apenas dos estafilococos coagulase positiva, considerando que a característica fenotípica de produzir coagulase está relacionada com a capacidade de produzir toxina, estudos como os de Cunha et. al. (2006a) e Valle et al. (1990) mostram, porém, que essa

característica não é dependente da produção de toxina e que um alimento pode estar contaminado com espécies coagulase negativas capazes de produzir a EE.

3.7 Contaminação ambiental

A avaliação microbiológica do ambiente onde é preparado o alimento é importante para verificar a efetividade da freqüência e dos processos de higienização utilizados, determinar a presença de patógenos no ambiente e avaliar a qualidade microbiológica do ar que entra no ambiente de manipulação e incide diretamente no alimento ou nas superfícies que entrarão em contato com ele. A higienização de equipamentos e utensílios é considerada um item importante no controle da contaminação pós-processamento devendo, portanto, ter os seus procedimentos operacionais bem definidos e padronizados (APHA, 1992).

A sobrevivência de microrganismos no ambiente de processamento de alimento coloca em risco a qualidade e a segurança do produto final ali obtido. Algumas plantas de processamento apresentam características que propiciam o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, como: design inadequado que dificulta a higienização, falhas na construção que possibilitem acumulo de água, aquecimento do ambiente por falta de eficiente circulação de ar provocando aumento também da umidade, entre outros (APHA, 2001). A fim de evitar esses problemas no ambiente de um lactário, a estrutura física do mesmo deve obedecer aos requisitos estabelecidos pelo Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº50/2002, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (BRASIL, 2002).

O ar ambiente contém gases, gotículas de água, partículas microscópicas de poeira, sujidades e microrganismos, que não podem se multiplicar por falta de nutrientes, mas que podem ser disseminado por longas distâncias (AL-DAGAL e FUNG, 1990). Os microrganismos estão presentes no ar na forma de aerossóis, composto por células individuais ou por grupos de células que se aderem às partículas de sujeira. Geralmente, bactérias na forma vegetativa estão presentes em menor quantidade no ar do que esporos bacterianos e fúngicos. Porém, com o aumento da umidade do ar a resistência das formas vegetativas aumenta, aumentando o risco de contaminação do alimento. Em ambientes que apresentam como principal fonte de contaminação o homem, há predominância no ar de formas vegetativas de *Staphylococcus, Streptococcus,*

Micrococcus e outros microrganismos associados com a pele, cabelo e trato respiratório humano (APHA, 1992).

Os microrganismos presentes no ar ambiente de um serviço de alimentação podem ser oriundos dos manipuladores, da matéria-prima, de poeira e outras sujidades, do ar condicionado quando não há manutenção freqüente do sistema de filtros, e de outros elementos que tenham acesso à área de manipulação (AL-DAGAL e FUNG, 1990). Assim, para evitar que a contaminação do ar entre em contato com o alimento, deve ser mantida uma pressão positiva no interior de equipamentos e áreas de envase, através de sistemas de circulação de ar (CHAMBERS e NELSON, 1993).

O homem é o principal veículo de transmissão de microrganismos para o ambiente de trabalho. Essa transmissão se dá principalmente através da pele, da boca e do nariz. Em algumas plantas de processamento de produtos lácteos, os mesmos microrganismos encontrados na pele dos manipuladores também foram encontrados no ar do ambiente de processamento. O comportamento dos manipuladores de alimentos influencia diretamente a contaminação ambiental. O ato de falar e/ou espirrar propaga no ambiente gotículas que podem conter vírus e bactérias, chamadas de bioaerosois. As gotículas muito pequenas podem permanecer no ar por um longo tempo e percorrer longas distâncias. Um único espirro pode transmitir cerca de 10^6 partículas de diversos tamanhos e tipos para o ar ambiente (AL-DAGAL E FUNG, 1990). Esta evidência reforça a importância do treinamento contínuo dos manipuladores de alimentos para que os hábitos adequados durante a manipulação se tornem uma atividade simples e mecânica.

A presença de animais como pássaros e roedores na área de processamento, pode contribuir direta e indiretamente para a contaminação do ambiente. Indiretamente criando uma turbulência no ar quando se movimentam e diretamente através de suas fezes, pêlos e outros materiais corpóreos. Os insetos também são grandes responsáveis pela transmissão de microrganismos através do ar, podendo contaminar as superfícies que entram em contato com alimentos ou diretamente o próprio alimento, pela presença de microrganismos nas patas, urina e fezes (AL-DAGAL e FUNG, 1990). Esses fatos mostram a importância da aplicação de um programa preventivo de controle de pragas dentro de um estabelecimento produtor/manipulador de alimentos.

A quantificação de microrganismos viáveis em um ambiente pode ser realizada através de diferentes métodos como sedimentação, impactação, filtração, centrifugação e precipitação eletrostática. Os mais frequentemente utilizados sãos os métodos de impactação e de sedimentação (APHA, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

A pesquisa foi realizada no lactário de um hospital público da cidade de Campinas, interior de São Paulo, onde são preparados fórmulas infantis e sucos de frutas para bebês e crianças da enfermaria e pacientes da pediatria, incluindo os da UTI pediátrica.

O estabelecimento atende diariamente cerca de 30 crianças de 0 a 15 anos, que podem utilizar o serviço por apenas um dia ou permanecer no hospital por tempo indeterminado. Cada paciente tem sua alimentação determinada individualmente, de acordo com suas necessidades nutricionais. A forma de administração do alimento para esses pacientes ocorre através de mamadeira ou de sonda, dependendo das suas condições físicas e fisiológicas.

Os cardápios diários são elaborados pelo nutricionista responsável e são entregues aos manipuladores que ficam responsáveis pelo preparo e distribuição do alimento para cada paciente. O cardápio é individual e determina o tipo de alimento, o volume de cada refeição e a quantidade de refeições do dia. A administração do alimento ao paciente é realizada por um membro da família (geralmente a mãe) ou pela (o) enfermeira (o) responsável pelo paciente.

O estabelecimento é composto por quatro áreas separadas fisicamente: sala de paramentação, onde é realizada a higienização das mãos e vestimenta do uniforme estéril; sala de preparo, localizada depois da sala de paramentação, onde são preparadas e envasadas as fórmulas infantis e os sucos de frutas; sala de distribuição, onde as porções envasadas ficam armazenadas sob refrigeração e onde algumas fórmulas infantis sofrem aquecimento em banho-maria antes da distribuição; sala de higienização, onde as mamadeiras são higienizadas e esterilizadas antes de entrarem na sala de preparo. Para facilitar a visualização dessa estrutura física, um layout do estabelecimento é apresentado no APÊNDICE B.

4.2 Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias

Essa etapa teve como objetivo a descrição do panorama real das condições higiênico-sanitárias do estabelecimento e de seus funcionários através da aplicação de uma lista de verificação das boas práticas em lactário, realizada durante visitas ao estabelecimento.

As visitas foram feitas no período integral durante três dias, buscando estabelecer uma relação amigável com os funcionários para que nossa presença pouco influenciasse suas atividades habituais.

A lista de verificação utilizada foi a elaborada para o documento **Boas Práticas e Sistema APPCC em Nutrição Hospitalar** do Programa Alimento Seguro (SENAC, 2004) do governo federal, e é apresentada no ANEXO A. Este instrumento foi escolhido por ser mais rigoroso quanto as exigências higiênico-sanitárias e por apresentar itens específicos para o tipo de estabelecimento em estudo.

4.3 Elaboração e validação do fluxograma de preparo da fórmula láctea infantil (FLI) reconstituída

O alimento escolhido para este estudo foi a fórmula láctea infantil (FLI) reconstituída não aquecida para lactentes, pois através do diagnóstico das condições higiênico-sanitárias, foi observado que é o tipo de fórmula infantil que apresenta maior risco de presença e/ou multiplicação de microrganismos patogênicos, por ser a fórmula consumida por crianças de um mês à cinco anos e a de maior volume diário preparado no estabelecimento.

Para a compreensão deste trabalho entende-se como FLI as fórmulas infantis a base de leite, adicionados ou não de outros ingredientes.

As visitas ao estabelecimento e a observação do preparo desta fórmula possibilitaram a elaboração do fluxograma geral do preparo de fórmula láctea infantil reconstituída para lactentes, que foi em seguida validado através de observação “in loco” do procedimento, com medições de tempo e temperatura.

Sobre o fluxograma validado foram estabelecidas etapas críticas através da análise de cada etapa do fluxograma separadamente, levando-se em consideração condições operacionais, como tempo e temperatura de exposição ao ar ambiente, temperatura de armazenamento, procedimentos de higienização de equipamentos e utensílios e higiene pessoal dos manipuladores. Com essa observação foram estabelecidas cinco etapas críticas com um total de dez pontos amostrais (PA), dos quais foram coletadas as amostras para as análises

microbiológicas. O fluxograma, sua descrição e as etapas críticas estão apresentados no APÊNDICE A.

Os pontos amostrais estão especificados a seguir e essas denominações foram utilizadas durante todo o trabalho:

PA1 - ar no preparo = ar do ambiente onde se realiza a mistura e a homogeneização da FLI;

PA2 - liquidificador = equipamento responsável pela homogeneização da FLI reconstituída. O local amostrado deste equipamento foi a área interna do copo de metal, com capacidade para 2 L;

PA3 - jarra plástica = utensílio onde é disposta a FLI reconstituída, já homogeneizada, para o resfriamento até a etapa de envase;

PA4 - colher de sopa = utensílio de metal utilizado para coletar a FLI em pó da embalagem original;

PA5 - FLI em pó = matéria prima utilizada no preparo da FLI reconstituída;

PA6 - FLI após envase = FLI reconstituída e envasada em mamadeiras estéreis, antes do armazenamento sob refrigeração;

PA7 - ar no envase = ar do ambiente onde se realiza o envase das porções individuais nas mamadeiras;

PA8 - FLI após 24h de refrigeração = FLI reconstituída, envasada e armazenada sob refrigeração durante 24h (tempo máximo de armazenamento);

PA9 - FLI após aquecimento = FLI reconstituída, envasada, armazenada por 24h sob refrigeração e aquecida em banho-maria a 65ºC por 30 minutos, para a distribuição;

PA10 - FLI após 2h da distribuição = FLI reconstituída, envasada, armazenada por 24h sob refrigeração, aquecida em banho-maria, após 2h da distribuição aos leitos (limite máximo de tempo estabelecido para o consumo da FLI reconstituída já aquecida).

4.4 Amostragem

Para a realização das análises microbiológicas foram coletadas amostras do ar ambiente, de equipamento e utensílios, da FLI em pó e da FLI reconstituída em diferentes etapas, totalizando 10 pontos amostrais, especificados no item 4.3 e indicados no APÊNDICE A.

As coletas das amostras foram realizadas de julho de 2006 a fevereiro de 2007 em seis lotes, procurando englobar uma variação sazonal das possíveis contaminações. Cada lote representa um dia de preparo no qual foram coletadas amostras dos 10 pontos amostrais estabelecidos, perfazendo um total de 60 amostras analisadas durante todo o experimento.

As amostras de ar foram coletadas em duplicata, dentro da sala de preparo, em dois pontos onde o ar entra em contato direto com o alimento: durante a etapa de mistura e homogeneização e durante a etapa de envase das porções. Para essa coleta foi utilizada a técnica de sedimentação em ágar, segundo Evancho et al. (2001).

Para as amostras coletadas do copo do liquidificador, foi utilizada a técnica de lavagem, segundo Santaella (1997), na qual o equipamento, contendo 100ml de solução tampão fosfato estéril (pH 7,2), foi ligado durante 15 s, a fim de amostrar toda a área interna que entra em contato direto com o alimento. Para cada lote foram amostrados dois copos de liquidificador, englobando todos os equipamentos que entram em contato direto com a fórmula em estudo, e os resultados das determinações foram obtidos através do cálculo das médias das contagens dos dois equipamentos analisados em cada lote.

Para o utensílio jarra plástica também foram coletadas amostras de duas jarras para cada lote de experimentação. Cada amostra foi coletada através da técnica de contato por esponja, utilizando esponja de poliuretano, que foi umedecida em 20ml de solução tampão fosfato (pH 7,2) e aplicada na área interna da base deste utensílio. Após a aplicação, a esponja foi massageada na mesma solução tampão durante 30 segundos, e a solução foi submetida às análises pré-determinadas. Os resultados das determinações foram obtidos calculando-se a média das contagens das duas jarras analisadas em cada lote.

Para as colheres, as amostras foram coletadas através da técnica de “swab”, umedecido em 10ml da mesma solução tampão e aplicado nas áreas côncava e convexa do utensílio. Para este utensílio não houve repetição dentro dos lotes pois o estabelecimento fazia uso de somente uma colher.

As metodologias utilizadas para a coleta das amostras dos utensílios estão descritas em Evancho et al. (2001). Todas as amostras foram coletadas do equipamento e dos utensílios limpos

e imediatamente antes do uso, a fim de mostrar a real contaminação que poderia ser transmitida para o alimento.

As unidades amostrais da FLI em pó foram compostas de aproximadamente 50 g, coletadas do mesmo lote utilizado no preparo da fórmula do dia, em sacos de polietileno estéreis com o auxilio de uma espátula estéril. Foram utilizadas nesse estudo fórmulas de três marcas diferentes, com a seguinte especificação: fórmula infantil com ferro para lactentes de 0 a 6 meses de idade.

Para a FLI reconstituída foram coletadas 4 amostras em diferentes etapas do fluxograma (APÊNDICE A), sendo uma amostra coletada logo após o envase das porções, uma após o período de 24 horas de armazenamento sob refrigeração, uma após o aquecimento da FLI em banho-maria para posterior distribuição e uma após 2h da distribuição. As unidades amostrais desses pontos foram compostas de aproximadamente 80ml, envasados em mamadeiras estéreis na etapa de envase.

Conforme as amostras eram coletadas, elas eram acondicionadas em uma caixa isotérmica refrigerada, onde eram mantidas até chegar ao laboratório e serem submetidas às análises microbiológicas estabelecidas.

Para a coleta de todas as amostras, tanto do equipamento e dos utensílios quanto da FLI em pó e da FLI reconstituída, foram utilizados os procedimentos assépticos necessários, de acordo com o disposto em APHA (2001).

4.5 Avaliação microbiológica

Para avaliar a qualidade higiênico-sanitária das amostras de ar, do equipamento e dos utensílios, foram realizadas as contagens de microrganismos aeróbios mesofilos totais, enterobactérias totais e *Bacillus cereus*.

Para a avaliação microbiológica das amostras da FLI em pó e da FLI reconsituída, foram realizadas as análises de quantificação de coliformes a 35ºC, coliformes a 45ºC e *Bacillus cereus* e análise de presença ou ausência estafilococos coagulase positiva e *Salmonella sp*. Esses grupos de microrganismos estão estabelecidos como padrões microbiológicos para a classe de Alimentos

Infantis, grupo dos produtos prontos ou instantâneos que serão consumidos com ou sem adição de líquidos, por bebês de até 1 ano de idade, segundo RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001). Essa classe de produto foi utilizada como base para a avaliação microbiológica, considerando que o grupo de maior risco que consome os alimentos preparados no lactário em estudo, são as crianças menores de um ano.

A tabela abaixo mostra os valores estabelecidos como padrões para esse tipo de produto, valores que foram utilizados como base para a classificação do produto em apropriado ou não apropriado para o consumo.

Tabela 2: Limites microbiológicos para fórmulas infantis em pó ou reconstituídas

GRUPO DE ALIMENTOS	**Microrganismo**	**Tolerância para Amostra INDICATIVA**	**Tolerância para Amostra Representativa**			
25 ALIMENTOS INFANTIS			n	c	m	M
b) produtos prontos ou instantâneos que serão consumidos com ou sem adição de líquidos, por bebês de até 1 ano de idade, a exceção dos prematuros, incluindo as fórmulas infantis, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas	Coliformes a 35ºC/g (ou ml)	10	5	2		10
	Coliformes a 45ºC/g (ou ml)	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag. positiva/g (ou ml)	Aus	5	0	Aus	-
	Bacillus cereus/g (ou ml)	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp/25g (ou ml)	Aus	10	0	Aus	-

Aus = ausência
Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

Para as mesmas unidades amostrais das FLIs em pó e reconstituídas, foi realizada também a contagem de enterobactérias totais, que apresenta a capacidade de indicar recontaminação pós-processamento e a possível presença não apenas de coliformes, como também a presença de *Salmonella sp* não fermentadoras de lactose e de *Enterobacter sakazakii*; e a contagem de aeróbios mesófilos totais como indicador da contaminação microbiológica do produto de uma forma geral.

Como a FLI reconstituída não sofre tratamento térmico antes do consumo e é conservada sob refrigeração por até 24h, foi realizada também a contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos totais, a fim de verificar a eficiência da conservação do produto. Essa análise foi aplicada apenas às amostras da FLI reconstituída, que corresponde aos seguintes pontos

amostrais: FLI após envase, FLI após 24h de refrigeração, FLI após aquecimento e FLI após 2h da distribuição.

4.5.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos totais

Essas determinações foram realizadas de acordo com Morton (2001). Para a contagem de mesófilos foi realizada a técnica de plaqueamento em profundidade, de 1ml da amostra e de cada diluição até 10^{-4}, em meio Plate Count Agar (PCA). As placas inoculadas foram incubadas a 35ºC durante 48 ± 2h. Para a contagem de psicrotróficos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície, de 0,1ml da amostra e das diluições até 10^{-4}, utilizando o mesmo meio de cultura, porém com incubação a 7ºC durante 10 dias.

Todas as análises foram feitas em duplicata

4.5.2 Contagem de enterobactérias totais

Realizada segundo Kornacki e Johnson (2001), a contagem de enterobactérias foi utilizada neste projeto como indicadora da qualidade microbiológica das FLIs, uma vez que estes produtos devem ser obtidos em condições higiênico-sanitárias ideais, devendo estar livre de qualquer microrganismos patogênicos, pois doses mínimas destes podem causar doenças graves nas crianças debilitadas.

