

**IRIS BARBOSA DE SOUZA**

**APLICABILIDADE DE UM MODELO PARA ESTIMAR O  
CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* EM ARROZ-DOCE,  
EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**2003**

**IRIS BARBOSA DE SOUZA**

**APLICABILIDADE DE UM MODELO PARA ESTIMAR O  
CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* EM ARROZ-DOCE,  
EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**Aprovada: 31 de julho de 2003**

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Conselheiro)

---

Prof. Gino Ceotto Filho  
(Conselheiro)

---

Profa. Ângela Maria Campos Santana

---

Profa. Rita de Cássia Lanes Ribeiro

---

Profa. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus, por me conceder mais essa graça, que complementa a cada dia o sublime dom da vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de estar agregando valor científico ao meu conhecimento profissional.

À FAPEMIG, cujo apoio permitiu a obtenção de material e equipamentos necessários para a realização dessa pesquisa.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Nutrição e Saúde, pela atenção e carinho durante os momentos que vivenciamos juntos. A Solange Starling Brandão, pela disponibilidade e atenção a todos os mestrandos. Um agradecimento especial à professora Conceição A. dos Santos Pereira, pelo exemplo de organização e dedicação ao trabalho.

À minha orientadora e referência pessoal, professora Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, pelo seu jeito suave e tranquilo durante nossas partilhas, demonstrando sua generosidade e confiança.

Ao professor Nélio José de Andrade, pelas sugestões e pela segurança que transmitiu, com sua participação, nessa fase tão importante.

Ao professor Gino Ceotto, pelo seu auxílio fundamental no uso do equipamento e do *software* para aquisição de dados de temperatura, e pelo acompanhamento durante as análises de dados, demonstrando a importância das interfaces entre departamentos e áreas, na universidade.

Às amigas do Laboratório de Higiene de Alimentos, Alessandra Zinato e Márcia Schott que, com suas mãos, acrescentaram apoio durante o trabalho pesado de rotina e, com suas companhias, me ajudaram a crescer como pessoa. Às boas lembranças, também, dos parceiros Handyara, Luíza, Valéria, Sandra, Dany, Ingrid, Cida e Maurílio, todos admiráveis profissionais, com certeza.

Às professoras Ângela M. C. Santana e Rita de Cássia Lanes Ribeiro, pelas marcantes contribuições na valorização desse trabalho.

À grande família do Sr. Geraldo (meu pai) e a D. Zilda (minha mãe), minha maior torcida, pelo incentivo. Em especial, ao meu marido César e meus filhos, Lucas e Yolande, pela compreensão nos momentos de ausência e pela acolhida carinhosa, nas horas difíceis.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Importância e impacto das doenças de origem alimentar alimentar.....	3
2.2. Caracterização de <i>Bacillus cereus</i> e intoxicações atribuídas ao patógeno.....	7
2.3. Incidência e crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em alimentos.....	10
2.4. Controle de riscos de intoxicações alimentares por <i>Bacillus cereus</i> .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Alimentos.....	21
3.2. Microrganismos.....	21
3.3. Ativação das culturas de <i>Bacillus cereus</i> .....	21
3.4. Planejamento experimental.....	22
3.5. Avaliação do crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas.....	22
3.5.1. Preparo das suspensões de esporos.....	22
3.5.2. Preparo do meio de arroz-doce.....	23
3.5.3. Determinação das taxas máximas de crescimento ( $\mu$ ) e dos tempos de geração (G), relativos a cada microrganismo e temperaturas testadas.....	24
3.6. Ajuste de um modelo proposto para estimar o crescimento de microrganismos em função da temperatura, aos dados experimentais.....	26
3.7. Avaliação do crescimento de <i>Bacillus cereus</i> meio arroz-doce, durante operação de resfriamento.....	27

3.8	Estimativas e dados experimentais relativos ao crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1.	Avaliação do crescimento de <i>Bacillus cereus</i> , em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas.....	29
4.2.	Ajuste de um modelo proposto para estimar o crescimento de microrganismos em função da temperatura, aos dados experimentais.....	38
4.3.	Estimativas e dados experimentais relativos ao crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.....	40
5.0.	CONCLUSÕES.....	46
6.0.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## ANEXOS

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Crescimento da cepa emética em meio de arroz-doce, a 10, 15 e 22° C.....	31
Figura 4.2	Crescimento da cepa emética em meio de arroz-doce, a 30, 37 e 45° C.....	32
Figura 4.3	Crescimento da cepa diarréica em meio de arroz-doce, a 10, 15 e 22° C.....	33
Figura 4.4	Crescimento da cepa diarréica em meio de arroz-doce, a 30, 37 e 45° C.....	34
Figura 4.5	Taxas de crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce e ajuste da Equação 2 aos dados experimentais $\mu(T) = [a(T-T_{min})]^2 \cdot \{1-\exp[b \cdot (T-T_{max})]\}$ ....	39
Figura 4.6	Curvas de operação de resfriamento de arroz-doce (ensaio 1, desenvolvido com a cepa emética, e ensaio 2, com a cepa diarréica).....	41
Figura 4.7	Avaliação do crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Composição do meio de arroz-doce utilizado como substrato de crescimento.....	24
Tabela 3.2	Intervalos entre contagens de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz, a diferentes temperaturas.....	25
Tabela 4.1	Taxas máximas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas, expressas em ciclos $\log.h^{-1}$ .....	30
Tabela 4.2	Tempos de geração (G) de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas, expressos em minutos.....	30
Tabela 4.3	Parâmetros obtidos pelo ajuste da 'Equação 2' aos dados experimentais relativos ao crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meio de arroz-doce.....	38
Tabela 4.4	Taxas de declínio de temperatura de arroz-doce ( $^{\circ}C/h$ ), durante operação de resfriamento.....	40
Tabela 4.5	Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g) em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.....	42
Tabela 4.6	Crescimento da cepa emética, submetida a resfriamento: dados experimentais ( $N/N_0$ ) e estimativas, em UFC por grama do meio de arroz-doce.....	43
Tabela 4.7	Crescimento da cepa diarréica, submetida a resfriamento: dados experimentais ( $N/N_0$ ) e estimativas, em UFC por grama do meio de arroz-doce.....	43