Para os utensílios e os equipamentos foi utilizado o método de contagem direta em placas de Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBGA), em duplicata, com incubação a 35ºC por 24-28h. Para as amostras da FLI em pó e reconstituída, a fim de recuperar as células injuriadas, foi utilizado o método de enriquecimento pela técnica de Numero Mais Provável (NMP), sendo que o teste presuntivo foi realizado em Caldo de Enriquecimento para Enterobactérias (caldo EE), com incubação a 37ºC durante 18h, e o teste confirmativo em placas de VRBGA, inoculadas a partir dos tubos de caldo EE que apresentaram turvação (tubos positivos) e incubadas a 35ºC durante 24-28h. A partir do lote 3 foi realizada também a contagem direta em VRBGA para as amostras da FLI em pó e da FLI reconstituída, a fim de obter mais dados e comparar a precisão dos métodos.

4.5.3 Contagem de coliformes

A contagem de coliformes a 35ºC (totais) e de coliformes a 45ºC (fecais ou termotolerantes) foi realizada pela técnica de NMP segundo Kornacki e Johnson (2001), sendo que o teste presuntivo foi realizado em caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), para ambos os grupos, e o teste confirmativo foi realizado em caldo Verde Brilhante (VB) para coliformes a 35ºC e em caldo Escherichia coli (EC) para coliformes a 45ºC.

4.5.4 Análise de microrganismos patogênicos

A contagem de *B. cereus* foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície de 0,1ml da amostra e das diluições até 10^{-2}, utilizando o ágar Manitol Egg Yolk Polymyxin (MYP), segundo a metodologia descrita por Bennett e Belay (2001), com incubação a 30ºC durante 24 e 48h.

A análise de *Salmonella* foi realizada pelo método de presença ou ausência, segundo Andrews et al. (2001), onde 25g (ou ml) de cada amostra foi adicionado a 225mL de caldo lactosado e incubado a 35ºC por 24h para a etapa de pré-enriquecimento. Para a etapa de enriquecimento seletivo foram utilizados os caldos Tetrationato (TT), incubado a 35ºC por 24h e Rappaport-Vassiliadis (RV), incubado a 45ºC por 24h. A etapa de isolamento foi realizada em placas de Petri contendo os ágares Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Bismuto Sulfito (BS) e Hektoen Enteric (HE), incubadas a 35ºC por 24-48h. Após a etapa de isolamento, três colônias (características e não características) de cada placa foram transferidas para tubos contendo Ágar Tríplice de Açúcar (TSI) e tubos contendo Ágar Lisina Ferro (LIA) e incubadas a 35ºC por 24h.

Para a detecção de estafilococos coagulase positiva e negativa foi utilizado o método de presença e ausência descrito em Silva et al. (1997), que conta com uma etapa inicial de enriquecimento seletivo em caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com NaCl, antes do plaqueamento em ágar Baird-Parker (BP). Após a etapa de enriquecimento, 0,1 ml de cada amostra foi inoculado, em duplicata, na superfície de placas contendo ágar BP. Após a incubação das placas a 35ºC por 48h, cinco colônias características de cada placa foram selecionadas e transferidas para caldo e ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 35ºC por 24h para posterior caracterização morfológica através da coloração de Gram e para a realização dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

4.5.5 Identificação de *Staphylococcus*

Os isolados que apresentaram atividade de coagulase negativa, mas morfologia característica de *Staphylococcus* (cocos Gram positivos em forma de cachos de uva), foram submetidos ao teste de sensibilidade à furazolidona (20mg/ml) em meio sólido, a fim de descartar os que não pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, ou seja, aqueles que apresentaram resistência a esse antibiótico (KLOOS e SCHLEIFER, 1986).

Os isolados que se mostraram sensíveis a furazolidona foram submetidos a uma série de testes bioquímicos através do kit rápido de identificação API Staph (bioMérieux), um sistema padronizado para a identificação de espécies dos gêneros *Staphylococcus, Micrococcus* e *Kocuria*. O teste foi realizado com culturas de 24h em ágar BHI.

A diluição utilizada no teste foi padronizada em 0,5 na escala McFarland, segundo instruções do manual do kit, através do aparelho Densimat (bioMérieux).

4.5.6 Identificação de enterobactérias

Como a contagem de enterobactérias se apresentou bem elevada tanto para o método de NMP, quanto para a contagem direta em placas, e a presença do patógeno *E. sakazakii* em fórmulas para lactentes vem se mostrando preocupante, como já explorado no item 3.5.1, foi realizada a identificação de algumas colônias isoladas do meio VRBGA. Para tal identificação, foram isoladas três colônias de cada amostra obtidas através do método do NMP e com as seguintes características: colônias pequenas, com centro violeta e com halo de precipitação de sais biliares. A identificação foi realizada através do kit API 20E (bioMérieux), que é um sistema padronizado para a identificação de membros da família Enterobacteriacea.

4.5.7 Avaliação microbiológica do ar

Para a avaliação microbiológica do ar nos pontos amostrais escolhidos foi utilizada a técnica de sedimentação na qual as placas ficaram abertas durante 15 minutos para a coleta das amostras. Foram utilizados três tipos de meios de cultura para cada ponto amostral, em duplicata: meio PCA, para contagem total de aeróbios mesófilos; meio VRBGA, para a contagem total de enterobactérias e meio MYP, para a contagem de *B. cereus*. Após a coleta das amostras, as placas

de PCA e VRBGA foram incubadas a 35ºC durante 48 h e as placas de MYP foram incubadas a 30º durante 48 h. O método foi conduzido segundo a metodologia recomendada pela American Public Health Association (APHA, 2001).

4.7 Avaliação da temperatura de refrigeração

Para avaliar a eficácia da etapa de refrigeração, foi realizado um acompanhamento da variação da temperatura dentro do refrigerador, durante as 24h em que a FLI reconstituída permanece estocada. A medição foi feita a cada 30 minutos, em dois pontos diferentes, utilizando um sistema de termopar tipo T, sendo que um termopar foi introduzido no centro geométrico da FLI reconstituída contida em uma mamadeira e outro termopar foi posicionado do lado de fora da mamadeira, procurando diferenciar a mudança de temperatura no ambiente interno do refrigerador com a mudança de temperatura no centro geométrico do líquido. Esse acompanhamento de temperatura foi realizado em duplicata (em dois lotes de preparo). O sistema de termopar utilizado para essa avaliação foi calibrado contra um termopar tipo PT100 (Omega, modelo CL526), para a faixa de temperatura de 5-25ºC.

4.8 Determinação de pontos críticos de controle

Para determinar a ocorrência de pontos de controle (PC) e pontos críticos de controle (PCC), sobre o fluxograma validado "in loco", foi realizado o preenchimento de formulários utilizando a ferramenta do sistema APPCC "Árvore Decisória" (ANEXO B), que consiste em uma série de cinco questões elaboradas para avaliar se uma etapa do processo produtivo pode ser estabelecida como um ponto crítico de controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias

A primeira atividade desenvolvida no estabelecimento foi a aplicação da lista de verificação (ANEXO A), a fim de realizar um diagnóstico das condições higiênico-sanitárias. O estabelecimento já possuía um Manual de Boas Práticas, dessa forma a lista de verificação também pôde avaliar o quanto desse manual é efetivamente aplicado. Um resumo dessa avaliação está apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3: Resumo da avaliação das condições higiênico-sanitárias em lactário institucional

Grupo de itens	% de NC	% de C	% de NO	% de NA
Documentação	0	100	0	0
Projeto de instalações	36	57	7	0
Equipamentos e utensílios	67	33	0	0
Higiene	23	65	12	0
Setores do lactário	33	67	0	0
Controle de qualidade	67	33	0	0
Condições organizacionais	33	50	17	0
Total de atributos	34		66	

NC = não conforme
C = conforme
NO = não observado
NA = não se aplica

Pode-se observar que nenhum item foi avaliado como NA (não se aplica), mostrando que a lista de verificação utilizada é adaptada para o tipo de estabelecimento estudado, possibilitando assim uma avaliação mais detalhada das suas condições higiênico-sanitárias.

Segundo a caracterização estabelecida pela resolução RDC 275/2002 da ANVISA, este estabelecimento se enquadra no Grupo 2 para condições higiênico-sanitárias, por atender a menos de 75% (66%) do total de atributos analisados, incluindo os itens conforme (C) e os não observados (NO).

O grupo de itens referente ao controle de qualidade e o grupo referente a equipamentos e utensílios apresentam as maiores porcentagens de não conformidade; cerca de 67% dos itens desses grupos não estão conforme as especificações estabelecidas e para ambos os grupos não houve item não observado (NO). Pode-se verificar então que existe uma falha no controle de

qualidade dos produtos preparados no estabelecimento e que apesar do Manual de Boas Práticas englobar a implantação de sistemas preventivos de controle de qualidade, o estabelecimento ainda não colocou em prática a utilização de instrumentos, como uma ficha para registrar o tempo e a temperatura de um tratamento térmico, necessários para a posterior implantação do sistema APPCC.

A alta porcentagem de itens não conformes do grupo referente aos equipamentos e utensílios se deve principalmente às falhas no desenho sanitário dos equipamentos e à forma inadequada de guardar equipamentos e utensílios.

Todo estabelecimento onde se manipulam alimentos deve elaborar seu próprio Manual de Boas Práticas e o conteúdo deste deve ser aplicado no estabelecimento e no dia a dia dos manipuladores e administradores.

Um resumo mais detalhado das não conformidades encontradas nesta avaliação está apresentado no **Quadro 1,** seguido de sugestões para a melhoria do desempenho do estabelecimento. Alguns itens não conformes não foram explorados neste quadro por representar responsabilidade do hospital, sendo de difícil intervenção por parte dos responsáveis pelo lactário.

A correção das falhas relacionadas com higiene operacional está mais ao alcance do estabelecimento do que as falhas relacionadas com a estrutura física, pois as correções necessárias para estas são dependentes do sistema público de saúde.

Quadro 1: Principais não conformidades e melhorias propostas

Grupo de item	Subitens mais significativos	Principais problemas	Melhorias propostas
Projeto de instalações	Pisos e Ralos	Pisos permeáveis e em mau estado de conservação	Planejar a troca dos pisos
	Ventilação	Não há ventilação suficiente levando ao aumento da temperatura e da umidade das salas	Solicitar o concerto do ar condicionado e providenciar a manutenção preventiva dos filtros
	Controle de pragas	Ausência de um programa preventivo de controle de pragas no estabelecimento	Elaborar o programa e possibilitar sua aplicação
Equipamentos e utensílios	---	Desenho sanitário dos equipamentos não favorece a higienização	Substituir o liquidificador por um de melhor desenho sanitário
	---	São guardados em locais não adequados	Providenciar um armário fechado para guardar os equipamentos e os utensílios separadamente
Higiene	Do estabelecimento, dos equipamentos e dos utensílios	Não há procedimentos de higienização descritos	Providenciar POP de higienização de equipamentos e utensílios
		Ausência de registros de higienização	Anexar registros de higienização aos POP
	Higiene pessoal, mãos, uniforme e acessórios	Não são realizados exames médicos anuais nos manipuladores	Providenciar a realização dos exames médicos necessários (descritos no Manual de Boas Práticas)
		Higienização incorreta das mãos	Não utilizar papel reciclado e aplicar solução de álcool 70% após a correta lavagem das mãos
		Uso de adornos	Treinamento dos manipuladores
		Uso inadequado de luvas	Se utilizar luvas, aplicar solução de álcool 70% antes de começar a atividade e trocar de luva sempre que trocar de atividade
Setores do lactário	Área para preparo de formulações lácteas e não lácteas	Ausência de armários para a guarda da FLI em pó e outras matérias primas	Providenciar armários fechados
		Não é realizado sanitização dos utensílios e dos equipamentos	Acrescentar a etapa de sanitização com álcool 70%
	Área de distribuição das formulações lácteas e não lácteas	Termômetro da geladeira desregulado	Providenciar a calibração do termômetro
	Distribuição	Não há acompanhamento do tempo de consumo do alimento	Orientar o acompanhante do paciente quanto ao prazo de validade do produto, ou recolher o alimento após 1h de distribuição
Controle de qualidade	---	Ausência de controle bacteriológico das FLI reconstituídas	Pedir ao hospital a realização dessas análises pelo menos uma vez ao mês
		Ausência de controle no tratamento térmico	Padronizar o tratamento térmico e estabelecer controle de tempo e temperatura
		Ausência de registro de funcionamento da autoclave	Acompanhar e registrar a operação da autoclave

5.2 Avaliação microbiológica

5.2.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais

5.2.1.1 Equipamento e utensílios

Analisando a **Tabela 4** pode-se observar que a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais apresentou valores entre 10^2 e 10^6 UFC, para a maioria das amostras provenientes do liquidificador e da jarra plástica. As amostras da colher apresentaram contagem apenas no terceiro lote de amostragem (40 UFC/utensílio).

Os liquidificadores utilizados na homogeneização da FLI apresentaram contagens constantes, porém altas, na ordem de 10^6-10^7 UFC/equipamento, com exceção apenas no primeiro lote de amostragem no qual a contagem foi de 4,7 x 10^3 UFC/equipamento. Neste lote foi constatada a aplicação de álcool 70% durante 5 segundos, antes do uso do equipamento, o que pode explicar uma contagem menor de microrganismos mesófilos, em comparação com os demais lotes, onde não houve aplicação de nenhum sanitizante. O equipamento era retirado da prateleira e apenas lavado rapidamente com água morna (45ºC) antes do uso. A ausência da etapa de sanitização na higienização do equipamento pode explicar as altas contagens dos lotes 2, 3, 4, 5 e 6, sendo que o valor máximo foi de 6,2 x 10^7 UFC/equipamento, obtido no lote 6.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais da jarra plástica, utilizada para armazenar a FLI reconstituída antes do envase, se mostrou elevada, com valores entre 10^2 e 10^3 UFC/cm^2 nos três primeiros lotes de amostragem. Nos lotes 4 e 5 as contagens foram inferiores a 0,2 UFC/cm^2, apesar de não ter sido constatado nenhuma mudança nos procedimentos de higienização do utensílio. O processo de higienização da jarra plástica também não conta com a etapa de sanitização.

Tabela 4: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais no equipamento e nos utensílios utilizados no preparo da FLI reconstituída.

LOTE	Liquidificador (UFC/equipamento)	Jarra plástica (UFC/cm^2)	Colher (UFC/utensílio)
1	$4{,}7 \times 10^3$	$3{,}1 \times 10^2$	< 10
2	$5{,}9 \times 10^6$	$2{,}2 \times 10^2$	< 10
3	$5{,}8 \times 10^6$	$3{,}1 \times 10^3$	$4{,}0 \times 10^1$
4	$9{,}6 \times 10^6$	< 0,2	< 10
5	$1{,}1 \times 10^7$	< 0,2	< 10
6	$6{,}2 \times 10^7$	$4{,}5 \times 10^1$	< 10

FLI = Fórmula Láctea Infantil
UFC = Unidade Formadora de Colônia

Os padrões microbiológicos para equipamentos e utensílios variam de acordo com o tipo de indústria ou estabelecimento que processam alimentos. Para um estabelecimento como o lactário, a quantidade de microrganismos presentes deve ser a menor possível frente à susceptibilidade de seus consumidores.

O Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos recomenda que uma superfície limpa e sanitizada de um serviço de alimentação, não contenha mais de 100 UFC por utensílio ou por área amostrada (EVANCHO et al., 2001). Comparando esta recomendação com as contagens obtidas nas determinações, pode-se verificar que somente a colher apresentou-se dentro da recomendação para todos os lotes de experimentação, podendo ser considerada como efetivamente higienizada.

A jarra plástica apresentou contagens de microrganismos mesófilos totais acima do valor recomendado de 100 UFC/cm^2 nos três primeiros lotes, com valor máximo encontrado de $3{,}1 \times 10^3$ UFC/cm^2 no lote 3, e contagens abaixo do valor recomendado nos três últimos lotes. Este tipo de utensílio também foi indicado como crítico por Alicia et al., citados por Salles e Goulart (1997), que obtiveram contagens de mesófilos totais variando entre $2{,}8 \times 10^5$ e $2{,}8 \times 10^{14}$ UFC/ml, em 100% das amostras de jarra plástica analisadas e por Salles e Goulart (1997) que obtiveram contagens superiores ao limite descrito acima, para 8 das 12 amostras de jarras plásticas analisadas em dois lactários de Florianópolis/SC. Segundo os autores, o material plástico é considerado inadequado dentro dos serviços de alimentação por ser um material poroso, facilitando a formação de incrustações e assim dificultando sua higienização.

Todas as amostras dos liquidificadores apresentaram contagens de microrganismos mesófilos totais acima do limite de 100 UFC/equipamento, com destaque para a amostra do lote 6, que apresentou uma contagem média de 6,2 x 10^7 UFC/equipamento.

Almeida et al. (1999) também encontraram contagens elevadas de microrganismos aeróbios mesófilos, com valor médio de 1,3 x 10^2 UFC/cm^2, no liquidificador de um lactário em Salvador/BA. Em um trabalho realizado em um hospital público de Uberlândia/MG com a finalidade de avaliar a qualidade de dietas enterais artesanais e em pó, Muniz (2005) encontrou uma contagem de microrganismos aeróbios mesófilos de 1,7 x 10^8 UFC/ml no liquidificador utilizado como o único equipamento no preparo dessas FLIs.

Pode-se verificar então que o procedimento de higienização de equipamentos e utensílios utilizado no estabelecimento em estudo não é eficiente nem padronizado, sendo necessário uma revisão do processo e a elaboração de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) para a higienização de equipamentos e de utensílios (como indicado no **Quadro 1**).

Segundo Simmons, citado por Santos (2006), os recipientes, utensílios e mamadeiras utilizados no preparo de fórmulas infantis devem ser higienizados tão rápido quando possível após o uso para impedir a formação de biofilmes.

5.2.1.2 FLI em pó e reconstituída

Na **Tabela 5** pode-se observar que a FLI em pó apresentou contagens < 10 UFC/g para todas as amostras analisadas. Porém, as FLI reconstituídas apresentaram contagens altas para todas as amostras, destacando-se as amostras do lote 5, no qual o maior valor encontrado foi de 5,7 x 10^7 UFC/ml para a FLI após 2h da distribuição. Essas contagens elevadas encontradas no produto reconstituído mostram claramente a ocorrência de falhas na manipulação e/ou na higienização dos equipamentos e utensílios utilizados em tal processo, uma vez que a matéria prima (FLI em pó) mostrou-se microbiologicamente adequada ao consumo, considerando este parâmetro analisado.

Pode-se verificar na mesma tabela que no lote 3 houve uma redução de 2 casas decimais após o aquecimento da FLI em banho-maria. No entanto, para os demais lotes não foi observada essa diminuição, o que pode ser explicado pela falta de padronização e controle do tempo e da

temperatura de aquecimento da FLI em banho-maria. É necessário estabelecer os valores do tempo e da temperatura dessa etapa para que o aquecimento seja eficiente como um tratamento térmico de pasteurização.

O estabelecimento não conta com nenhum registro ou POP para essa etapa de aquecimento. Esses resultados mostram que a etapa de aquecimento é um ponto crítico que deve ser controlado, pois é capaz de eliminar o risco ou diminuí-lo a níveis aceitáveis e na seqüência do fluxograma não se observa nenhuma outra etapa que controle os possíveis perigos (vide APÊNDICE A).

Nos lotes 1 e 2 não foram realizadas as determinações de microrganismos aeróbios mesófilos totais para a FLI, pois o objetivo inicial era analisar apenas os grupos de microrganismos estabelecidos como padrões microbiológicos pela RDC nº12/2001 (BRASIL, 2001). Como esses microrganismos não estavam sendo isolados, foi incluída a análise de microrganismos aeróbios mesófilos totais para indicar a contaminação geral das FLI reconstituídas.

Tabela 5: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais na FLI em pó e reconstituída.

LOTE	FLI em pó (UFC/g)	FLI após envase (UFC/ml)	FLI após 24h de refrigeração (UFC/ml)	FLI após aquecimento (UFC/ml)	FLI após 2h da distribuição (UFC/ml)
3	< 10	$2,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
4	< 10	$2,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$
5	< 10	$1,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$
6	< 10	$4,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$

FLI = Fórmula Láctea Infantil
UFC = Unidade Formadora de Colônia

Através desta tabela pode-se observar que as maiores contagens foram encontradas nos lotes 4 e 5, nos quais também foram encontradas contagens elevadas para os liquidificadores. Como nestes lotes não houve contagem acima dos limites recomendados pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos para os utensílios, pode-se indicar que o liquidificador foi a principal fonte de contaminação da FLI reconstituída nestes lotes de experimentação.

A Resolução RDC nº12/2001 não estabelece padrão microbiológico para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais para a fórmula infantil estudada. Segundo o "Compliance Program Guidance Manual" da FDA, a quantidade máxima aceitável para mesófilos totais em fórmula infantil é de 10.000 células por g ou ml de alimento. Analisando a **Tabela 5** pode-se verificar que, apesar da FLI em pó apresentar contagem abaixo do limite recomendado pelo FDA em todos os lotes analisados, a maioria das amostras da FLI reconstituída apresentou contagens superiores a esse limite.

Das amostras da FLI reconstituída, apenas as amostras coletadas após o aquecimento e após 2h da distribuição, ambas do lote 3, estão apropriadas para o consumo, as demais amostras apresentaram contagens maiores que 10.000 UFC/ml, estando acima do valor máximo estabelecido pela FDA, podendo ser consideradas inapropriadas para o consumo.

Analisando fórmulas infantis preparadas em hospitais de Salvador/BA, Almeida et al. (1999) também mostraram um aumento da contagem de aeróbios mesófilos totais, em até 2 ciclos logarítmicos, quando a fórmula em pó é reconstituída, e destacaram os utensílios como uma das principais causas desta contaminação, que neste mesmo estudo apresentaram contagens de até 5,6 x 10^4 UFC/cm^2 de área amostrada. Salles e Goulart (1997) também encontraram, em lactários hospitalares de Florianópolis/SC, amostras de FLI reconstituída com contagens de aeróbios mesófilos totais acima dos padrões microbiológicos estabelecidos para o leite tipo A (máximo de 2 x 10^3 UFC/ml), que foi o padrão utilizado como comparação pelos autores.

Em uma pesquisa realizada em Porto Alegre/RS, Santos e Tondo (2000) analisaram 25 fórmulas de mamadeiras industrializadas, das quais 80% encontraram-se fora dos padrões de comparação utilizados. Contagens elevadas também foram encontradas por Sessa e Furlanetto (1990) onde 87,5% das amostras analisadas estavam fora dos padrões e o maior valor encontrado foi de 6,8 x 10^7 UFC/ml do alimento

Como a maioria dos microrganismos patogênicos ao homem pertence à espécies mesófilas, uma alta contagem de mesófilos totais indica que o alimento foi submetido a condições que favorecem o desenvolvimento de qualquer patógeno que possa estar presente no alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

5.2.2 Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos totais

Para a contagem de microrganismos psicrotróficos também não existe nenhum padrão estabelecido para fórmulas infantis à base de leite em pó. Analisando a **Tabela 6** pode-se observar um aumento significativo na contagem após as 24h de refrigeração, indicando que a temperatura do refrigerador não se manteve abaixo de 5ºC (temperatura indicada para o armazenamento de produtos prontos sob refrigeração segundo BRASIL, 2004), como comprovado no item **5.3**. Esse aumento foi mais expressivo no lote 5, no qual pode ter ocorrido uma maior variação na temperatura do refrigerador.

Tabela 6: Contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos totais na FLI reconstituída

LOTE	FLI após envase (UFC/ml)	FLI após 24h de refrigeração (UFC/ml)	FLI após aquecimento (UFC/ml)	FLI após 2h da distribuição (UFC/ml)
1	NA	$1,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	NA
2	$1,6 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	< 10	< 10
3	$2,9 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	< 10	< 10
4	$3,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
5	$6,4 \times 10^3$	$4,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$
6	$1,8 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	< 10	< 10

FLI = Fórmula Láctea Infantil
NA = não analisado
UFC = Unidade Formadora de Colônia

Pode-se verificar também que o aquecimento em banho-maria reduziu em até quatro casas decimais a contagem dos microrganismos psicrotróficos, como ocorrido nos lotes 3 e 6, nos quais o aquecimento deve ter sido mais eficiente, deixando a amostra com uma quantidade não detectável desse grupo de microrganismo. Essa mesma redução não foi observada no lote 5, no qual foi detectada a maior contagem após as 24h de refrigeração.

Esses dados comprovam a necessidade de padronizar o binômio tempo e temperatura para a etapa de aquecimento antes da distribuição, etapa essa que já foi indicada como um ponto crítico de controle para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.

Alguns microrganismos psicrotróficos emergentes vêm ameaçando a segurança de alimentos refrigerados. Massaguer (2006) destaca *Clostridium botulinum, Listeria*

monocytogenes, Vibrium cholera, Yersinia enterocolitica e algumas linhagens de *E. coli* como os principais patógenos capazes de crescer em temperaturas inferiores a 5ºC.

Christiansson et. al. (1989) mostraram em seu trabalho que 102 dos 136 isolados de *B. cereus,* obtidos de leite e sorvete armazenados a 8ºC, eram capazes de produzir toxina extracelular. Griffiths (1990) também reportou a existência de linhagens psicrotróficas de *B. cereus* capazes de produzir enterotoxina diarréica.

Poucos estudos utilizam a contagem de microrganismos psicrotróficos para avaliar a qualidade higiênico-sanitária de FLI. Procurando avaliar a qualidade de 144 amostras de leite cru, Cempirková (2002) encontrou uma quantidade de microrganismos psicrotróficos variando entre 0,7 x 10^3 e 64,8 x 10^3 UFC/ml. Valbuena et al. (2004) analisaram 216 amostras de leite pasteurizado comercializado em padarias e supermercados da Venezuela e encontraram uma contagem média para microrganismos psicrotróficos de 8,7 x 10^2 UFC/ml e atribuíram essa contagem a uma contaminação pós-pasteurização.

No processo de fabricação na indústria, as FLIs passam por tratamento térmico de pasteurização acrescido do calor aplicado na secagem, logo, é esperado que a contagem de grupos como dos microrganismos psicrotróficos seja nula, como pôde ser observado em todos os lotes amostrados neste estudo. A contaminação por esse grupo de microrganismos ocorre após a reconstituição e pode colocar em risco a saúde dos seus consumidores.

5.2.3 Contagem de enterobactérias totais

5.2.3.1 Equipamento e utensílios

Analisando a **Tabela 7** pode-se verificar que a colher foi o único utensílio que apresentou contagem abaixo do limite de detecção do método (< 10 UFC/utensílio) para todos os lotes analisados. Para a colher pode-se dizer que o processo de higienização foi eficiente. Já para os liquidificadores e para as jarras plásticas não se conclui o mesmo, visto que as contagens se mostraram elevadas e variadas, não apenas para o grupo das enterobactérias, como também para os grupos dos microrganismos já analisados.

A aplicação de álcool no liquidificador antes do uso, observada no lote 1, diminuiu a contagem de enterobactérias neste equipamento, assim como foi observado para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos. Pode-se observar que em todos os lotes pelo menos um equipamento ou utensílio apresentou contagem de enterobactérias, contaminação essa que pode ser decorrente de uma higienização ineficiente e/ou das condições inadequadas de armazenamento do equipamento ou dos utensílios.

Tabela 7: Contagem de enterobactérias totais no equipamento e nos utensílios utilizados no preparo da FLI reconstituída

LOTE	Liquidificador (UFC/equipamento)	Jarra plástica (UFC/cm^2)	Colher (UFC/utensílio)
1	< 1	1,1	< 10
2	< 1	0,4	< 10
3	$6,4 \times 10^4$	$9,6 \times 10^1$	< 10
4	$6,0 \times 10^6$	< 0,2	< 10
5	$3,7 \times 10^6$	< 0,2	< 10
6	$1,6 \times 10^7$	< 0,2	< 10

FLI = Fórmula Láctea Infantil
UFC = Unidade Formadora de Colônia

Nos lotes 4, 5 e 6, apenas o liquidificador apresentou contagem de enterobactérias, dentre os equipamentos e utensílios analisados ($3,0 \times 10^3$, $1,8 \times 10^3$ e $8,0 \times 10^4$UFC/ml, respectivamente). Este equipamento também foi o único que apresentou contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nos lotes 4 e 5. Essas determinações indicam que o liquidificador é uma das principais fontes de contaminação para estes grupos de microrganismos. Coincidentemente os lotes 4, 5 e 6 apresentaram as maiores contagens de enterobactérias para as amostras da FLI reconstituída, como pode ser visualizado na **Tabela 8**.

5.2.3.2 FLI em pó e reconstituída

A FLI em pó apresentou contagens menores que os limites de detecção dos métodos utilizados para todas as amostras analisadas (contagens < 3 NMP/g e < 10 UFC/g). Já as amostras de FLI após o envase apresentaram contagens elevada desse grupo de microrganismo para todos os lotes, exceto para o lote 1, no qual a contagem foi < 3 NMP/ml. Isso mostra que a

contaminação se dá no momento do preparo da FLI e pode ter origem no equipamento ou utensílios utilizados, cujas contaminações já foram constatadas neste estudo.

Tabela 8: Contagem de enterobactérias totais na FLI, obtida pelo método do NMP

LOTE	**FLI em pó (NMP/g)**	**FLI após envase (NMP/ml)**	**FLI após 24h de refrigeração (NMP/ml)**	**FLI após aquecimento (NMP/ml)**	**FLI após 2h da distribuição (NMP/ml)**
1	< 3	< 3	> 1100	> 1100	> 1100
2	< 3	> 1100	> 1100	> 1100	> 1100
3	< 3	> 1100	150	23	43
4	< 3	> 1100	> 1100	> 1100	> 1100
5	< 3	> 11000	> 11000	> 11000	> 11000
6	< 3	11000	11000	2400	2400

FLI = Fórmula Láctea Infantil
NMP = Número Mais Provável

Tabela 9: Contagem de enterobactérias totais na FLI, obtida pelo método de plaqueamento direto

LOTE	**FLI em pó (UFC/g)**	**FLI após envase (UFC/ml)**	**FLI após 24h de refrigeração (UFC/ml)**	**FLI após aquecimento (UFC/ml)**	**FLI após 2h da distribuição (UFC/ml)**
3	< 10	$9{,}9 \times 10^2$	NA	$7{,}9 \times 10^2$	$9{,}5 \times 10^1$
4	< 10	$4{,}6 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^3$	$2{,}1 \times 10^4$	$4{,}8 \times 10^4$
5	< 10	$2{,}9 \times 10^4$	$3{,}5 \times 10^6$	$4{,}0 \times 10^6$	$4{,}4 \times 10^6$
6	< 10	$7{,}5 \times 10^3$	$1{,}6 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^3$	$9{,}4 \times 10^2$

FLI = Fórmula Láctea Infantil
NA = Não Analisado
UFC = Unidade Formadora de Colônia

Assim como para os microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos (**Tabela 5** e **Tabela 6**) as maiores contagens de enterobactérias foram obtidas no lote 5, para ambos os métodos utilizados nesta determinação.

Não existe um padrão estabelecido para a contagem de enterobactérias em produtos como a FLI, mas considerando a relação direta entre a quantidade de enterobactérias e a de coliformes totais, pode-se dizer que as quantidades encontradas estão bem acima das quantidades permitidas para coliformes totais (**Tabela 2**).

A presença de enterobactérias, como coliformes totais, em uma amostra de alimento processado, indica contaminação pós-sanitização ou pós-processamento, evidenciando práticas inadequadas de higiene e sanitização (SILVA et al., 1997).

Procurando detectar a presença de enterobactérias em amostras de fórmulas infantis em pó, Iversen e Forsythe (2003) analisaram 82 amostras através do método de contagem direta em VRBGA e através do método de enriquecimento em caldo EE e posterior crescimento em VRBGA. Com o primeiro método foi detectada contagem em apenas uma amostra e na ordem de 200 UFC/g do alimento. Já com o segundo método a quantidade de amostras positivas aumentou para nove, mostrando uma maior sensibilidade do método em recuperar células injuriadas.

Neste trabalho não foi possível estabelecer uma correlação precisa entre os dois métodos utilizados, pois o limite de detecção utilizado no método do NMP foi inferior a quantidade de enterobactérias presente na maioria das amostras. Apesar de este método incluir uma etapa de enriquecimento, em algumas amostras como a FLI após aquecimento do lote 3 e a FLI após 24h de refrigeração do lote 6, as contagens foram menores que aquelas obtidas com o método de plaqueamento direto.

5.2.4 Contagem de bactérias do grupo coliforme

A presença de coliformes totais em FLI representa uma contaminação durante o preparo, pois o tratamento térmico utilizado na secagem do produto é suficiente para destruir todos os coliformes (MARSHALL, 1992). Esta afirmação é confirmada neste estudo, pois, como pode ser visualizado na **Tabela 10**, a FLI em pó apresentou contagem < 3 NMP/g de coliformes totais em todos os lotes analisados. Porém, para a maioria das amostras da FLI reconstituída, a contagem de coliformes totais foi elevada, principalmente nos lotes 4 e 5 que apresentaram valores maiores que 1.100 NMP/ml.

Diferentemente da contagem de enterobactérias, o aquecimento em banho-maria provocou uma diminuição da contagem de coliformes totais nos lotes 1, 2 e 6. Já o aquecimento realizado para os lotes 4 e 5 não foi suficiente para se detectar uma redução da contagem de coliformes totais.

Tabela 10: Contagem de coliformes totais na FLI em pó e reconstituída

LOTE	**FLI em pó (NMP/g)**	**FLI após envase (NMP/ml)**	**FLI após 24h de refrigeração (NMP/ml)**	**FLI após aquecimento (NMP/ml)**	**FLI após 2h da distribuição (NMP/ml)**
1	< 3	23	> 1100	9	9
2	< 3	> 1100	> 1100	1100	460
3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
4	< 3	> 1100	> 1100	> 1100	> 1100
5	< 3	> 1100	> 1100	> 1100	> 1100
6	< 3	4600	11000	23	93

FLI = Fórmula Láctea Infantil
NMP = Número Mais Provável

A resolução RDC12/2001 estabelece como limite máximo aceitável para o alimento em estudo, 10 coliformes a 35ºC / mL de amostra indicativa. Pode-se observar na **Tabela 10** que a maior parte das amostras apresentou um valor maior que o limite máximo para coliformes a 35ºC (totais), mostrando que a FLI reconstituída se encontrava em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias em pelo menos um ponto amostral por lote analisado. Apenas no lote 3 todas as amostras se apresentaram em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, segundo a resolução vigente. No lote 1 apenas a amostra de FLI após o aquecimento apresentou contagem dentro do limite estabelecido pela referida resolução (9 NMP/ml).

Salles e Goulart (1997) encontraram 45,9% de FLI com contagens de coliformes totais acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente, em um lactário hospitalar de Florianópolis/SC. Nesse mesmo estudo foi detectado que 58,3% das jarras plásticas analisadas também apresentaram contagens acima dos limites estabelecidos para esse grupo de microrganismos, evidenciando o utensílio como fonte de contaminação. No estudo realizado por Santos e Tondo (2000), 9 das 21 amostras de FLI apresentaram contagens de coliformes totais acima de 100 NMP/ml.

Santos (2006) encontrou coliformes totais em apenas 2 das 17 amostras de FLI para lactentes de 0-6 meses, porém em contagem elevada (> 2,4 x 10^3 NMP/ml).