## RESUMO

SOUZA, Íris Barbosa de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003.  
**Aplicabilidade de um modelo para estimar o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz-doce, em função da temperatura.** Orientadora: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo. Conselheiros: Nélio José de Andrade e Gino Ceotto Filho.

Foi avaliado o crescimento de duas cepas de referência de *Bacillus cereus*, uma diarréica e outra emética, inoculadas em meio de arroz-doce preparado conforme proporção de ingredientes de uso comum em restaurantes e domicílios. Os ensaios permitiram avaliar o comportamento das duas cepas, submetidas às temperaturas de 10, 15, 22, 30, 37 e 45°C, gerando curvas a partir das quais foram calculadas as taxas máximas de crescimento relativas a cada cepa em estudo. A partir do tempo inicial, e depois, a intervalos convenientes, segundo a temperatura de exposição, amostras em duplicatas foram submetidas a procedimentos para contagem das Unidades Formadoras de Colônias, por semeadura em superfície de placas contendo ágar MYP. O crescimento de ambas as cepas a 10°C foi praticamente nulo, mas entre 15°C e 37°C as taxas de crescimento relativas à fase exponencial, expressas em ciclos logarítmicos por hora, foram ascendentes, com os tempos de geração calculados entre 261 e 28 minutos, para a cepa de tipo emético, e entre 225 e 31 minutos, para a cepa de tipo diarréico. A 45°C a velocidade de crescimento de cada cepa foi sensivelmente menor do que a 37°C, com os tempos de geração alcançando 46 e 48 min, àquela temperatura, respectivamente para a cepa diarréica e para a cepa emética. Em seguida foram realizados dois ensaios para estudar o comportamento de ambas as cepas de *B. cereus*, inoculadas no mesmo substrato e submetidas a um processo lento de resfriamento, entre 49°C e 22°C, aproximadamente. Partindo do tempo zero e a cada intervalo de duas horas, até completar doze horas, foram desenvolvidos procedimentos de contagem em meio de ágar MYP. Os dados obtidos permitiram construir curvas de temperatura e, a partir daí, curvas de crescimento dos microrganismos, sempre em função do tempo. Um modelo matemático foi, então, ajustado às taxas de crescimento de *B. cereus* em meio de arroz-doce, em função da temperatura, calculadas anteriormente. Esse

modelo, segundo seus autores, permite estimar o crescimento microbiano em toda a faixa de temperatura em que ocorre multiplicação. A magnitude desse crescimento, nas condições testadas, foi expressiva. A estirpe diarréica apresentou crescimento equivalente a quatro ciclos logarítmicos e a cepa emética chegou a aumentar cinco ciclos, após doze horas de exposição ao resfriamento. Os valores preditos, obtidos por meio do modelo, mostraram uma pequena tendência para superestimar as contagens, porém observou-se que essa diferença se reduziu ao final das doze horas, nos dois ensaios. Assim, ao final do resfriamento, as populações preditas e experimentais diferiram em, aproximadamente, 0,1 ciclo logarítmico. Concluiu-se que o substrato mostrou-se adequado ao crescimento do patógeno, mas os resultados observados não corroboraram a expectativa de maior crescimento dos microrganismos em meio de arroz-doce do que em preparação de arroz simples, considerando dados da literatura. Atribuiu-se à canela em pó, dispersa no alimento, possível efeito inibidor. Contudo, ficou evidente que a exposição do alimento a temperaturas entre 22 e 30°C, comumente observadas em regiões tropicais, oferece risco expressivo de que as populações de *B. cereus* alcancem números suficientes para causar as intoxicações caracteristicamente atribuídas ao patógeno. O modelo utilizado foi considerado com potencial para contribuir na avaliação de riscos a que se expõem os consumidores do alimento - arroz-doce - quando mantido a temperaturas que permitem o crescimento de diferentes cepas de *B. cereus*.

## ABSTRACT

SOUZA, Íris Barbosa de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003.  
**Applicability of a model to estimate the growth of *Bacillus cereus* in "arroz-doce", in function of the temperature.** Advisor: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo. Committee members: Nélio José de Andrade and Gino Ceotto Filho.

The growth profile of two pathogenic *Bacillus cereus* type-strains (one diarrhoeal, another emetic), were evaluated by inoculating suspensions of bacterial spores on a substrate that reproduces a typical Brazilian product, a rice pudding-like dessert known as "arroz-doce", prepared according to a recipe commonly used in food service establishments and at home. The growth kinetics of both microorganisms was assessed under six temperature treatments, i.e., 10, 15, 22, 30, 37 and 45°C. From the resulting growth curves, the maximum growth rates, related to the exponential growth phase, were calculated for each type-strain. At time intervals adequate to each exposure temperature, from the beginning (time zero), duplicate samples were submitted to procedures for counting colony forming units by spreading the *inoculum* on surfaces of plates containing MYP agar. At 10°C, the growth was not detected, but growth rates related to the exponential phase increased as the temperature shifted from 15°C to 37°C, with corresponding generation times shifting from 261 to 28 minutes for the emetic type-strain and from 225 to 31 minutes for the diarrhoeal one. At 45°C, the generation times were reported as being 46 and 48 minutes, for the diarrhoeal and the emetic type-strains, respectively, noticeably lower than that at 37°C. Two assays were then carried out to study the behavior of both *B. cereus* strains, inoculated in the same substrate and submitted to a slow cooling from 49°C to 22°C, approximately. At two-hour intervals from time zero, until twelve hours, procedures for counting *B. cereus* populations in MYP agar were developed. The data obtained was used to generate temperature curves, and from them, growth curves of the microorganisms, as functions of time. A mathematic model was then fitted to the previously calculated growth rates of *B. cereus* in the "arroz-doce" medium as a function of temperature. From this model, according to its authors, it is possible to assess growth of microorganisms throughout all their growth temperature range. The magnitude

of this growth was expressive under the tested conditions. The diarrhoeal type-strain increased in four logarithmic cycles, while the emetic one increased in five cycles after twelve hours of cooling exposure. The predicted values obtained from the model exhibited a slight tendency to overestimate the counts; however, this effect was not so evident at the end of the cooling process, in both assays. So, the predicted and observed populations differed in about 0.1 log cycle. The substrate was considered to be adequate to the pathogen multiplication, but the observed results did not corroborate the expectation of a higher microbial growth in a rice preparation resulting from its enrichment with a protein source (milk). The cinnamon powder added to the substrate probably inhibited *B. cereus* growth. However, it was evident that the exposure of the food to temperatures between 22 and 30°C, commonly observed in the tropics, may allow that *B. cereus* populations achieve counts high enough to cause the illnesses attributed to the pathogen. The mathematic model was considered as having potential for contributing to evaluate the risk that the “arroz-doce” consumers are exposed to when this product is kept at temperatures that allow growth of different *B. cereus* strains.

## 1. INTRODUÇÃO

Estimativas recentes, divulgadas por agências oficiais, nos Estados Unidos, revelam que mais de setenta milhões de casos de doenças de origem alimentar afligem anualmente os norte-americanos, resultando em aproximadamente quatrocentas mil hospitalizações e cinco mil mortes. A precariedade das condições brasileiras, especialmente em regiões de maior pobreza, permite-nos supor que em nosso meio esses números sejam ainda maiores, de magnitude alarmante. As chances de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos são sempre expressivas, porque a exposição é consequência do próprio ato da alimentação.

Pesquisas desenvolvidas para se conhecer o potencial de crescimento de espécies reconhecidamente comuns e responsáveis por ocorrências dessa natureza são sempre oportunas. Tais avaliações fornecem subsídios para ações de controle e prevenção e refletem o compromisso de profissionais voltados a questões de saúde coletiva.

*Bacillus cereus* é um dos microrganismos notáveis por sua ubiqüidade e capacidade de adaptação a diversos substratos alimentares, associado à causa de duas síndromes, sendo a mais comum devida a uma toxina diarréica, conhecida já há quase cinqüenta anos. A outra síndrome, emética, deve-se a uma toxina reconhecida há pelo menos trinta anos, embora sua caracterização exata só tenha acontecido em meados da década passada. As evidências das propriedades enteropatogênicas do microrganismo levam a considerá-lo um dos mais importantes agentes etiológicos de doenças de origem alimentar.

Esse microrganismo está profusamente difundido no meio ambiente, incidindo em alimentos os mais variados. No caso particular do arroz, chega a ser considerado parte integrante de sua microbiota usual. Sua multiplicação, também, ocorre em grande variedade de substratos alimentares, de forma que os níveis de contaminação podem tornar as preparações um perigo expressivo para os consumidores. A contaminação dos alimentos por *B. cereus*, não leva, necessariamente, a alterações em suas propriedades sensoriais, disso resultando que o consumidor possa ingerir o produto assim contaminado - incluindo preparações de arroz - sem perceber modificações de odor ou paladar.

Evidências apontadas por diversos autores levam a crer que a adição de proteínas torna os substratos ainda mais propícios ao crescimento do microrganismo. O enriquecimento de preparações, com leite ou outros ingredientes de altos teores protéicos, podem determinar aumentos nas taxas de crescimento do patógeno. Além disso, os altos níveis de contaminação observados em condimentos e especiarias, que podem compor várias dessas preparações enriquecidas, evidenciam o perigo representado por esses itens, como fonte do microrganismo. O próprio leite, mesmo pasteurizado, é um ingrediente cuja contaminação por *B. cereus* tem sido amplamente registrada na literatura especializada.

A partir dessas considerações e destacando a freqüente associação de intoxicações por *B. cereus* a preparações amiláceas, pareceu oportuno investigar o efeito da adição de substrato protéico em uma base de cereal. Assim é que se avaliou o crescimento de duas cepas patogênicas clássicas inoculadas em meio de arroz-doce, uma preparação basicamente amilácea acrescida de um ingrediente rico em proteína (leite), a uma faixa de temperatura que se estendeu de 10 a 45°C. A escolha do arroz-doce se justifica, visto ser uma preparação bastante difundida nos cardápios brasileiros, em restaurantes e domicílios, e por se ter acesso a indícios que levam a suspeitar de seu envolvimento em surtos de intoxicações por *B. cereus*.