A **Tabela 11** mostra a porcentagem de amostras da FLI que atenderam os padrões estabelecidos pela RDC nº12/2001 para a contagem de coliformes a 35ºC. Analisando a tabela pode-se verificar que todas as amostras da FLI em pó se apresentaram adequadas para o

consumo, enquanto mais de cinqüenta por cento das amostras das demais fases de preparo da FLI reconstituída se apresentaram em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para a contagem de coliformes a 35ºC. Um destaque maior pode ser dado para a FLI após 24h de refrigeração, que apresentou 83,3% das amostras fora dos padrões estabelecidos para esse grupo de microrganismos.

Tabela 11: Condições higiênico-sanitárias das FLI em pó e reconstituída, com relação à presença de coliformes a 35ºC.

ITEM	Nº de amostras	Amostras com contagens aceitáveis (%)	Amostras com contagens não aceitáveis (%)
FLI em pó	6	100 (6)	0 (0)
FLI após envase	6	33,3 (2)	66,7 (4)
FLI após 24h de refrigeração	6	16,7 (1)	83,3 (5)
FLI após aquecimento	6	33,3 (2)	66,7 (4)
FLI após 2h de distribuição	5	20 (1)	80 (4)

FLI = Fórmula Láctea Infantil

Apesar de todas as amostras da FLI reconstituída do lote 3 apresentarem contagem de enterobactérias, nenhuma dessas amostras apresentou contagem de coliformes totais. Isso mostra que a contagem de enterobactérias pode ser mais eficiente para a indicação de condições higiênico-sanitárias para um alimento como o estudado.

Segundo Marshall (1992) o método para a contagem de enterobactérias totais apresenta uma maior sensibilidade à detecção de contaminação pós-processamento do que o teste de contagem de coliformes, além de ser mais rápido e englobar microrganismos como as *Salmonella* não fermentadoras de lactose e o *Enterobacter sakazakii*.

Nenhuma das amostras analisadas neste trabalho apresentou contagem para o grupo dos coliformes a 45ºC (fecais ou termotolerantes). Assim não se pode relacionar a contaminação de coliformes a 35ºC (totais) encontrada neste trabalho, com uma contaminação de origem fecal, mas sim com uma possível contaminação ambiental. Trabalhos como o de Santos e Tondo (2000) e de Santos (2006) também não apresentaram contaminação das fórmulas infantis por coliformes

fecais, mas no trabalho realizado por Salles e Goulart (1997), 41,6% das amostras de FLI reconstituída apresentaram contaminação por esse grupo de microrganismos.

As Figuras 1 e 2 ilustram melhor a variação das contagens de microrganismos indicadores durante as fases pelas quais passou a FLI reconstituída, até ser consumida.

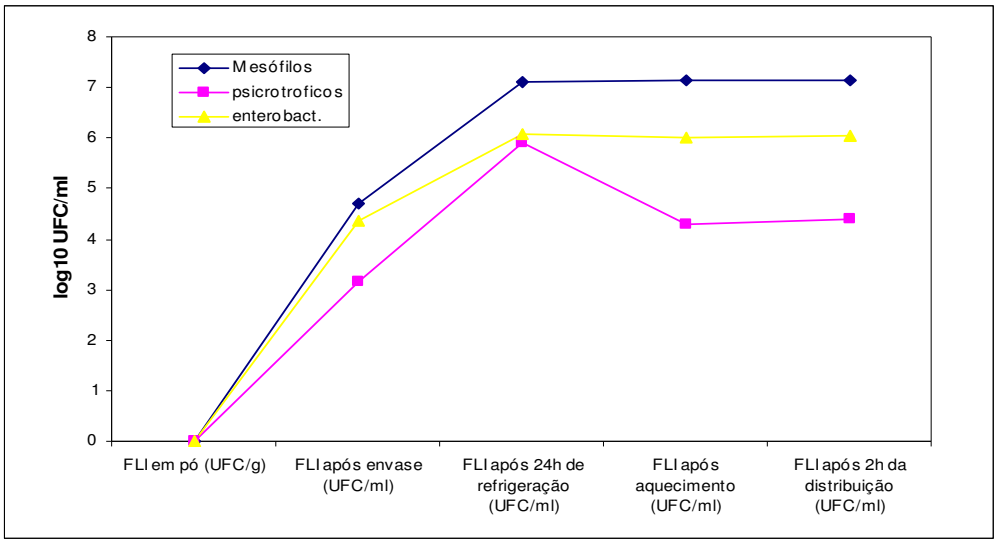


Figura 1: Evolução das contagens de microrganismos indicadores nas amostras da FLI em pó e reconstituída, obtidas pelo método do plaqueamento direto

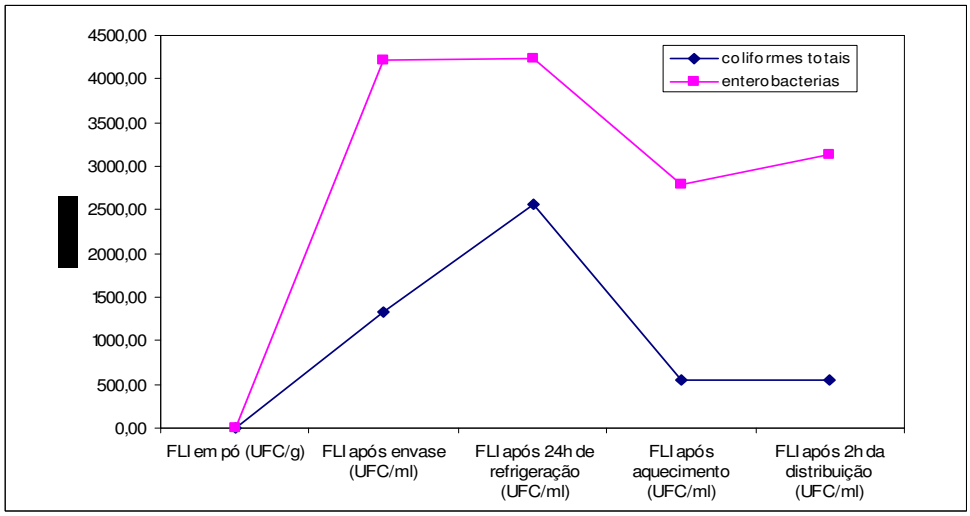


Figura 2: Evolução das contagens de microrganismos indicadores nas amostras da FLI em pó e reconstituída, obtidas pelo método do Número Mais Provável

Analisando as figuras pode-se observar que a FLI em pó não apresentou contagens para nenhum dos microrganismos indicadores analisados, mostrando-se em condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Para as amostras da FLI reconstituída, as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos foram as que mais aumentaram durante as etapas pelas quais passou a FLI reconstituída até ser consumida. Cada ponto dos gráficos corresponde à média aritmética dos valores obtidos em todos os lotes.

Em ambas as figuras pode-se observar que apesar de não ser detectada contagem para nenhum dos microrganismos indicadores analisados na FLI em pó, todas as amostras da FLI após o envase apresentaram contagem, na maioria das vezes elevada, para todos os microrganismos indicadores, o que mostra que a contaminação ocorreu durante a reconstituição da FLI em pó ou durante o envase das porções.

As figuras também mostram que as contagens aumentaram após o período de estocagem sob refrigeração, para todos os microrganismos indicadores, o que mostra uma possível falha no controle da temperatura do refrigerador.

Em geral, para os indicadores do grupo das enterobactérias, dos coliformes totais e dos psicrotróficos, é possível observar um declínio na contagem após a etapa de aquecimento em banho-maria, que é mais acentuado para o grupo dos psicrotróficos por serem mais sensíveis ao aumento de temperatura, e para os coliformes e as enterobactérias analisadas pelo método do Número Mais Provável. O mesmo não se observa com o indicador do grupo dos mesófilos. Apesar de ter ocorrido esse declínio nas contagens, o binômio tempo e temperatura desse banho não foi suficiente para reduzir as contagens até o limite estabelecido pela RDCnº12/2001 para todas as amostras, como discutido anteriormente.

5.2.5 Contagem de *Bacillus cereus*

A análise de *B. cereus* foi realizada para os dez pontos amostrais (definidos no APÊNDICE A) de cada um dos seis lotes, mas nenhuma amostra apresentou contagem desse microrganismo, mesmo nas maiores concentrações inoculadas. Os limites de detecção obtidos foram: < 1 UFC/ml para as amostras da FLI reconstituída e para os utensílios; < 10 UFC/g para a FLI em pó; < 0,05 UFC/ml para o liquidificador. Também não foi detectada a presença de

esporos de *B. cereus* na FLI em pó, apesar da considerável incidência deste microrganismo em leite em pó e fórmulas lácteas em pó, como mostrado no item 3.6.1 deste trabalho.

Considerando o limite estabelecido pela RDC nº12/2001 de 100 UFC/ml de amostra indicativa para *B. cereus*, pode-se dizer que todas as amostras da FLI estão de acordo com a legislação vigente para esse microrganismo.

Rowan et al. (1997) isolaram *B. cereus* de 17% de 100 amostras de fórmula infantil reconstituída, com uma contagem máxima de 4,8 x 10^2 UFC/ml. Procurando avaliar a incidência de *B. cereus* em fórmulas infantis em pó, Becker et al. (1994) analisaram 261 amostras coletadas de 17 países e encontraram contagem de *B. cereus* entre 0,3 – 600 UFC/g do alimento em 54 % das amostras. Este microrg6anismo também foi encontrado por Soares (2004) que estudando a contaminação ambiental de um restaurante institucional, isolou o microrganismo em 84,4 % das amostras do ar ambiente e em 44,8% das amostras de superfícies.

Pelos estudos já realizados é possível verificar que geralmente o *B. cereus* não está presente no alimento em grandes quantidades, o que dificulta sua detecção através das técnicas tradicionais de análise microbiológica.

5.2.6 Detecção e identificação de *Salmonella*

Nenhuma colônia dos meios de isolamento apresentou resultado positivo para os testes com TSI e LIA. Algumas colônias que foram isoladas da amostra de FLI após 24h de refrigeração do lote 3 e da amostra de FLI após o envase do lote 4, apresentaram resultado positivo apenas para o teste com LIA. Estes isolados foram submetidos a testes bioquímicos através do kit de testes rápidos APE 20E (bioMérieux) para a confirmação de gênero, porém, nenhum dos isolados foi identificado como pertencente ao gênero *Salmonella*.

Considerando o padrão estabelecido pela legislação de ausência de *Salmonella* em 25 g/mL do alimento, pode-se dizer que todas as amostras atenderam ao padrão estabelecido para esse microrganismo.

Também não foi isolada *Salmonella* de fórmula nfantil nos trabalhos realizados por Santos e Tondo (2000), Santos (2006), Almeida et al. (1999), Iversen e Forsythe (2003) e Estuningsih et al. (2006).

5.2.7 Detecção e identificação de *Staphylococcus*

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram isolados das amostras do produto reconstituído, nas suas diferentes etapas de preparo, nos lotes 3, 4 e 5, como pode ser visualizado na **Tabela 12.** Tanto as amostras da FLI reconstituída dos lotes 1,2 e 6, quanto as amostras da FLI em pó de todos os lotes analisados, não apresentaram crescimento em ágar BP.

Todas as colônias isoladas do ágar BP apresentaram morfologia de cocos agrupados em forma de cachos de uva, Gram positivos, com atividade positiva para catalase e com sensibilidade a furazolidona, porém nenhuma colônia apresentou atividade positiva para a reação de coagulase. Assim nenhuma amostra foi positiva para o grupo de estafilococos coagulase positiva, estando todas de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001) para este grupo de microrganismos.

Todos os isolados de estafilococos coagulase negativa foram identificados através do kit API Staph (bioMérieux). A **Tabela 12** apresenta os resultados com identificação superior a 90% de confiança.

Tabela 12: Identificação bioquímica de isolados de estafilococos coagulase negativa

Lote de experimentação	Fonte	Resultado API staph	Testes complementares		
			Gram	Catalase	Sensib. furazolidona
3	FLI após 24h de refrigeração	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
4	FLI após envase	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
4	FLI após 24h de refrigeração	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
4	FLI após aquecimento	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
4	FLI após 2h da distribuição	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
5	FLI após envase	*Staphylococcus sciuri*	cocos +	+	+
5	FLI após 24h de refrigeração	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
5	FLI após aquecimento	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+
5	FLI após 2h de distribuição	*Staphylococcus warneri*	cocos +	+	+

Apesar de todos os isolados apresentarem características comuns ao *S. aureus,* como a morfologia de cocos em forma de cachos de uva, Gram positivos, atividade de catalase positivo e sensibilidade a furazolidona, nenhum dos isolados foi identificado como tal.

Com exceção de uma amostra de FLI após o envase, coletada no 5º lote de experimentação, todas as demais amostras apresentaram como isolado o microrganismo *S. warneri.* A espécie isolada da amostra de FLI após envase do lote 5 foi *S. sciuri,* com 91% de certeza.

Apesar de todas as amostras atenderem aos padrões estabelecidos pela resolução vigente para a presença de estafilococos coagulase positiva, não é possível afirmar que a FLI estudada é um alimento seguro, pois as espécies de estafilococos coagulase negativa são consideradas como microorganismos oportunistas (CHOU e CHEN, 1997) e são frequentemente isoladas de infecções hospitalares, como mostrado por Cunha et al. (2006b) que isolaram estafilococos coagulase negativa de 54 dos 107 recém nascidos hospitalizados em uma unidade neonatal de Botucatu.

Um estudo conduzido pelo "Center for Disease Control and Prevention" (Atlanta) também isolou estafilococos coagulase negativa de recém nascidos com quadro de infecção hospitalar, durante os anos de 1986 a 1994 (GAYNES et al., 1996).

Analisando 88 amostras de alimentos, Cunha et al. (2006a) encontraram estafilococos coagulase negativa em 22,7% das amostras, com uma contagem entre 10^2 e 10^6 UFC/ml de amostra, e concluíram em seu estudo que os estafilococos coagulase negativa não devem ser ignorados quanto à sua capacidade toxigênica.

As espécies *S. warneri* e *S. sciuri* isoladas neste estudo não são produtoras de coagulase, mas podem apresentar a capacidade de produzir enterotoxinas, como mostrado por Valle et al. (1990) e Chou e Chen (1997). Em um estudo realizado por Oliveira (1999) cepas de *S. warneri* e *S. chromogenes* foram experimentalmente inoculadas em presunto cozido e creme de confeitaria e produziram enterotoxina estafilocócica C e D.

Das 20 espécies de estafilococos coagulase negativa encontradas por Cunha et al. (2006a) em seu estudo com amostras de diferentes alimentos, 20% delas eram de *S. warneri*. Em um estudo realizado com manipuladores de 50 restaurantes da cidade de Kuwait, Udo et al. (1999) isolaram o microorganismo *S. warneri* de 20,3 % das mãos analisadas. Esses estudos mostram que o microrganismo *S. warneri* é encontrado frequentemente nos alimentos, podendo ser transmitido pelo manipulador através das mãos.

Assim, a contaminação da FLI com *S. warneri* pode ter ocorrido pelo próprio manipulador já durante a reconstituição da FLI em pó, visto que a primeira amostra que apresentou este microrganismo foi a FLI após o envase. Considerando a capacidade deste microrganismo em produzir enterotoxina, destaca-se aqui a importância de estabelecer um POP para a higienização das mãos e treinar os manipuladores a fim de reduzir este perigo.

O microrganismo *S. sciuri* já foi isolado do trato urinário de humanos e de genitália feminina (STEPANOVI et al., 2006). Esta bactéria coloniza a pele e as mucosas de animais domésticos e de aves e as principais fontes de contaminação deste microrganismo são os animais, os alimentos de origem animal e o ambiente, principalmente o hospitalar (STEPANOVI et al., 2006; DAKI et al., 2005). O *S. sciuri* não é um patógeno humano comum, mas cerca de 20% das cepas conhecidas são capazes de produzir toxina (DAKI et.al., 2005). O trabalho realizado por

Valle et al. (1990) mostrou que cerca de 20% das cepas de *S. sciuri* estudadas apresentaram produção de enterotoxina.

5.2.8 Identificação de enterobactérias

Os resultados da identificação dos isolados de enterobactérias estão apresentados na **Tabela 13.**

Tabela 13: Identificação bioquímica de enterobactérias isoladas do equipamento e da FLI reconstituída

Lote de experimentação	Fonte	Resultado API 20 E
1	FLI após 24h de refrigeração	*Enterobacter asburiae*
1	FLI após aquecimento	*Enterobacter asburiae*
2	FLI após envase	*Enterobacter asburiae*
2	FLI após 24h de Refrigeração	*Enterobacter asburiae*
2	FLI após aquecimento	*Enterobacter asburiae*
2	FLI após 2h da distribuição	*Enterobacter asburiae*
3	FLI após 24h de refrigeração	*Enterobacter asburiae*
3	FLI após aquecimento	*Enterobacter asburiae*
4	FLI após envase	*Enterobacter cloacae*
4	FLI após 24h de refrigeração	*Enterobacter cloacae*
4	FLI após aquecimento	*Enterobacter cloacae*
5	FLI após envase	*Enterobacter cloacae*
5	FLI após 24h de refrigeração	*Enterobacter cloacae*
6	Liquidificador	*Enterobacter cloacae*
6	FLI após envase	*Enterobacter cloacae*
6	FLI após 24h de refrigeração	*Enterobacter cloacae*
6	FLI após aquecimento	*Enterobacter cloacae*
6	FLI após 2h de distribuição	*Enterobacter cloacae*

Com uma taxa de identificação acima de 80%, apenas duas espécies da família Enterobacteriaceae foram encontradas nos seis lotes analisados. Enquanto nos três primeiros lotes a única espécie encontrada foi *Enterobacter asburiae,* que esteve presente em todas as amostras da FLI reconstituídas, nos três últimos lotes a única espécie encontra foi *Enterobacter cloacae,* para todos os pontos amostrais analisados.