O trabalho foi conduzido visando a contribuir para orientar ações preventivas do perigo representado pelo crescimento de *B. cereus* em preparações de arroz-doce, com os seguintes objetivos específicos:

- a) Estudar o crescimento de duas cepas patogênicas de *B. cereus*, inoculadas em preparações de arroz-doce, a 10, 15, 22, 30, 37 e 45°C;
- b) Ajustar um modelo matemático, proposto para descrever o crescimento microbiano em função da temperatura, aos dados experimentais obtidos, relativos às taxas exponenciais de crescimento;
- c) Submeter as cepas, inoculadas no mesmo substrato de arroz-doce, a uma operação lenta de resfriamento, entre 48 e 22°C, aproximadamente, durante 12 h;
- d) Avaliar o modelo, comparando dados estimados aos dados experimentais observados quando da operação de resfriamento de arroz-doce.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância e impacto das doenças de origem alimentar**

As doenças cujos agentes são transmitidos por alimentos representam um problema de grandes proporções, com custos econômicos elevados, em todo o mundo. Estudos epidemiológicos desenvolvidos em diversos países levam à constatação de que tem ocorrido um considerável aumento na incidência dessas doenças, com conseqüências tanto para a saúde quanto para a economia de indivíduos, famílias, grupos populacionais e para as relações entre países (Käferstein, 2003). As pressões econômicas e logísticas para estender a vida de prateleira dos produtos podem contribuir para a ocorrência dos surtos, mas os fatores preponderantes ligam-se a questões de higiene dos alimentos, desde a produção da matéria-prima até a utilização inadequada dos produtos, pelos consumidores. O ideal de disponibilizar para a população apenas alimentos inócuos parece uma meta de alcance remoto (Caswell, 2000).

As informações epidemiológicas disponíveis sobre as doenças de origem alimentar, tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento, mostram que a freqüência de enfermidades e mortes associadas ao consumo de alimentos contaminados é intoleravelmente alta devido a uma vasta coleção de patógenos que contaminam nossos suprimentos alimentares (Potter et al., 1997).

É consenso o conceito de que as doenças de origem alimentar são aquelas contraídas como resultado da ingestão de alimentos. Embora muitas doenças sejam conseqüências indiretas dessa ingestão, há outras que são diretamente associadas ao consumo de alimentos ou refeições, por determinado número de pessoas, ocorrendo em forma de surtos (Cliver, 1990). O reconhecimento do surto pode depender, por sua vez, do número de pessoas envolvidas e da severidade da doença. Muitos surtos passam despercebidos porque as doenças não são notificadas pelos profissionais de saúde, principalmente os casos individuais, comprometendo os registros dos dados e o acesso às informações.

Os surtos de doenças de origem alimentar manifestam-se em forma de infecções e intoxicações, na grande maioria de origem microbiana, predominantemente por bactérias que representam constante desafio aos profissionais responsáveis pelo controle higiênico dos alimentos (Collins, 1997). Dispersos na natureza, os microrganismos adaptam-se para tolerar condições extremas de sobrevivência e podem contaminar e crescer em muitos alimentos, inclusive na água, representando um perigo constante para a saúde humana (McMeekin et al., 1997).

As infecções alimentares são causadas por microrganismos viáveis, incluindo bactérias, vírus, protozoários e parasitas. As intoxicações alimentares apresentam diversas origens, podendo ser por substâncias químicas presentes naturalmente nos alimentos, por contaminantes acidentais ou intencionais ou, ainda, por toxinas microbianas. O trato digestivo (especialmente o intestino delgado) é o sítio primário de ação dos agentes infecciosos ou das toxinas ingeridos com os alimentos. Os sintomas predominantes - tais como náuseas, vômito, diarreia, mal estar e febre - bem como os períodos de incubação, estão relacionados com o agente da doença (Cliver, 1990).

Segundo Mead et al. (1999), mais de 200 doenças conhecidas são transmitidas através dos alimentos. Esses autores relataram que, em países industrializados, como os Estados Unidos, dados epidemiológicos sugerem uma incidência anual de 30% para doenças de origem alimentar. Em países em desenvolvimento esses valores podem ser muito mais altos, acarretando sérias conseqüências para a saúde pública.

Nota-se uma preocupação internacional constante com o aumento das doenças decorrentes do consumo de alimentos contaminados. Dados apresentados por Guiaro (1995) mostraram que os casos de contaminação de alimentos por bactérias, vírus e parasitas triplicaram em dez anos, entre 1985 e 1995, nos Estados Unidos e na Europa. De acordo com o Center for Disease Control and Prevention (CDC), estima-se que as doenças de origem alimentar comprometem 76 milhões de pessoas todos os anos, nos Estados Unidos, com uma demanda de 325 mil internações hospitalares e cerca de cinco mil mortes (DeWaal, 2003). Diversos autores relatam que, em países em desenvolvimento, a contaminação da água e de alimentos mata quase dois milhões de crianças por ano (Ackerman, 2002; Schlundt, 2002; Tauxe, 2002;

Mead, 1999). Nesses países, a diarreia infantil surge como o problema de saúde pública mais relevante (Käferstein, 2003).

No Brasil, estudos sócio-econômicos sobre a inocuidade dos alimentos são incipientes e não existem informações precisas sobre a incidência de surtos de doenças transmitidas por alimentos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, essa situação se deve, em grande parte, à não notificação dos surtos e à falta de compromisso e responsabilidade resultantes (Damasceno et al., 2002).

Estatísticas da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) indicam que, na América Latina, no período de 1993 a 2002, foram relatados 230.619 casos de doenças de origem alimentar, com 317 mortes. Nesse mesmo período, no Brasil, foram registrados 17.967 casos de toxinfecções alimentares, com cinco mortes (SIRVETA, 2003). A Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo divulgou dados de doenças transmitidas por alimentos e água, em 2002, relatando 3.950 casos e dois óbitos. A distribuição percentual de surtos notificados, segundo sua etiologia, foram: 48,2% de etiologia desconhecida, 25,4% devidos a bactérias, 23% atribuídos a vírus, 2% a parasitas e 1,5% a agentes de natureza química (CVE/SES-SP, 2003).

O número de pessoas vulneráveis aos riscos relacionados ao consumo de alimentos contaminados tem aumentado, influenciando a taxa de incidência das doenças de origem alimentar. Isso se deve a fatores como a desnutrição, a incidência de diversas doenças causadoras de imunodepressão e o envelhecimento. Por exemplo, na Europa, a população com mais de 60 anos era de 20%, em 1999, e as estimativas para 2050 giram em torno de 35% (Käferstein, 2003).

O envelhecimento populacional brasileiro resultou da queda da fecundidade, que vem ocorrendo no país a partir de 1960, somada à queda progressiva nas taxas de mortalidade, desde o final da segunda guerra mundial. Estudos brasileiros têm demonstrado que, entre os idosos, a grande maioria (mais de 85%) apresenta pelo menos uma enfermidade crônica e, destes, cerca de 15% manifestam pelo menos cinco condições patológicas, tornando-se mais susceptíveis a contrair outros agravos (Ministério da Saúde, 2003). No Brasil, segundo Chaimowicz (1997), estima-se que o número de idosos deverá duplicar até 2050, alcançando 15% do total da população. Tal

previsão aponta para a necessidade imediata de investimento em ações preventivas de saúde, o que inclui a proteção aos alimentos.

Mudanças no estilo de vida e nos padrões de consumo podem estar relacionados, também, ao aumento no número de surtos. Segundo Pires et al. (2002), essas mudanças - decorrentes, principalmente, da participação da mulher no mercado de trabalho e da concentração populacional nos grandes centros - têm contribuído para a expansão no consumo de alimentação fora do lar e gerado um significativo aumento no número de estabelecimentos de produção e comercialização de refeições. A falta de treinamento da mão-de-obra e a manipulação excessiva de grandes lotes de alimentos, expostos a longos períodos sem refrigeração, são apenas alguns dos fatores que se associam à origem dos surtos, nesses locais.

Mesmo no ambiente doméstico, o preparo e conservação dos alimentos sob condições sanitariamente inadequadas predis põem às doenças de origem alimentar (Nunes et al., 2002). Dos surtos notificados na cidade de São Paulo em 2002, 43 foram registrados em ambientes domésticos e 24 em estabelecimentos comerciais (Figueiredo, 2002). Além disso, a participação de alimentos pré-processados nos cardápios domésticos é crescente, resultado da preferência dos consumidores por produtos de preparo rápido (Damasceno, et al., 2002). A disponibilidade de alimentos prontos para o consumo é uma tendência tanto na Europa, quanto nos Estados Unidos e no Brasil (Maistro, 2001). Para exemplificar, uma análise dos gastos com alimentação, desenvolvida no município de São Paulo entre 1990 e 1996, constatou uma redução de 35% de despesas com alimentos *in natura*, enquanto os gastos com alimentos pré-processados aumentaram (Barreto e Cyrillo, 2001). Portanto, falhas nas unidades produtoras desses alimentos prontos ou semi-preparados, podem ocasionar a ocorrência de surtos no ambiente doméstico, dificilmente rastreados.

Somente a observância geral das regras de higiene, associadas à identificação e ao controle específico de pontos críticos, abrangendo toda linha de produção, desde a agricultura até a mesa, permitirá gerenciar a maioria dos riscos, no futuro (Schlundt, 1999).

## 2.2. Caracterização de *Bacillus cereus* e intoxicações atribuídas ao patógeno

*Bacillus cereus* é uma bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva, formadora de esporos, móvel por meio de flagelos peritricos e anaeróbia facultativa (Claus e Berkeley, 1986). Exemplares típicos crescem em alimentos com atividade de água a partir de 0,95, na faixa de temperatura entre 5 e 50°C e em pH entre 4,35 a 9,30. A germinação de esporos ocorre, também, entre 5 e 50°C e os tempos de geração a temperaturas ótimas podem ser iguais ou menores do que 30 min (Granum, 1997; Johnson et al., 1983; Bryan et al., 1981; Raevuori e Genigeorgis, 1975; Kim e Goepfert, 1971). A resistência térmica dos esporos varia entre estirpes e com o substrato em que são aquecidos: Dufrenne et al. (1994) registraram variações de  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  entre 4,6 e 200 min. Rajkowsky e Mykolajcik (1987) encontraram valores  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  entre 0,6 e 27 min.

Os esporos de *B. cereus* são resistentes ao calor, à desidratação e a outros fatores destrutivos, o que explica sua ocorrência freqüente em grande variedade de alimentos, crus e processados (Kramer e Gilbert, 1989; Gilbert, 1979; Goepfert et al., 1972). Por causa dessas propriedades e de sua excepcional capacidade de adesão, os esporos de *B. cereus* representam problema de grande proporção na indústria de alimentos; sua superfície é fortemente hidrofóbica, com grande capacidade de aderência a materiais comumente usados em superfícies de equipamentos e bancadas, como aço inoxidável, em indústrias e cozinhas (Husmark e Sik, 1990).

Em função de suas células secretarem enzimas capazes de degradar grande variedade de materiais orgânicos, desempenham papel ecológico bem definido e compõem um importante grupo de interesse biotecnológico (Drobniewski, 1993; Kramer e Gilbert, 1989).