Bactérias do gênero *Enterobacter* têm sido consideradas importantes patógenos oportunistas nos últimos anos, mostrando-se resistentes aos antigos antibióticos e hábeis para adquirir resistência aos novos medicamentos. Por serem microrganismos patogênicos oportunistas, sua incidência como agentes causadores de doenças de origem hospitalar têm aumentado. Nem todas as espécies têm sido implicadas como causas de doenças em humanos. As espécies mais encontradas são *E. aerogenes, E. cloacae, E. agglomerans* e *E. sakazakii*. Dentre as espécies mais raramente relacionadas com doenças em humanos encontra-se *E. asburiae* A infecção causada por *Enterobacter ssp* pode ter diversas origens, inclusive a alimentação. Podem ser encontrados nas fezes do homem e de outros animais, na água, nas plantas, nos insetos e em produtos derivados de leite (SANDERS e SANDERS, 1997).

Sabendo-se que as espécies *E. cloacae* e *E. asburiae*, encontradas em todas as amostras analisadas da FLI reconstituída, são patógenos oportunistas, torna-se preocupante as elevadas contagens de enterobactérias encontradas neste estudo, uma vez que esse alimento será consumido por crianças com o estado de saúde debilitado. Como estes microrganismos não foram isolados na FLI em pó, conclui-se que a contaminação ocorreu durante sua reconstituição, podendo ter sido veiculada pelo manipulador e pelo liquidificador, de onde se isolou *E. cloacae*.

Segundo Sanders e Sanders (1997), *E. cloacae* é uma das espécies mais comuns de *Enterobacter* que causam infecção hospitalar, por isso sua presença em ambiente hospitalar é preocupante. Tem como principal reservatório o trato gastrointestinal de adultos saudáveis e os tratos urinário e respiratório de pessoas doentes e é um dos principais agentes de infecção hospitalar em unidades neonatal (TALON et al., 2004).

Partindo de três casos de bacteremia causada por *E. cloacae* em uma unidade neonatal de um hospital na França, em 2002, Talon et al. (2004) realizaram uma avaliação epidemiológica no estabelecimento durante quatro meses, a fim de verificar a incidência deste patógeno nos

pacientes ali internados. No final do estudo verificaram que 51 dos 159 pacientes avaliados estavam colonizados por *E. cloacae*, sendo 38 da unidade para prematuros e 13 da UTI pediátrica.

Analisando fórmulas infantis em pó, Santos (2006) encontrou contaminação por enterobactérias em 21 de 98 amostras analisadas, e as espécies identificadas foram *Pantoea sp, Leclercia adecarboxylata, Klebsiella oxytoca, Pasteurella pneumotropical, Serratia rubidaea e Serratia plymulthica.* Um estudo realizado por Estuningsih et al. (2006) também avaliou a presença de enterobactérias em fórmula infantil de cinco marcas diferentes e das 74 amostras analisadas, 35 apresentaram resultado positivo para a presença de enterobactérias. Dessas 35 amostras, dez apresentaram isolados identificados como *Enterobacter sakazakii* e oito como *E. cloacae.* As demais espécies isoladas neste estudo foram: *Pantoea sp, Escherichia hermanii, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter sp* e *Serratia sp.*

5.2.9 Avaliação microbiológica do ar

Não houve crescimento dos microrganismos analisados para as amostras de ar (*B. cereus*, enterobactérias e microrganismos mesófilos totais) em nenhum dos lotes estudados. A baixa circulação do ar e a pequena dimensão da sala de preparo (onde as amostras foram coletadas) podem ter subestimado os resultados obtidos com a metodologia de sedimentação.

Petrus (2004) estima que durante um período normal de processamento em uma indústria beneficiadora de leite fluido, as contagens de microrganismos presentes no ar atingem um valor ao redor de 10^3 UFC/m^3 de ar. Avaliando a qualidade microbiológica do ar de plantas de embalagem de leite, Heldman (1974) encontrou uma contagem média de aeróbios mesófilos totais de 2,8 x 10^3 UFC/m^3 de ar amostrado.

Em ambientes menores que o da indústria e mais controlados como o lactário e as cozinhas hospitalares, a quantidade de microrganismos presentes no ar tende a diminuir. Procurando avaliar a qualidade microbiológica do ambiente e de alimentos de um serviço de oncologia de um hospital em Costa Rica, Jiménez et al. (2004) analisaram 16 amostras de ar e obtiveram crescimento bacteriano positivo em 94% das amostras com uma contagem média de 13 UFC/15 minutos de exposição. Neste mesmo estudo, nenhuma amostra de ar apresentou contagem para coliformes totais, coliformes fecais, *Pseudomonas* e *Staphylococcus,* apesar de ter

sido verificado que 77% das amostras de alimentos preparados neste ambiente apresentaram contagem positiva para pelo menos um destes microrganismos analisados.

Não existem no Brasil padrões microbiológicos para determinar a qualidade do ar de um estabelecimento como o lactário. Considerando-se a fragilidade dos pacientes que recebem os alimentos preparados neste estabelecimento, é necessário que o ar que entra em contato direto com o alimento esteja isento de microrganismos patogênicos e apresente uma contagem pequena de microrganismos deteriorantes.

Na falta de padrões para avaliar a qualidade do ar de ambientes como o lactário e cozinhas hospitalares, é válida a utilização da classificação proposta pela NASA que estabelece: salas limpas e ambiente microbiologicamente controlados ISO classe 5, classe 7 e classe 8, devem apresentar no máximo 3,5; 17,7 e 88,3 microrganismos por metro cúbico de ar, respectivamente (PETRUS, 2004). Porém, para classificar um ambiente segundo esses padrões é necessário utilizar o método de impactação na coleta das amostras, pois os limites são expressos em metros cúbicos de ar.

Apesar do método de sedimentação ser pouco eficiente na avaliação da qualidade do ar de um ambiente, ele reproduz a real deposição dos microrganismos presente no ar daquele ambiente durante o tempo em que o alimento fica exposto. Comparando os resultados obtidos neste estudo com os obtidos por Jiménez et al. (2004) pode-se concluir que o ar do lactário em estudo apresentou boas condições microbiológicas, uma vez que não apresentou contagem para nenhum dos microrganismos analisados.

5.3 Avaliação da temperatura de refrigeração da FLI reconstituída

A temperatura de refrigeração foi medida a cada 30 minutos durante as 24h de armazenamento da FLI reconstituída, tanto no interior da mamadeira quanto na área interna do refrigerador e a curva de variação da temperatura está representada na **Figura 3**.

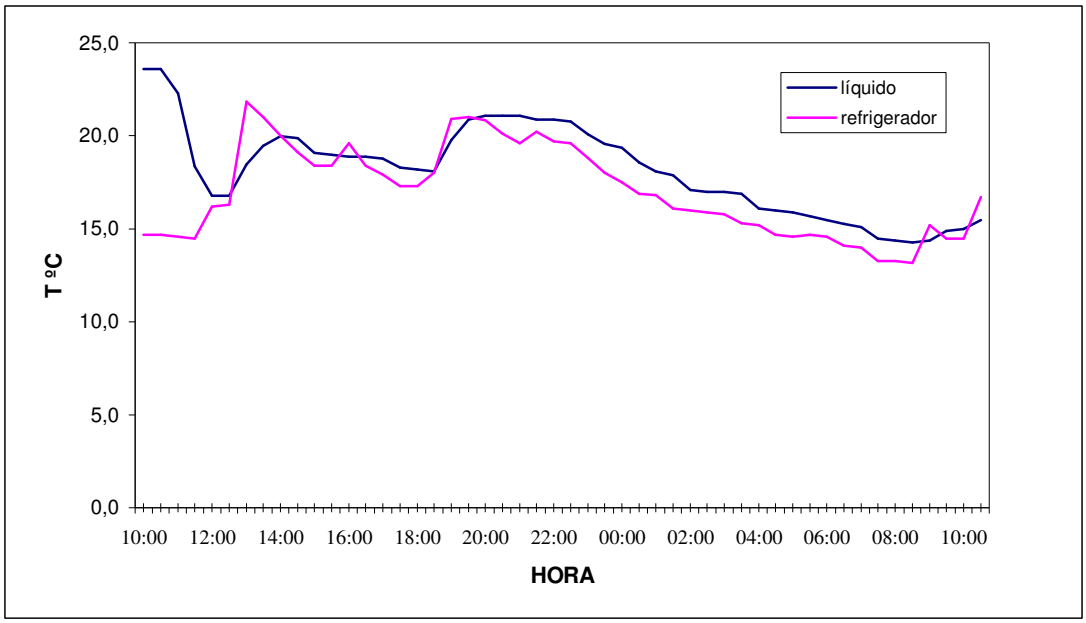


Figura 3: Variação da temperatura do líquido e da área interna do refrigerador durante o armazenamento da FLI reconstituída

Através da **Figura 3** pode-se verificar que as temperaturas, tanto do líquido quanto do refrigerador, permaneceram entre 10 e 25 ºC durante as 24h de armazenamento. Os menores valores registrados foram de 14,3ºC para o líquido e 13,2ºC para a área interna do refrigerador. Essas temperaturas foram registradas às 8:30h da manhã, horário em que se iniciava as atividades de preparo das FLIs. O maior valor registrado para o líquido foi de 23,6ºC, que ocorreu com 30 minutos de armazenamento, e para a área interna do refrigerador foi de 21,8ºC registrado às 13h.

No período entre 22h e 8h é possível verificar um declínio contínuo da temperatura tanto do líquido quanto da área interna do refrigerador. Isso se deve, provavelmente, à diminuição da temperatura ambiente e da quantidade de vezes que as portas do refrigerador são abertas, pois nesse período não ocorre preparo de FLI, apenas distribuição de algumas porções armazenadas no refrigerador.

O refrigerador em estudo é do tipo “pass-through” de aço inoxidável, com 8 portas em cada face. Essas portas são abertas durante todo o dia e mais frequentemente durante o preparo e porcionamento da FLI, que geralmente ocorre das 8:30h, horário em que as temperaturas começam a aumentar, até as 15h. A sala de preparo não conta com nenhum sistema de circulação

ou refrigeração do ar ambiente o que dificulta a manutenção de baixas temperaturas no refrigerador.

Pode-se verificar então que a FLI reconstituída fica armazenada numa faixa de temperatura de risco, permitindo o desenvolvimento dos microrganismos que estiverem presentes, como pode ser observado nos resultados apresentados na **Tabela 6**. Esse estudo mostra também que a etapa não está sob controle e é um ponto crítico para a qualidade do produto final devido às elevadas temperaturas observadas durante as 24h de armazenamento sob refrigeração.

Como a única forma de conservação da formulação reconstituída em estudo é a refrigeração e não existe nenhum tratamento térmico que garanta a eliminação de microrganismos patogênicos antes do consumo, a etapa de refrigeração é crítica para a segurança do produto, sendo de extrema importância que a temperatura seja controlada e monitorada, devendo estar abaixo de 5ºC até a validade do produto (24h) a fim de minimizar riscos de desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

Para corrigir esta falha é necessário primeiramente realizar a manutenção do equipamento para melhorar sua eficiência e a regulação da temperatura ao redor de 1ºC para permitir um resfriamento mais rápido das porções. A refrigeração do ar ambiente da sala de preparo e da sala de distribuição também é de extrema importância na manutenção de baixas temperaturas dentro do refrigerador, uma vez que as portas precisam ser abertas durante as 24h de armazenamento.

É ideal que o lactário possua um refrigerador exclusivo para o armazenamento das FLIs reconstituídas e envasadas nas mamadeiras, a fim de diminuir o número de vezes que as portas são abertas, mas na impossibilidade de tal adequação, um rearranjo na disposição das porções dentro do refrigerador também pode ajudar a manter as baixas temperaturas. As jarras contendo a FLI reconstituída e a água estéril utilizada no preparo da FLI podem ser dispostas em uma extremidade do refrigerador (esquerda, por exemplo) e as FLIs já porcionadas na outra extremidade e na parte de baixo onde se concentra o ar mais frio.

Rowan et al. (1997) verificaram que uma amostra de FLI em pó com contagem de *B. cereus* ao redor de 10^2 esporos/g, apresentou uma contagem de 1,3 x 10^3 UFC/ml, para o mesmo microrganismo, quando a FLI foi reconstituída e armazenada a 25ºC durante 14h. O mesmo fenômeno foi observado por Becker et al. (1994), que obtiveram um aumento na contagem de *B.*

cereus em até 5 ciclos logaritmos, quando a FLI foi reconstituída e armazenada a 27ºC durante 9h.

Procurando determinar a faixa de temperatura de crescimento de *E. sakazakii* em FLI reconstituída, Nazarowec-White e Farber (1997b) verificaram que a faixa de temperatura mínima de crescimento para este microrganismo é de 5,5-8ºC, e encontraram tempos médios de geração de 40 min, quando a FLI reconstituída foi armazenada a 23ºC, e de 4,98 h, quando armazenada a 10ºC. Esses resultados mostram que a faixa de temperatura de armazenamento da FLI reconstituída observada na **Figura 3**, é muito favorável para o crescimento de E. sakazakii.

5.4 Identificação de perigos e de pontos críticos de controle

A elaboração da lista referente aos perigos microbiológicos, apresentado no APÊNDICE C, foi baseada na revisão bibliográfica sobre a microbiologia de leite e produtos lácteos (item 3.4) e nos resultados das análises microbiológicas realizadas. O formulário referente aos PCCs está apresentado no APÊNDICE D e foi elaborado com base no fluxograma validado (APÊNDICE A) e nos perigos biológicos estabelecidos no APÊNDICE C.

Com a lista e o formulário prontos foi possível propor um plano APPCC para a FLI reconstituída não aquecida para lactentes (APÊNDICE E). Porém, a aplicação deste plano só será possível se o estabelecimento se adequar aos pré-requisitos do sistema APPCC como a implantação dos POP e o efetivo cumprimento dos requisitos higiênico-sanitários estabelecidos no Manual de Boas Práticas.

Os pontos identificados por esta análise como PCCs foram as seguintes etapas do fluxograma: aquisição da matéria-prima; armazenamento sob refrigeração e aquecimento para distribuição. Essas etapas do fluxograma também já foram indicadas como PCCs por outros autores. Ao avaliar as condições higiênico-sanitárias de lactários de quatro hospitais em Salvador/BA, a fim de propor a implantação do sistema APPCC, Almeida et al. (1999) determinaram como pontos críticos de controle as seguintes etapas do fluxograma de preparo: reconstituição da fórmula infantil em pó, armazenamento sob refrigeração e aquecimento da fórmula infantil reconstituída (quando houver). Neste mesmo estudo, os autores mostraram que a implantação do sistema APPCC reduziu a 0% a incidência de coliformes totais e *S. aureus*, que antes da implantação do sistema era de 28% das amostras analisadas.

A implantação do sistema APPCC no preparo de dietas enterais em pó em um hospital público de Uberlândia/MG, mostrou que a proporção de 50% das amostras que antes se apresentaram adequadas para o consumo, aumentou para 97% após a implantação do sistema. (MUNIZ, 2005).

Analisando FLIs reconstituídas, Rowan et al. (1997) verificaram que os fatores que mais influenciam na quantidade de microrganismos no produto final são, o número inicial de microrganismos presentes e o tempo e a temperatura do armazenamento sob refrigeração, e indicaram a etapa de armazenamento sob refrigeração como um ponto crítico de controle.

Apesar das FLIs em pó das três marcas analisadas se mostrarem dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº12/2001 (BRASIL, 2001), esta matéria-prima é crítica para a qualidade do produto final, pois pode introduzir microrganismos patogênicos como a bactéria *E. sakazakii* e essa qualidade microbiológica só pode ser controlada pela indústria. Neste caso o lactário deve exigir da indústria uma qualidade assegurada de sua matéria-prima através do fornecimento de laudos que comprovem a qualidade microbiológica ou de documentos que comprovem a aplicação de um sistema preventivo de controle de qualidade como o APPCC na linha de produção da FLI em pó pela indústria. Assim, a etapa de aquisição da matéria-prima torna-se um ponto crítico que deve ser controlado para assegurar a qualidade do produto final (FLI reconstituída).

Os resultados das análises microbiológicas mostram que na etapa de armazenamento sob refrigeração pode ocorrer aumento na quantidade de microrganismos indicadores, como mostrado nas análises de microrganismos mesófilos e psicrotróficos totais, **Tabela 5** e **Tabela 6** respectivamente, nas quais as contagens aumentaram em até três ciclos logaritmos para as amostras de leite após 24h de refrigeração. Estas determinações confirmam a existência de perigos nesta etapa do fluxograma de preparo de FLI reconstituída não aquecida para lactentes, e a avaliação da temperatura de refrigeração (realizada no item 5.3) mostra que esta etapa pode e deve ser controlada para evitar que estes perigos ocorram.

Os resultados mostram também que a etapa de aquecimento para a distribuição é uma etapa que pode diminuir a ocorrência de um perigo, como observado na análise de microrganismos psicrotróficos, **Tabela 6**, na qual pode-se observar que o aquecimento reduziu

em até quatro ciclos logaritmos a contagem deste grupo de microrganismos. A diminuição na contagem de enterobactérias e coliformes totais, melhor visualizada na **Figura 2,** também mostra o efeito benéfico desta etapa de aquecimento. Como não existe no fluxograma uma etapa seguinte ao aquecimento para distribuição, esta etapa pode e deve ser controlada para reduzir os riscos microbiológicos do produto final.