As atenções sobre o microrganismo se acentuaram após sua identificação como patógeno de origem alimentar, agente etiológico de intoxicações que se manifestam em forma de diarreia ou de vômito, importante causa de surtos relatados mundialmente. Contaminando alimentos durante o manuseio, processamento, estocagem ou distribuição, pode crescer e causar decomposição ou, ainda, determinar a ocorrência de intoxicações, em homens e animais (Dufrenne et al., 1994). Segundo Granum (1994), a bactéria pode ser transferida

para os alimentos a partir de diferentes fontes e aí sobreviver, em forma de esporos, a tratamentos térmicos que reduzem a população competitiva, o que lhe proporciona condições ideais de multiplicação.

Fato que tem contribuído de maneira notável para estimular as atenções sobre *B. cereus*, em anos recentes, tem sido o isolamento freqüente de cepas psicotróficas, capazes de crescer e produzir toxina em alimentos mantidos sob refrigeração, especialmente leite (Granum, 1997; Dufrenne et al., 1995; Christiansson et al. 1993).

São conhecidas várias toxinas produzidas por *B. cereus*. Entre essas toxinas, destacam-se as enterotoxinas, que causam a síndrome diarréica, proteínas de alto peso molecular e termolábeis (Granum, 1997). Outro metabólito tóxico é a toxina emética, um peptídeo cíclico de baixo peso molecular, termoestável, purificado por Agata et al. (1994). A toxina emética é extremamente estável e resistente a extremos de pH e à proteólise (Finlay et al., 2002b).

As intoxicações alimentares associadas ao patógeno são, então, caracterizadas por dois tipos distintos de sintomatologia, um de natureza diarréica e outro vomitivo, em função da estirpe e da toxina produzida (Granum, 1997).

A intoxicação diarréica foi comprovada pela primeira vez na Noruega, por Hauge (1955). A forma diarréica apresenta sintomas que se assemelham àqueles provocados pela intoxicação por *Clostridium perfringens*. Quadro de diarréia e cólicas abdominais ocorre 8 a 16 h após consumo de alimento contaminado por grandes números de *B. cereus* (freqüentemente mais de  $10^5$  células ou esporos/g). Náuseas são um sintoma ocasional, mas quase nunca ocorre vômito. Os sintomas persistem por, no máximo, 24 h, na maioria dos casos (Granum, 1997; Kramer e Gilbert, 1989).

Garcia-Arribas e Kramer (1990) chamaram atenção para o fato de aproximadamente 75% dos surtos diarréicos envolverem alimentos contendo ingredientes amiláceos. Entretanto, segundo Langeveld et al. (1996), a síndrome diarréica é mais comumente relacionada à ingestão de alimentos ricos em proteínas. Na verdade, as síndromes são associadas a uma grande variedade de alimentos, incluindo carnes, cremes e sopas (Granum, 1997; Kramer e Gilbert, 1989).

Têm sido levantadas dúvidas com respeito à forma como se desenvolve a intoxicação diarréica - se por ingestão de toxina formada no alimento ou por ingestão do microrganismo, sendo a toxina formada no próprio organismo. Singh et al. (1984) relataram um caso excepcional, a partir do qual tais dúvidas se manifestaram. Estes autores relataram a presença de *B. cereus* em amostras de leite materno, coletado assepticamente de mulher cujo filho apresentava diarréia. A contagem era alta ( $5 \times 10^4$  UFC/g) e a natureza toxigênica dos isolados foi confirmada em ensaios com animais. Tendo sido descartada qualquer possibilidade de que a diarréia tivesse causa alérgica, concluiu-se que o leite teria sido contaminado por *B. cereus* a partir de uma infecção sistêmica da mãe - talvez mastite. Assim sendo, a criança não teria ingerido a toxina, e sim grandes quantidades do microrganismo, por ocasião da amamentação. Esse fato conduziu à hipótese de que o microrganismo pode crescer e produzir a enterotoxina no intestino. Granum et al. (1993) desenvolveram um trabalho apresentando evidências favoráveis à hipótese de produção de toxina no íleo, pela verificação de que, em condições anaeróbias, *B. cereus* cresceu e produziu toxina de forma comparável às condições aeróbias. Assim, é perfeitamente plausível a hipótese de o microrganismo multiplicar-se no intestino delgado, aí produzindo toxina em quantidade suficiente para causar a síndrome diarréica.

A forma emética de intoxicação por *B. cereus* foi reconhecida a partir de 1971, em associação ao consumo de arroz preparado em restaurantes chineses (Kramer e Gilbert, 1989). O fato foi atribuído à prática de se deixar o arroz cozido à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, durante algumas horas, ou de um dia para o outro, ou por até três dias.

Na maioria dos incidentes eméticos tem sido observada alta contaminação nos alimentos, em níveis superiores a  $10^6$  UFC/g (Nichols et al., 1999; Gilbert, 1979). Os surtos eméticos são quase exclusivamente associados a produtos à base de arroz; embora outros alimentos tenham sido incriminados, como leite e massas (Finlay et al., 2002b; Kramer e Gilbert, 1989).

A síndrome emética é descrita como um quadro em que os sintomas predominantes são náuseas e vômito, caracterizado por período de incubação curto (1 a 5 h) e duração quase sempre inferior a 24 h. O padrão da doença se assemelha à intoxicação devida a *Staphylococcus aureus* (Granum, 1997; Granum e Lund, 1997). Entretanto, a síndrome emética pode se manifestar em

formas extremamente severas, havendo relatos de casos fatais por falência hepática fulminante (Finlay et al., 2002b).

A frequência de um ou outro tipo de intoxicação varia de um país para outro. No Japão, o tipo emético predomina, associado ao consumo de arroz. Na Europa e nos Estados Unidos o tipo diarréico é relatado com mais frequência. Entretanto, os dados disponíveis sobre surtos são, em geral, sub-relatados. Um dos poucos países cujos dados são confiáveis, a Noruega associou *B. cereus* à etiologia de 33% do total de casos de intoxicações alimentares, entre 1988 e 1993 (Granum e Lund, 1997).

O princípio básico do diagnóstico e da prevenção das intoxicações por *B. cereus* consiste na sua detecção e identificação nos alimentos e ambientes. A partir do monitoramento e controle de produtos, ingredientes e ambientes é possível elaborar procedimentos de prevenção (Van Netten e Kramer, 1992).

Uma variedade de métodos de análise é recomendada para a recuperação, identificação e confirmação do *B. cereus* em alimentos (Azeredo, 1998), incluindo métodos rápidos, envolvendo testes imunológicos (Chen et al., 2001).

Para identificação da toxina diarréica de *B. cereus*, em alimentos, existem métodos simples, comercializados em *kits*, baseados em princípios de antigenicidade. A detecção da toxina emética é mais complexa e, geralmente, mais cara, podendo ser desenvolvida usando modelos animais (insetívoros e primatas) ou *in vitro*, por meio de culturas de células ou métodos colorimétricos (Finlay et al., 2002, a, b; Finlay et al., 1999).

### **2.3. Incidência e crescimento de *Bacillus cereus* em alimentos**

Fang et al. (2003) consideram *B. cereus* com características de patógeno emergente de origem alimentar, justificando sua opinião com base em sua capacidade de adaptação a temperaturas de refrigeração, contaminando produtos industrializados prontos para o consumo e cada vez mais comuns, disponíveis no mercado de alimentos. Segundo Arango et al. (1997), foi a bactéria encontrada com maior frequência entre os alimentos analisados entre 1994 e 1995, em Buenos Aires.

Um total de 10.310 amostras de alimentos, analisadas por um laboratório oficial do Ministério da Saúde na República de Chipre entre 1991 e 2000, revelou incidência de *B. cereus* em 97,3% dessas amostras. As amostras examinadas apresentaram-se contaminadas com níveis de até  $10^3$  UFC/g; entretanto, somente 1% do total apresentou contaminação igual ou superior a  $10^4$  UFC/g (Eleftheriadou et al., 2002). Esse trabalho envolveu uma grande variedade de alimentos comuns, como leite e derivados, sanduíches, alimentos prontos para o consumo, carnes curadas, peixes, sobremesas, sucos concentrados, cremes e misturas de vegetais. Os alimentos foram adquiridos no mercado local, em ambientes normalmente freqüentados pela população e por grande número de turistas.

Carlin et al. (2000a) relataram que alimentos cozidos e resfriados, também chamados de REPFEDs (Refrigerated Processed Foods of Extended Durability), estão se tornando cada vez mais populares na Europa. São alimentos pasteurizados e armazenados em temperaturas de refrigeração (entre 2 e 4°C) por até três meses. Nos últimos anos, esses alimentos, contendo vegetais, têm sido associados a intoxicações atribuídas a *B. cereus*, o que os torna alvo de atenção por parte de profissionais de saúde.

Valero et al. (2002) verificaram, em vários vegetais frescos, contagens estimadas entre  $10^2$  e  $7,8 \times 10^3$  UFC/g, evidenciando que *B. cereus* pode realmente representar problema para as indústrias de processamento de vegetais. Posteriormente, Valero et al. (2003) avaliaram a influência do pH, tratamento térmico e temperatura de armazenamento no crescimento de cepas psicotróficas de *B. cereus* em substratos vegetais com o objetivo de estender o tempo de armazenamento sob refrigeração. Observou-se que a combinação de pH 5,0 e armazenamento abaixo de 8°C inibiu o crescimento do microrganismo por 60 dias. Aumento na temperatura de estocagem, com armazenamento feito em torno de 12°C, determinou a necessidade de um branqueamento muito mais drástico, no início do processo, para reduzir a população inicial.

Segundo Carlin et al. (2000a), os vegetais são uma fonte freqüente de contaminação por bactérias esporuladas. Carlin et al. (2000b) avaliaram amostras de purês de diversos legumes (brócoli, cenoura, batata, abobrinha e ervilha fresca), pasteurizados e refrigerados por 20 dias a diversas temperaturas, entre 4 e 10°C, sendo *B. cereus* isolado de todas as amostras.

Em purês de abobrinha, foram isoladas cepas psicrotróficas de *B. cereus* em amostras tratadas por pasteurização e observou-se o crescimento das cepas em material armazenado por cinco dias a 20-25°C, tendo as populações se aproximado de 10<sup>8</sup> UFC/g (Guinebretière et al., 2003). Estes autores e Carlin et al. (2000a, b) concluíram que, mesmo em baixos números, microrganismos esporulados - em especial *B. cereus* - podem contribuir significativamente para a contaminação final de alimentos comercializados sob refrigeração os quais podem chegar ao consumidor impróprios para o consumo.

Outros produtos prontos, como *sushi* e sanduíches, armazenados a 18°C, apresentaram contaminação em 62,5% de 164 amostras coletadas em supermercados em Taiwan, conforme relato de Fang et al. (2003). Na África do Sul, Nortjé et al. (1999) analisaram 51 amostras de embutidos à base de carne, nas quais o microrganismo foi detectado, em populações estimadas abaixo de 10<sup>2</sup> UFC/g. Os autores enfatizaram a necessidade de implementar métodos de prevenção do perigo representado pela presença de *B. cereus* em alimentos protéicos.