6 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho pode-se concluir que:

- A falta da aplicação efetiva dos pré-requisitos higiênico-sanitários durante o preparo da FLI para lactentes, resulta em um produto microbiologicamente inseguro para crianças em estado de saúde debilitado, e a contagem de microrganismos mesófilos totais e de enterobactérias pode ser um bom indicador da segurança microbiológica deste tipo de produto;

- As elevadas contagens de microrganismos indicadores nas FLIs reconstituídas, prontas para o consumo, obtidas de FLI em pó microbiologicamente seguras, mostram que a contaminação ocorre durante a reconstituição da FLI, devido principalmente às falhas na higienização de equipamentos e utensílios e às falhas higiênico-sanitárias nas atividades dos manipuladores, e que essas contagens podem aumentar se a temperatura de armazenamento da FLI reconstituída não permanecer abaixo de 5ºC;

- A falta de um sistema preventivo de controle de qualidade em um estabelecimento como o lactário pode colocar em risco a saúde das crianças que irão consumir os alimentos ali preparados;

- Para que um sistema preventivo de controle de qualidade seja implantado em qualquer estabelecimento que manipule alimentos é necessário que este se adeque aos pré-requisitos do sistema APPCC como: a implantação dos POP; o seguimento efetivo dos requisitos higiênicos estabelecidos no Manual de Boas Práticas e o treinamento contínuo dos seus manipuladores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, J. V.; SMET, F.; MUYLDERMANS, G.;BOLGATEF, A.; LAUWERS, S. Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 293-297, 2001.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. 2.ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 479p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Pediatria: Prevenção e controle de infecção hospitalar**. Brasília. Editora Anvisa, 2006a. 117p. (Série A. Normas e manuais técnicos).

_____. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC**, 2006b. Disponível em www.anvisa.gov.br/alimentos/appcc.htm. Acesso em novembro de 2006b.

AL-DAGAL, M.; FUNG, D.Y.C. Aeromicrobiology – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.5, p.333-340, 1990.

ALMEIDA, R.C.C.; MATOS, C.O.; ALMEIDA, P.F. Implementation of a HACCP system for on-site hospital preparation of infant formula. **Food Control**. v.10, p.181-197, 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 3º ed. Washington, APHA, 1992, 1219p.

_____. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4º ed. Washington, APHA, 2001, 676p.

ANDERSSON, A.; RÔNNER, U.; GRANUM, P.E.. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* ?. **International Journal of Food Microbiology**. v.28, p. 145-155, 1995.

ANDREWS, H.W.; FLOWERS, R.S; SILIKERS, J.; BAILEY, S.J. Salmonella. In:.APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA, Chap.37 ,p.357-380, 2001

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR14900. **Sistema de Gestão da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle** - Segurança de Alimentos. Norma Técnica. Setembro, 2002.

BALABAN, N. e RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology.** v.61, n.1, p. 1-10, 2000.

BASTON, L.M.L. **Esporos de *Bacillus cereus*: indicadores biológicos na higienização de mamadeiras em lactário**. 1997. 154p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

BECKER, H.; SCHALLER, G.; VON WIESE, W.; TERPLAN, G. Bacillus cereus in infant foods and dried milk products. **Journal of Food Microbiology**. v.23, n.1, p.1-15, setembro, 1994.

BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In:.APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA,.Chap.32,p.311-316, 2001.

BIERLING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N.C.; JONSDOTTIR, K.E.; LUDVIGSSON, P.; STEINGRIMSSON, 0. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal of Clinical Microbiology**. v.29, p.2054 – 2056, 1989.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº216 de 15 de setembro de 2004, dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de setembro de 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis. Acesso em: março de 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº275 de 21 de outubro de 2002, dispõe sobre Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de outubro 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis. Acesso em: agosto de 2006.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº50 de 21 de fevereiro de 2002, dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de março de 2002. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis. Acesso em: janeiro de 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.htm. Acesso em: abril de 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria nº46 de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal - SIF, de acordo com o Manual Genérico de Procedimentos, anexo a esta Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de março de 1998. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao. Acesso em: junho de 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº1428 de 26 de novembro de 1993. Estabelece regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de dezembro de 1993. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis. Acesso em: dezembro de 2006.

BRUM, J.V.F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba – PR.** 2004. 107 p. Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CEMPIRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinary Medicine**. v.47, n.8, p.227-233, Czech, 2002.

CHAMBERS, J.V.; NELSON, P.E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2ºed. Washington, 1993, 257p..

CHOU, C.; CHEN, L. Enterotoxin production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase-negative strain. **Journal of Food Protection**. v.60, n.8, p.923-927, 1997.

CHRISTIANSSON, A.; NAIDU,A.S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETTERSSON, H.E. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, n.10, p.2595-2600, oct. 1989.

CLARK, N.C.; HILL, B.C.; O'HARA, C.M.; STEINGRIMSSON, 0.; COOKSEY, R.C. Epidemiologic typing of *Enterobater sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v.13, p.467-472, 1990.

CLARK, W.S.J. Concentrated and Dry Milks and Wheys. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2º Edição, New York, 2001, cap. 3, p. 77-91.

COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). Regulamento Nº 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, 22 de dezembro de 2005.

COSTA, F.N.; OLIVEIRA, E.M.; BORGES, R.G. Ocorrência da bactéria *Bacillus cereus* em amostras de leite em pó obtidas no comércio varejista da cidade de São Luis, MA. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.121, p.104-107, jun.2004.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; JUNIOR, J.P.A. Detecção de genes de enterotoxinas em estafilococos coagulase-negativa isolados de alimentos. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.37, n.01, São Paulo, jan./mar. 2006a.

CUNHA, M.L.R.S.; RUGOLO, L.M.S.S.; LOPES, C.A.M. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.101, n.6, Rio de Janeiro, set. 2006b.

DAKI, I.; VUKOVI, D.; STEPAMOVI, S.; HAUSCHILD, T.; JEZEK, P.; PETRÁS, P.; MORRISON, D. Survey of Genes Encoding Staphylococcal Enterotoxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Exfoliative Toxins in Members of the *Staphylococcus sciuri* Group. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.9, p. 4875-4876, september 2005.

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J.F.. Microbiological Monitoring of the Food Processing Enviroment. In: .APHA (American Public Health Association).

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4 º ed. Washington: APHA, Chap.3, p.25-36, 2001

ESTUNINGSIH, S.; KRESS, C.; HASSAN, A.A.; AKINEDEN, O.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant **formula** manufactured in Indonesia and Malaysia. **Journal of Food Protection. v.**69, n.12, p.3013-3017, dez. 2006.

FAO/OMS, Grupo de Trabalho. **Leite em pó infantil NÃO é estéril.** Reunião de 2-5 de fevereiro de 2004, Genebra. Disponível em www.aleitamento.med.br. Acesso em fevereiro de 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Tradução: M. WEINHEIMER e S. W. ANDREATTA. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2002. Tradução de The microbiology of safe food.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo. Editora Atheneu, 2003, 182 p.

GAUR, A.H.M.D.; SHENEP, J.L.M.D. The expanding spectrum of diseases caused by *Bacillus cereus.* **Pediatric Infect Disease Journal.** v.20, p. 533-534, 2001

GAYNES, R.P.; EDWARDS, J.R.; JARVIS, W.R.; CULVER, D.H.; TOLSON, J.S.; MARTONE, W.J. Nosocomial infection among neonates in high-resk nurseries in the United States. **Pediatrics**. v.98, p.357-361, 1996.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo, 2003, p. 215-220.

GRANUM, P.E. Bacillus cereus and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.61S-66S, Syposium Supplement 1994.

GRIFFITHS, M.W. Toxin Production by Psychrotrophic *Bacillus* spp. Present in Milk. **Journal of Food Protection**. v.53, n.9, p.790-792, set. 1990.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, p.129-134, 2002.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw Milk and Fluid Milk Products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2º Edição, New York, 2001, cap. 3, p. 77-91.

HELDMAN, D.R.. Factors influencing air-borne contamination of foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, n.5, p.962-969, set./out. 1974.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in food**: Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional, v.5. 1998. 513p.

_____. **Microorganisms in Food:** Microbial Ecology of food commodities. Maryland: Aspen Publishers, v.6, p.541-544, 2000.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 5, p. 2793-2795, maio, 2005.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, a emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 11, p. 443-454, november, 2003.

JAY, J. M. Gastrenterite Estafilocócica. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489.
JIMÉNEZ, F.; GARRO, L.; RODRIGUEZ, E.; ZELEDÓN, Z.. Evaluación de la Presencia de Bacterias em Alimentos y en el Ambiente de una Seccion de Oncologia de un Hospital Nacional, San José, Costa Rica. **Arquitos Latinoamericanos de Nutricion**. v.54, n.3, p.303-307, 2004.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus*. *In*: SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore**: Williams & Wilkins, 1986, v. 2, Seção 12, p.1013-1019.

KORNACKI,J.L.; JOHNSON,J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: .APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA, Chap.8,p.69-82, 2001

LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii* **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2850-2857, 2004

MARSHALL, R.T.. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16 ed. Washington, 1992, p.271-297.

MASSEGUER, P.R.. Pseudomonas e Microrganismos Psicrotróficos. In: MASSEGUER, P.R.. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo:Livraria Varela, 2006, Cap. X, p.123-139.

MENDES, R.A.; AZEREDO, R.M.C.; COELHO, A.I.M.; OLIVEIRA, S.S.; COELHO, M.S.L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em Unidade de Alimentação e Nutrição**. Revista de Nutrição**. Campinas, v.17, n.2, abril/junho, 2004.

MEZOMO, I.F. **Lactário**. *In:* MEZOMO, I.F. Serviço de nutrição e dietética. São Paulo : União Social Camiliana, 1987. p.115-137.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In:.APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA,.Chap.7, p.63-68, 2001.

MUNIZ, C.K. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em dietas enterais manipuladas em Hospital Universitário Público do Brasil.** 2005. 56p. Dissertação (Mestre em Imunologia e Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J.M. *Enterobacter sakazakii*: a review **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.103-113, 1997a.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J.M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Journal of Food Protection**, v.60, n.3, p.226-230, 1997b.

OLIVEIRA, A.M**. Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos**. 1999. 102p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

PESSOA, G. V. A. Ocorrência de Bactérias Enteropatogênicas em São Paulo no Septênio 1970-76. III-Sorotipos de Shigella e de Escherichia coli da Gastrenterite Infantil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.38, p. 129-139, 1978.

PETRUS, R.R. **Adaptação e avaliação de desempenho de sistemas asséptico para leite fluido em garrafa plástica**. 2004. 219p. Tese (Doutor em Tecnologia de A limentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RANGASAMY, P.N.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Isolation and characterisation of Bacillus cereus in milk and dairy products manufactured in Victoria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, n.2, p.93-95, 1993.

ROWAN, N.J.; ANDERSON, J.G.; ANDERTON, A. Bacteriological quality of infant milk formulae examined under a variety of preparation and storage conditions. **Journal of Food Protection.** v.60, n.9,p.1089-1094, 1997.

SALLES, R.K.; GOULART, R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares**. Revista de Saúde Pública.** v.31, n.2, São Paulo, abril, 1997.

SANDERS, W.E.J.; SANDERS, C.C. *Enterobacter* ssp.: Pathogens Poised to Flourish at the Turn of the Century. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.2, p. 220-241, abr. 1997.

SANTAELLA, S.R.R. **Métodos de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) para formulações lácteas produzidas em lactários hospitalares**. 1997. 176p. Dissertação (Mestre em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SANTOS, R.F.S. **Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP**. 2006. 91p. Dissertação (Mestre em

Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SANTOS, M.I.S.; TONDO, E.C. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário. **Revista de Nutrição. v**.13, n.3, Campinas, set/dez, 2000.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". **Vigilância ativa das doenças transmitidas por alimentos** – Normas e instruções. São Paulo, 2002. 36p.

SCHOENI, J.L.;WONG, A.C.L. *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. **Journal of Food Protection**, v.68, n.3, p.636-648, 2005.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE); SERVIÇO NACIONAL DE APREDENDIZAGEM INDÚSTRIAL (SENAI); CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÍSTRIA (CNI) convênio. **Guia para elaboração do plano APPCC** – Série Qualidade e Segurança Alimentar. Brasília, 1999, 173p.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 5, nº 6, 2005. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. Acesso em: 08, maio, 2006.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM COMERCIAL (SENAC). **Boas Práticas e Sistema APPCC em Nutrição Hospitalar.** Programa Alimento Seguro – Mesa. Rio de Janeiro, 2004. 161p.

SESSA, E.; FURLANETTO, S.M.P. Condições bacteriológicas de amostras de leite de lactários obtidos em hospitais. **Revista de Microbiologia.** *v.*21, n.2, p.89-99, abr./jun. 1990

SILVA, J.E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 5 ed. São Paulo, 2002, 479p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.. **Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo, 1997, p.53-58.

SIMMONS, B.P.; GELFAND, M.S.; HAAS, M.; METTS, L.; FERGUSON, J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. **Infect Control Hospital Epidemiolical**. v.10, p. 398 - 401, 1989.

SOARES, C.M. ***Bacillus cereus*** **produtores de toxinas diarréicas em serviços de alimentação:** análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos . 2004. 134p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

STEPANOVI, S.; HAUSCHILD, T.; DAKI, I.; AL-DOORI, Z.; SVABIC-VLAHOVIC, M.; RANIN, L.; MORRISON, D. Evaluation of Phenotypic and Molecular Methods for Detection of Oxacillin Resistance in Members of the *Staphylococcus sciuri* Group. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.3, p. 934-937, mar. 2006.

TALON, D.; MENGET, P.; THOUVEREZ, M.; THIRIEZ, G.; GBAGUIDI, H.H.; FROMENTIN, C.; MULLER, A.; BERTRAND, X. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis**. Journal of Hospital infection**. v.57, n.2, p.119-125, jun. 2004.

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. **Journal of Applied Bacteriology**. v.76, n.6, p. 553–558, jun, 1994.

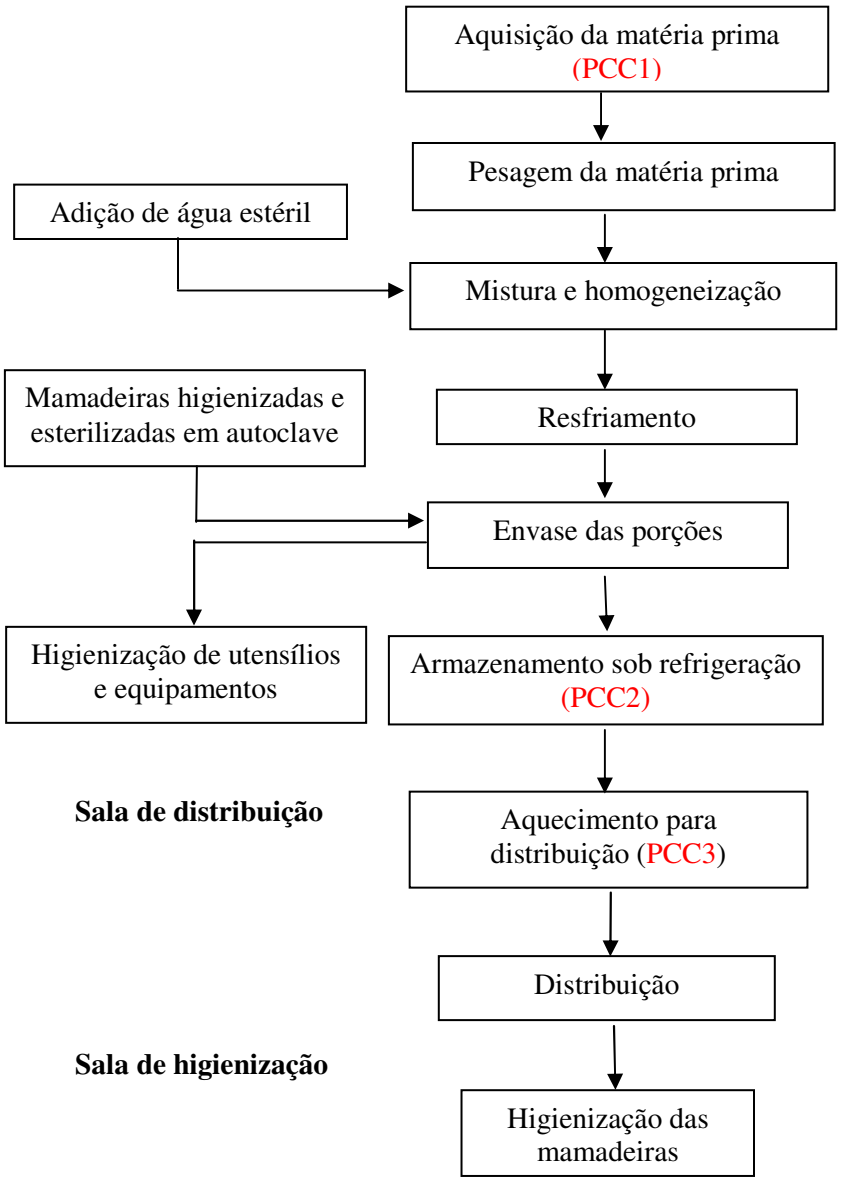
UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workes from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medicine Microbioogy**, v.48, p.819-823, 1999.

VALBUENA, E.; CASTRO, G.; LIMA, K.; ACOSTA, W.; BRINEZ, W.; TOVAR, A. Bacteriological quality of main pasteurized milk brands distributed in Maracaibo city, Venezuela. **Revista Cientifica – Faculdad de Ciencias Veterinarias**. v.14, n.1, p.59-67, jan-feb, 2004.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied Environmental Microbiology.** v.56, n.5, p.1323-1326, 1990.

WILLIAMS, R. E. O. Healtly carriage of *Staphylococcus aureus.* **Bacteriological Reviews**. v.**27.** p.56-71, 1963

APÊNDICE A - Fluxograma geral do preparo de fórmula láctea infantil reconstituída para lactentes



PA 1 – ar no preparo
PA 2 - liquidificador
PA 3 – jarra plástica
PA 4 – colher de sopa
PA 5 – FLI em pó

PA 6 – FLI após envase
PA 7 – ar no envase

PA 8 – FLI após 24h de refrigeração

PA 9 – FLI após aquecimento

PA 10 – FLI após 2h da distribuição

PA = Ponto Amostral
PCC = Ponto Crítico de Controle
FLI = Fórmula Láctea Infantil

Descrição do fluxograma

Aquisição da matéria-prima: atividade que envolve o pedido de compra e a inspeção no recebimento da matéria-prima constituída pela FLI em pó. Esta etapa é realizada no almoxarifado, fora do ambiente do lactário.

Pesagem da matéria prima: pesagem da FLI em pó realizada na sala de preparo em papel alumínio descartável, à temperatura ambiente.

Mistura e homogeneização: a FLI em pó é dissolvida em água filtrada e esterilizada, homogeneizada em liquidificador e colocada em jarra plástica para posterior distribuição.

Resfriamento: etapa na qual a FLI reconstituída fica armazenada sob refrigeração, onde a temperatura média deve ser de 5ºC, até a etapa de envase. A geladeira tem uma entrada para a sala de preparo e uma para a sala de distribuição

Envase das porções: a FLI reconstituída é envasada em porções unitárias, em mamadeiras esterilizadas no próprio estabelecimento ou em frascos de dieta enteral estéreis. Essas porções serão consumidas durante 24 h. O envase das porções despende 2 horas e estas são guardadas na geladeira apenas no final do processo. Problemas na manipulação durante o envase podem contaminar os bicos das mamadeiras já estéreis.

Armazenamento sob refrigeração: depois do envase as porções são armazenadas sob refrigeração (T. média = 5ºC) até o consumo.

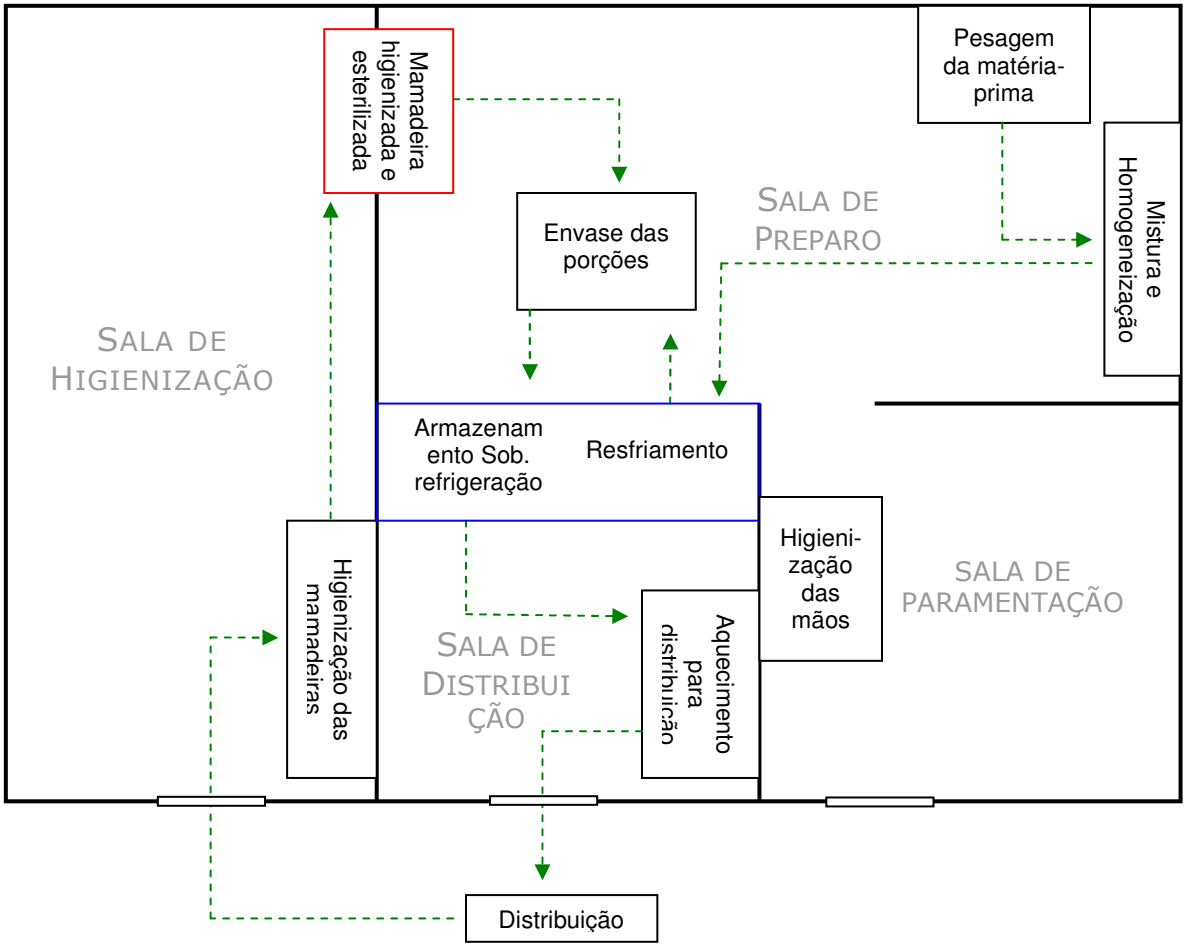
Higienização de utensílios e equipamentos: a higienização dos utensílios e do liquidificador é realizada após o envase e na mesma bancada de preparo, com detergente e esponja dupla face. Não foi observada a aplicação de álcool ou outro desinfetante no final da higienização.

Aquecimento para distribuição: antes da distribuição as porções são retiradas da geladeira e colocadas no banho-maria com temperatura média de 65ºC. O tempo de aquecimento não é constante, podendo variar de 15 a 30 minutos, o que torna esse ponto crítico para a qualidade microbiológica do produto final.

Distribuição: os manipuladores levam as porções nas mamadeiras até o quarto dos pacientes onde são, em seguida, administradas por um membro da família (geralmente a mãe) ou pela (o) enfermeira (o) responsável pelo paciente. Assim, não é possível controlar o tempo de espera para o consumo do alimento. Na distribuição, o manipulador recolhe as mamadeiras utilizadas na refeição anterior e as leva para sala de higienização.

Higienização das mamadeiras: as mamadeiras sujas, recolhidas dos quartos, são levadas para a área de higienização. As sobras são descartadas e as mamadeiras são desmontadas e colocadas de molho em solução de detergente para a lavagem. Após a higienização as mamadeiras são dispostas em cestos de alumínio e cobertas com pano limpo para que sejam esterilizadas em autoclave.

APÊNDICE B - Layout do lactário em estudo



APÊNDICE C - Análise dos perigos biológicos

Lista dos perigos biológicos relacionados com as matérias-primas e as etapas de processo

Matéria prima / Etapas do processo	Perigos Biológicos	Justificativa	Severidade	Risco	Medida Preventiva
FLI em pó (matéria prima)	*Bacillus cereus*	Bactéria formadora de esporo, podem resistir ao processo de secagem	A	B	Adquirir matéria prima de boa qualidade e exigir qualidade assegurada (certificado de qualidade microbiológica ou aplicação do sistema APPCC na indústria)
	Enterobacter sakazakii	Alta incidência em FLI em pó	A	A	
	enterotoxina estafilocócica	Utilização de leite de baixa qualidade, não é destruída na secagem	B	A	
Mistura e Homogeneização	*Salmonella spp e Escherichia coli*	Bactérias entéricas, podem ser transmitidas pelo manipulador	A	A	Aplicação dos requisitos higiênicos estabelecidos no Manual de Boas Práticas, principalmente em relação a higiene pessoal e dos utensílios e equipamentos
	B. cereus	Contaminante ambiental	A	B	
	Staphylococcus aureus	Transmitido pela manipulador	B	A	
	Enterobacter cloacae	Patógeno oportunista presente em ambiente hospitalar, presente no liquidificador	A	A	
Envase das porções	*B. cereus*	Contaminante ambiental e formador de esporo	A	B	Realizar a etapa o mais rápido possível, controlar a esterilização das mamadeiras e garantir higiene pessoal e dos utensílios
	Enterobacter cloacae	Patógeno oportunista presente em ambiente hospitalar	A	A	
Armazenamento sob refrigeração	*E. coli, B. cereus, E. sakazakii, E. cloacae*	Multiplicação se a temperatura não for inferior a 5ºC	A	A	Utilizar um refrigerador apenas para as FLIs reconstituídas e controlar a temperatura do refrigerador
Aquecimento para distribuição	esporos de *B. cereus*	Germinação de esporos presentes na FLI em pó	A	A	Controlar o tempo e a temperatura do aquecimento em banho-maria (60ºC / 40 min)
	E. coli, E. sakazakii e E. cloacae	Sobrevivem se o aquecimento não for suficiente	A	B	
Distribuição	*B. cereus, E. coli, E. sakazakii e E. cloacae*	Podem se multiplicar se o alimento não for consumido logo após o aquecimento	A	B	Recolher as mamadeiras dos quartos após 1 h da distribuição

A = alto risco
B = baixo risco
Fonte modelo: SEBRAE (1999)

APÊNDICE D – Formulário para a determinação dos pontos críticos de controle (PCC)

Produto: Fórmula láctea infantil reconstituída não aquecida para lactentes

Etapa do processo	**Perigos significativos (biológicos)**	**O perigo é controlado pelo programa de pré-requisitos?**	**Questão 1: Existem medidas preventivas para o perigo ?**	**Questão 2: Esta etapa elimina ou reduz o perigo a níveis aceitáveis?**	**Questão 3: O perigo pode aumentar a níveis inaceitáveis?**	**Questão 4: Uma etapa subseqüente eliminará ou reduzirá o perigo a níveis aceitáveis?**	**PCC/ PC**
Aquisição da matéria-prima (FLI em pó)	*Bacillus cereus, Enterobacter sakazakii e* enterotoxina estafilocócica	NÃO	SIM	SIM	-	-	PCC
Mistura e homogeneização	Bactérias patogênicas como *Salmonella sp* e *E. coli, E. cloacae, B. cereuse S. aureus*	SIM	-	-	-	-	PC
Envase das porções	*B. cereus e E. cloacae*	SIM	-	-	-	-	PC
Armazenamento sob refrigeração	*E. coli, B. cereus, E. sakazakii, E. cloacae*	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	PCC
Aquecimento para distribuição	*E. coli, E. sakazakii, E. cloacae* e esporos de *B. cereus*	NÃO	SIM	SIM	-	-	PCC
Distribuição	*B. cereus, E. coli, E. sakazakii e E. cloacae*	SIM	-	-	-	-	PC

PCC = Ponto Crítico de Controle
PC = Ponto Crítico
Fonte modelo: SEBRAE (1999)

APÊNDICE E - Resumo do plano APPCC para o preparo de fórmula láctea infantil reconstituída para lactentes

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Limite de Segurança	Monitorização	Ação Corretiva	Registros	Verificação
Aquisição da matéria-prima (FLI em pó)	PCC 1	*Bacillus cereus, Enterobacter sakazakii e* enterotoxina estafilocócica	Exigir qualidade assegurada (certificado de qualidade microbiológica ou aplicação do sistema APPCC na indústria)	-	-	**O que?** Certificado da matéria-prima **Como?** Visualmente **Quando?** Recebimento de cada lote **Quem?** Responsável pelo almoxarifado	Recusar o lote	Ficha de inspeção do recebimento	Aprovação do comprovante pelo nutricionista
Armazenamento sobre refrigeração	PCC 2	*E. coli, E. sakazakii, E. cloacae* e *B. cereus*	Utilizar um refrigerador apenas para as FLIs reconstituídas e controlar a temperatura do refrigerador	Máximo de 5ºC	4ºC	**O quê?** T.º C **Como?** Termômetro **Quando?** Todos os dias, manha, tarde e noite **Quem?** Manipulador responsável	Manutenção do refrigerador e aquecimento das FLIs reconstituídas por tempo mais prolongado	Planilha de registro da temperatura do refrigerador	Supervisão do preenchimento das planilhas pelo nutricionista e calibração do termômetro
Aquecimento para distribuição	PCC 3	*E. coli, E. sakazakii, E. cloacae* e esporos de *B. cereus*	Controlar a temperatura do produto e o tempo que ele deve permanecer na temperatura limite	Mínimo de 65ºC por 0,5h	65ºC / 40min	**O quê?** T.º C e tempo **Como?** Termômetro e cronômetro **Quando?** Em toda a etapa de aquecimento **Quem?** Manipulador responsável	Ajustar a Temperatura e repetir a etapa	Planilha de registro de aquecimento das FLIs reconstituídas	Supervisão do preenchimento das planilhas pelo nutricionista e calibração do termômetro

PCC = Ponto Crítico de Controle
FLI = Fórmula Láctea Infantil
Fonte modelo: SEBRAE (1999)

ANEXO A - Lista de verificação das boas práticas de manipulação em lactário

DATA:	TURNO:
RAZÃO SOCIAL:	
CGC/CNPJ:	
ENDEREÇO:	Nº:
BAIRRO:	CEP:
TELEFONE (DDD)	FAX:
CIDADE:	UF:
DIRETOR DA UNIDADE:	
RESPONSÁVEL TECNICO:	CR: Nº:

Observação: considerar as seguintes siglas
I = IMPRESCINDIVEL – item que pode influir em grau critico na qualidade e segurança no lactário.
N = NECESSÁRIO - item que pode influir em grau menos critico na qualidade e segurança no lactário.
R = RECOMENDAVEL - item que pode influir em grau não critico na qualidade e segurança no lactário.
INF = INFORMATIVO – item que fornece subsidio para melhor interpretação do resultado.

Nº	ITEM	C	NC	NA	NO
1	**DOCUMENTAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA FUNCIONAMENTO**				
1.1	Certificado da inspeção sanitária (CIS)				
1.2	Alvará sanitário				
1.3	Taxa de inspeção sanitária				
2	**PROJETO E INSTALAÇÕES**				
2.1	LOCALIZAÇÃO				
2.1.1	Localização de acesso fácil, direto e independente? (I)				
2.1.2	Arredores livres de sucatas, fossas, lixo, terra animais e outros contaminantes?(I)				
2.1.3	Arredores livres de inundações? (I)				
2.1.4	Existe sinalização de orientação e segurança? (I)				
2.1.5	Existe identificação de saída de emergência? (I)				
2.2	EDIFICAÇÃO				
2.2.1	Área física de acordo com RDC nº 50/02? (I)				
2.2.2	Fluxo operacional unidirecional, evitando cruzamento e que facilite sua higienização?				
2.2.3	Garante a proteção contra a entrada de pragas ou animais (proteção nas aberturas da parte inferior das portas, telas, cortinas de ar, outros)? (I)				
2.2.4	Existem condições de segurança contra incêndio? (I)				
2.3	PAREDES E DIVISÓRIAS.				
2.3.1	Apresentam bom estado de conservação? (I)				
2.3.2	São de cores claras, dematerial liso, impermeável e lavável? (I)				
2.3.3	São impermeabilizadas até no mínimo 2 metros de altura? (I)				
2.3.4	As bancadas são de fácil limpeza e desinfecção? (I)				
2.4	PISOS E RALOS				
2.4.1	Apresentam bom estado de conservação? (I)				
2.4.2	São de cores claras, de material liso, impermeável e lavável? (I)				
2.4.3	Existe escoamento em direção aos ralos? (I)				
2.4.4	Os ralos são sifonados, de fácil limpeza ou possuem mecanismos de fechamento? (I)				
2.4.5	Os ralos apresentam revestimento liso, proteção contra a entrada de insetos e roedores, são mantidos limpos e em bom estado de conservação? (I)				
2.5	TETOS E FORROS				
2.5.1	Apresentam acabamento liso, impermeável e de cor clara? (I)				
2.5.2	Apresentam bom estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, goteiras, umidade, bolor, descascamentos e infiltrações)? (I)				

2.6	PORTAS JANELAS E TELAS				
2.6.1	Apresentam bom estado de conservação, de cores claras, material liso não-absorvente e de fácil limpeza? (I)				
2.6.2	As portas possuem fechamento automático, molas ou similar? (I)				
2.6.3	As janelas e telas evitam que raios solares incidam sobre o leite e demais alimentos?				
Nº	**ITEM**	**C**	**NC**	**NA**	**NO**
2.6.4	Possuem telas milimétricas em bom estado de conservação e facilmente removíveis para limpeza? (I)				
2.7	Iluminação e instalação elétrica				
2.7.1	A qualidade da intensidade da iluminação é adequada?				
2.7.2	As luminárias são dotadas de sistema de proteção? (I)				
2.7.3	As instalações elétricas estão em bom estado de conservação, segurança e uso? (I)				
2.7.4	Existem geradores para emergência?				
2.7.5	Existem tomadas de corrente em número e força suficientes? (I)				
2.7.6	As tomadas são identificadas?				
2.8	VENTILAÇÃO				
2.8.1	É suficiente e adequada?				
2.8.2	O ambiente está livre de gases, fumaça, condensação de vapor e fungos? (I)				
2.8.3	Existe climatização e/ou ventilação artificial ou natural? (I)				
2.8.4	O ar na área climatizada incide sobre o leite e outros alimentos?				
2.9	PIAS PARA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS				
2.9.1	Em número suficiente, bem localizadas e em bom estado de conservação?				
2.9.2	Possuem: sabão liquido ( ); álcool 70% ou similar ( ); papel toalha não reciclado ou outro sistema de secagem ( ); lixeiras com tampa acionada com pedal ( )? (I)				
2.9.3	Os funcionários estão treinados e aplicam corretamente a técnica de higienização das mãos? (I)				
2.10	SANITÁRIOS E VESTIÁRIOS				
2.10.1	Existem vestiários separados por sexo? (I)				
2.10.2	Respeitam a exigências de instalações gerais: piso ( ), parede ( ), teto ( ), divisórias ( ) e janelas ( )? (I)				
2.10.3	Apresentam bom estado de conservação? (I)				
2.10.4	Localizam-se em uma área sem comunicação direta com as áreas de produção? (I)				
2.10.5	Possuem lixeiras com tampas com acionamento por pedal e sacos plásticos? (I)				
2.10.6	É feito o descarte de papel higiênico direto no vaso sanitário?				
2.10.7	Possuem suporte com sabão liquido( ),papel toalha não reciclado ou outro sistema para secar as mãos( )?				
2.10.8	Os vestiários possuem armários, em numero suficiente e em bom estado de conservação?				
2.11	LIXO E ESGOTO				
2.11.1	Os recipientes são de material adequado, de fácil limpeza, com tampa e sacos plásticos para receber o lixo? (I)				
2.11.2	Após a remoção do lixo os recipientes são devidamente higienizados?(I)				
2.11.3	O lixo é removido de forma e com freqüência adequadas, sem risco de contaminação?(I)				
2.11.4	O lixo externo é mantido em área que não oferece risco de acesse a pragas e animais e é isolado das áreas de processamento e estocagem?(I)				
2.11.5	O lixo externo é recolhido com freqüência adequada?(I)				
2.12	ABASTECIMENTO DE ÁGUA				
2.12.1	A água utilizada é de forma segura e aprovada?(I)				
2.12.2	O estabelecimento possui reservatórios de água?				
2.12.3	Os reservatórios apresentam tampas e estão em bom estado de conservação e protegidos de contaminação? (I)				
2.12.4	É realizada limpeza de forma adequada e com freqüência semanal? (I)				

2.12.5	Existem registros? (I)				
2.12.6	Existe controle microbiológico periódico da água? (I)				
2.12.7	Há controle de cloro? (I)				
2.12.8	Existe disponibilidade de água fria e quente? (I)				
2.12.9	Existem filtros de água? (I)				
2.12.10	A substituição e limpeza das velas respeita uma freguencia adequada? (I)				
2.13	CONTROLE DE PRAGAS				
2.13.1	A desinsetização e desratização são eficientes? (i)				
2.13.2	Existe programa de controle de pragas? (I)				
2.13.3	Existe programa integrado de controle de pragas? (i)				
Nº	**ITEM**	**C**	**NC**	**NA**	**NO**
2.13.4	Quando necessário, o controle de infestação por pragas é efetuado por empresa especializadas e credenciadas? (I)				
2.13.5	Os produtos químicos usados são devidamente registrados no Ministério da Saúde? (I)				
2.13.6	Antes da aplicação dos produtos químicos, é feita a proteção dos equipamentos e utensílios (I)				
2.13.7	Após a aplicação é realizada a correta higienização dos equipamentos e utensílios, para que os resíduos sejam eliminados? (I)				
2.13.8	É cumprida a norma de proibição de uso de iscas tóxicas nas áreas de processamento?(I)				
2.13.9	Existem registros do controle de pragas, constando prazo de garantia e realização de revisões. Quando necessárias? (I)				
3	**EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS**				
3.1	Possuem superfícies lisas, impermeáveis, resistentes, não absorventes, sem riscos de contaminação química ou física?(I)				
3.2	Têm desenho sanitário que favorece a higienização? (I)				
3.3	Apresentam bom estado de funcionamento? (I)				
3.4	Apresentam bom estado de conservação? (I)				
3.5	São conservados em lugar apropriados? (I)				
3.6	São dimensionados em número suficiente? (I)				
3.7	Existe programa de manutenção preventiva?				
3.8	É realizada calibração dos equipamentos (termômetros, balanças etc)? (I)				
3.9	Existem registros de manutenção e calibração? (I)				
4	**HIGIENE**				
4.1	DO ESTABELECIMENTO, DOS EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS				
4.1.1	Os procedimentos de higiene estão escritos, disponíveis, visíveis e corretos? (I)				
4.1.2	Os funcionários estão treinados para o cumprimento dos procedimentos de higienização? (I)				
4.1.3	É realizada a supervisão da execução dos procedimentos e são feitos registros? (I)				
4.1.4	Existe disponibilidade de produtos de higienização para realização da operação?(I)				
4.1.5	Os produtos de higienização são identificados e guardados em local adequado? (I)				
4.1.6	Os equipamentos e utensílios mostram-se limpos ao contato visual e tátil? (I)				
4.1.7	Os procedimentos de lavagem e desinfecção são realizados em áreas isoladas da manipulação do leite? (I)				
4.1.8	Os produtos de limpeza são aprovados por órgãos competentes? (I)				
4.1.9	Os produtos de limpeza são usados de forma correta (diluição, troca periódica etc)? (I)				
4.1.10	Os utensílios de limpeza são higienizados após o uso?				
4.1.11	Os utensílios de limpeza são guardados em local adequado?				
4.1.12	Os utensílios são mantidos sob condição de higiene?				
4.1.13	As etapas de higienização são cumpridas e as condições de limpeza são adequadas para: (I)				
4.1.13.1	Paredes / divisórias				
4.1.13.2	Pisos / rodapés?				

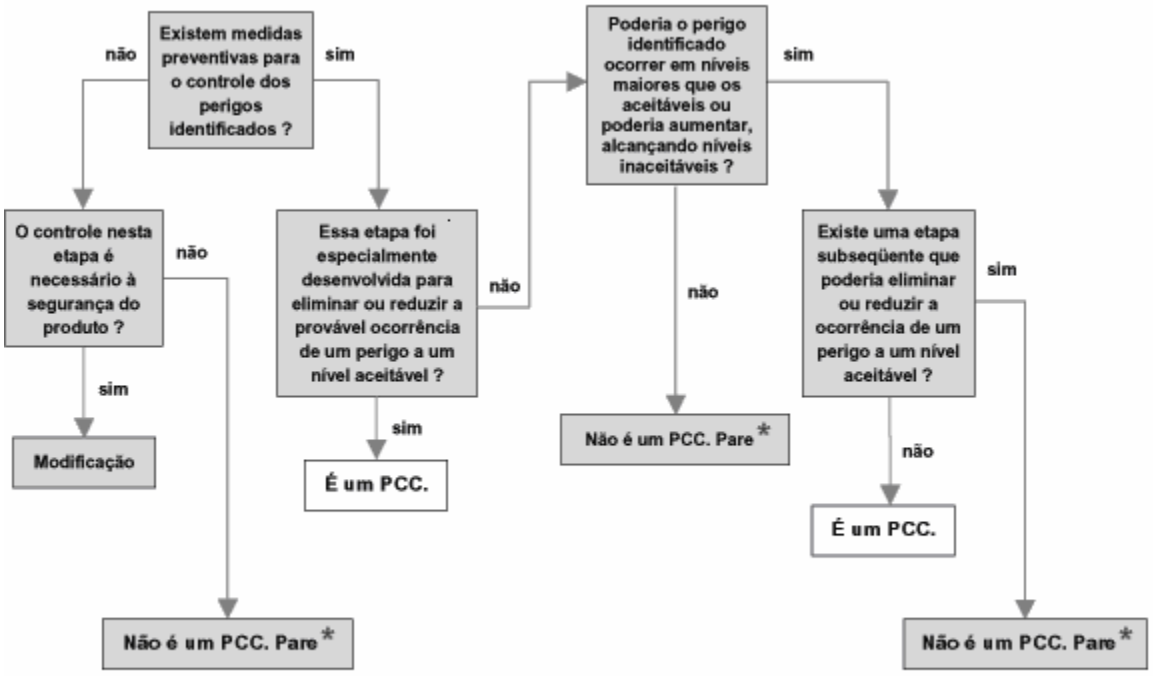
4.1.13.3	Ralos?				
4.1.13.4	Teto?				
4.1.13.5	Portas / maçanetas?				
4.1.13.6	Janelas?				
4.1.13.7	Superfícies de trabalho?				
4.1.13.8	Telas?				
4.1.13.9	Interruptores / luminárias?				
4.1.13.10	Pias para higienização das mãos?				
4.1.14	Os utensílios de limpeza (panos de limpeza, rodos, esponjas, escovas) são de uso exclusivo para este fim?(I)				
4.2	HIGIENE PESSOAL, MÃOS,UNIFORMES E ACESSÓRIOS				
4.2.1	Os funcionários são treinados e conscientizados sobre higiene pessoal? (I)				
4.2.2	Os funcionários são conscientizados quanto ao processo de manipulação e boas práticas? (I)				
4.2.3	Artigos pessoais são mantidos afastados da área de processamento?				
Nº	**ITEM**	**C**	**NC**	**NA**	**NO**
4.2.4	São realizados exames médicos e laboratoriais na periodicidade adequada?				
4.2.5	O serviço possui recursos para higienização pessoal: lavabo localizado em local estratégico ( ) ; sabão liquido ( ); papel toalha não reciclado ou outro sistema para secar as mãos ( ); lixeira com tampa acionado por pedal ( );aviso sobre a técnica e obrigatoriedade de prática ( )? (i)				
4.2.6	Verifica-se:				
4.2.6.1	Mãos e unhas limpas? (I)				
4.2.6.2	Uso de máscaras? (I)				
4.2.6.3	Proibição do uso de adornos (brincos, pulseiras, relógios etc.)? (I)				
4.2.6.4	Uso de protetores para o cabelo? (I)				
4.2.6.5	Proibição do uso de esmalte? (I)				
4.2.6.6	Uniformes limpos e adequados à atividade executada? (I)				
4.2.6.7	Uniformes íntegros?(I)				
4.2.6.8	Calçados fechados e limpos? (I)				
4.2.6.9	Uso de luvas termoprotetoras?(I)				
4.2.7	Os procedimentos de higienização das mãos estão escritos disponíveis em lugar visível ao funcionário? (I)				
4.2.8	Os funcionários higienizam as mãos antes do uso de luvas? (I)				
4.2.9	As luvas são trocadas a cada final de tarefa ou se algo as contaminou? (I)				
4.2.10	As luvas de borracha são mantidas limpas e usadas só para serviços de limpeza? (I)				
4.2.11	Todos os tipos de luvas são guardados em local adequado? (I)				
4.2.12	Os visitantes utilizam uniforme adequado para circularem nas áreas de produção?				
5	**SETORES DO LACTÁRIO**				
5.1	ÁREA DE RECEPÇÃO				
5.1.1	Respeita as exigências de instalação gerais? (I)				
5.1.2	Apresenta-se em adequada condição de higiene? (I)				
5.1.3	Possui bancada de fácil limpeza e desinfecção? (I)				
5.1.4	São realizadas limpezas das embalagens, embalagens metálicas são desinfetadas antes de abrir? (I)				
5.1.5	Produto não conforme é segregado e identificado? (I)				
5.2	ÁREA PARA LAVAGEM E DESCONTAMINAÇÃO DE MAMADEIRAS, BICOS E OUTROS UTÉNSILIOS				
5.2.1	A área é isolada da área limpa? (i)				
5.2.2	Possui guichê de comunicação com a área limpa?				
5.2.3	Possui bancadas e pia de fácil limpeza e desinfecção? (I)				
5.2.4	Possui água quente e fria? (I)				
5.2.5	Possui escovas com cerdas escuras para limpeza das mamadeiras e bicos? (I)				

5.2.6	A higienização dos bicos das mamadeiras é realizada com o uso de água quente ( ), detergente( ), desinfecção com hipoclorito( ), fervura( ), autoclave( )? (I)				
5.2.7	A higienização das mamadeiras é realizada com o uso de água quente ( ),desinfecção com hipoclorito ( ), fervura ( ), autoclave ( )? (I)				
5.2.8	As mamadeiras originárias da área de isolamento da unidade de internação sofrem tratamento diferenciado? (I)				
5.2.9	Os demais utensílios utilizados no processo sofrem limpeza e desinfecção?				
5.3	ESTERILIZAÇÃO DE MAMADEIRAS (I)				
5.3.1	O serviço realiza:fervura ( );autoclavação ( )?				
5.3.1.1	Se outoclava, o equipamento possui uma ou duas portas? ___				
5.3.1.2	Se possui uma porta existe controle de horário entre o processo de esterilização da mamadeira e a produção de leite?				
5.3.2	A temperatura e o tempo para esterilização são controlados?				
5.3.3	Após a esterilização o fluxo da mamadeira impede nova recontaminação?				
5.3.4	As mamadeiras esterilizadas passam para a área de produção através de guichê? Existe controle para que não ocorra recontaminação?				
5.4	ÁREA PARA PREPARO E ENVASE DE FÓRMULAS LÁCTEAS				
5.4.1	O acesso é restrito? (I)				
5.4.2	O acesso é isolado por porta?				
5.4.3	Possui bancada de material de fácil limpeza e desinfecção? (I)				
Nº	**ITEM**	**C**	**NC**	**NA**	**NO**
5.4.4	Possui armários fechados para o guarda de leite em pó e matérias-primas? (I)				
5.4.5	Possui armários fechados para a guarda de utensílios? (I)				
5.4.6	Possui equipamentos em bom estado de conservação e limpeza: fogão ( ), banho-maria ( ), filtro ( ), relógio/cronômetro ( ), autoclave ( ), liquidificador( )?				
5.4.7	Possui utensílios para garantia do processo: jarras volumétricas não porosas ( ), colheres não porosas ( ), copo de liquidificador exclusivo para fórmulas lácteas ( ), extrator de suco ( )				
5.4.8	Possui equipamentos de conservação dos alimentos acondicionados sob refrigeração: geladeira ( ), freezer ( ), termômetro de máxima e mínima ( )?				
5.4.9	Possui tomadas exclusivas e aterradas? (I)				
5.4.10	Possui sistema de identificação das mamadeiras que distingue os tipos de fórmulas? (I)				
5.4.11	Os funcionários são treinados para garantia do processo de preparo e envase?				
5.4.12	Processamento				
5.4.12.1	Manipulador exclusivo para fórmulas lácteas?				
5.4.12.2	Utiliza o mesmo liquidificador para fórmulas lácteas e não lácteas?				
5.4.12.3	Utiliza água filtrada ou fervida para o preparo de substâncias lácteas? (I)				
5.4.12.4	Realiza aquecimento terminal das fórmulas?				
5.4.12.5	Realiza resfriamento rápido das fórmulas após o preparo?				
5.4.12.6	Os utensílios sofrem lavagem ( ), lavagem e desinfecção ( ), desinfecção e esterilização ( )?				
5.4.13	O fracionamento e o envase são realizados observando-se as recomendações para evitar contaminação? (I)				
5.4.14	Possuem recursos adequados para o cumprimento correto dos procedimentos de fracionamento e envase? (I)				
5.5	ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DAS FÕRMULAS LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS				
5.5.1	Local exclusivo para saída de material? (I)				
5.5.2	Possui mapa de controle da temperatura do ambiente ? (I)				
5.5.3	Os produtos estão devidamente rotulados/identificados? (I)				
5.5.4	Os produtos estão identificados e isolados enquanto aguardam liberação? (I)				
5.5.5	É controlado o tempo da espera nesta área até a entrega ao cliente? (I)				
5.5.6	Há registro de tempo? (I)				
5.6	DISTRIBUIÇÃO				
5.6.1	A entrega da mamadeira é realizada através de controle de alimentação por escrito?				

5.6.2	A entrega direta ao cliente é realizada pela equipe de nutrição?				
5.6.3	A entrega direta é realizada pela equipe de enfermagem?				
5.6.4	Há controle do tempo entre a entrega e o consumo? (I)				
5.6.5	Há orientação ao acompanhamento quanto ao prazo de validade? (I)				
5.6.6	Não havendo o consumo imediato a fórmula é mantida sob refrigeração?				
5.6.7	Há controle do prazo de validade após a refrigeração?				
5.6.8	A manutenção é realizada em equipamento exclusivo da nutrição (geladeira)?				
5.6.9	Há controle de temperatura do equipamento?				
5.6.10	Para o reaquecimento há controle de tempo e temperatura? (I)				
5.6.11	Utiliza-se mamadeira-teste na etapa de reaquecimento?				
5.6.12	Há controle de tempo entre a entrega e o consumo das fórmulas reaquecidas?				
5.6.13	Há controle de identificação de produto não-conforme para as fórmulas que ultrapassam o prazo de validade após o reaquecimento? (I)				
6	**CONTROLE DE QUALIDADE**				
6.1	Realiza controle bacteriológico de fórmulas lácteas				
6.2	Realiza controles e monitoramento de tempo e temperatura? (I)				
6.3	Realiza controle do tratamento térmico?				
6.4	Realiza controle de esterilização de mamadeiras e bicos? (I)				
6.5	Realiza controle de higienização de bicos e anéis da mamadeira? (I)				
6.6	Registra tempo e temperatura de autoclave				
6.7	Registra tempo de fervura?				
6.8	Realiza a supervisão dos procedimentos e cumprimento de normas e parâmetros? (I)				
6.9	Realiza controle microbiológico da água?(I)				
7	**CONDIÇÕES ORGANIZACIONAIS**				
Nº	**ITEM**	**C**	**NC**	**NA**	**NO**
7.1	Existe manual de rotinas técnicas e procedimentos? (I)				
7.2	É feito registro de manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos? (I)				
7.3	É atendido o fluxo seqüencial de procedimentos conforme RDC N.50/02?				
7.4	O armazenamento dos produtos ocorre conforme a recomendação do fabricante? (I)				
7.5	O serviço possui livro de ordens e ocorrências?				
7.6	O serviço possui registro de entrada e saída?				
8	**RECURSOS HUMANOS**				
8.1	QUADRO DE PESSOAL				
8.1.1	Nº de Nutricionistas:				
8.1.2	Nº de Técnicos em nutrição:				
8.1.3	Nº de Cozinheiros e auxiliares:				
8.1.4	Nº de Funcionários de limpeza:				
8.1.5	Outros:				
8.2	A escala de pessoal está em local visivel? (i)				
8.3	Existe registro de treinamento específico em conjunto com a CCIH? (I)				
C: conforme NC: não conforme NA: não aplicável NO: não observado					

Fonte: SEBRAE, 1999

ANEXO B - Árvore decisória para a identificação de pontos críticos de controle



*Prossiga para o próximo perigo identificado no processo

Fonte: FAO / WHO