As carnes, que são alimentos muito perecíveis, podem carrear uma série de patógenos, entre os quais *B. cereus*, uma vez que a ocorrência desse microrganismo no interior do intestino dos animais é estimada em torno de 33%, de acordo com Borch e Arinder (2002). É importante, pois, avaliar a segurança desses produtos, especialmente em preparações prontas para o consumo.

Pedroso et al. (1999) estudaram preparações de quibes e almôndegas em uma cozinha hospitalar, desenvolvendo fluxogramas de preparo e análises microbiológicas das amostras coletadas em diversas etapas. Observaram a contaminação por *B. cereus* em almôndegas (1 x 10<sup>2</sup> UFC/g) e em quibes (2 x 10<sup>2</sup> UFC/g) prontos para o consumo, mesmo após o tratamento térmico de 4 min a 82,3°C e 6 min a 95°C, respectivamente.

Entre os alimentos de consumo geral, o arroz tem sido investigado quanto à presença do microrganismo, bem como servido de substrato em diversos experimentos, ao avaliar seu crescimento e produção de toxina. Shah et al. (1996) reuniram dados de diversos levantamentos que permitem identificar arroz e leite como os mais importantes veículos de intoxicações pelo microrganismo.

A secagem de grãos destrói a maior parte dos microrganismos contaminantes, mas esporos do gênero *Bacillus* são termorresistentes e costumam sobreviver ao tratamento, o que justifica a presença de *B. cereus* em arroz e explica sua associação freqüente com surtos (Sarrías et al., 2002). Estes autores isolaram diversas estirpes presuntivas de *B. cereus* em 61 amostras de arroz cru, com casca e polido, não tendo observado níveis superiores a  $10^2$  UFC/g.

Segundo Fang et al. (2003), o patógeno é usualmente isolado de amostras de arroz cru e pode ser considerado parte integrante de sua flora usual. Sperber (2001) lembra que, sendo um ingrediente extremamente propenso à presença de *B. cereus*, altos níveis de contaminação podem tornar as preparações um perigo expressivo para os consumidores. Muitos restaurantes - especialmente orientais - utilizam temperaturas impróprias para o armazenamento de arroz cozido e a esse fator atribui-se a contaminação de preparações por *B. cereus* em níveis acima de  $10^4$  UFC/g, observada nesses locais (Nichols et al., 1999).

O crescimento e a produção de toxina emética (ou cereulídeo) em arroz cozido foram acompanhados por Finlay et al. (2002a), que estudaram três estirpes mesófilas sob temperaturas entre 8 e 30°C. Os autores relataram germinação de esporos, crescimento e produção de toxina a partir de 15°C. A essa temperatura, a produção de toxina era detectável após 48 h, enquanto a 20 e 30°C, após 24 h de incubação, a produção de toxina já era detectada. Digno de nota é o fato de que a produção a 15°C ocorreu quando as populações ainda se mantinham em torno de  $10^6$  UFC/g, enquanto a 20 e 30°C só se detectava a produção de toxina quando as populações eram maiores do que  $10^7$  UFC/g.

A produção da toxina emética foi observada em vários alimentos, inclusive arroz, por Agata et al. (2002), pela inoculação de cepas eméticas em 14 amostras de diferentes alimentos, incubadas por 24 horas a 20°C, 30°C e 35°C. Em arroz cozido, *B. cereus* cresceu rapidamente até  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g e a produção de toxina emética a 30°C e 35°C foi expressiva. Os autores relataram que, mesmo a 20°C a produção de toxina emética em arroz cozido ocorreu em tempo relativamente curto, após dezesseis horas.

Em cereal desidratado à base de arroz, Jaquette e Beuchat (1998) avaliaram a sobrevivência e crescimento de cepas psicrotróficas, tendo o produto sido reconstituído para alimentação infantil. Os resultados evidenciaram a presença de baixos números de esporos de *B. cereus* no material em estudo. Após reconstituição com leite ou suco, a toxina era produzida dentro de 24 horas a 30°C. Mesmo em temperatura abaixo de 8°C houve crescimento, mas sem produção de toxina.

Desde a década de 1980, Bryan et al. (1981) chamavam a atenção para o fato de que o arroz deve ser cozido em pequenas quantidades, usadas imediatamente após o preparo, pois o hábito de se manter o arroz cozido à temperatura ambiente, comum em nosso meio, contribui para aumentar os riscos da multiplicação de *B. cereus*, alcançando níveis perigosos (Bryan et al., 1997; Jermini et al., 1997).

Em leite e derivados, os microrganismos constituem um importante risco potencial para a saúde dos consumidores. Os esporos de *B. cereus*, presentes no leite antes do tratamento térmico, podem sobreviver a altas temperaturas, vindo a germinar e crescer, alcançando níveis que alteram o produto e podem determinar a ocorrência de intoxicações. Borge et al. (2001) relataram que a presença de *B. cereus* em leite representa um foco de interesse, no que diz respeito ao processo de pasteurização. Não destruídos, os esporos podem germinar durante o armazenamento em baixa temperatura, representando um problema econômico e sanitário.

Dufrenne et al. (1994) isolaram 30 cepas de *B. cereus* a partir de amostras de alimentos e ambientes, algumas das quais associadas a casos de intoxicação, para avaliar características de sobrevivência, crescimento e produção de enterotoxina como parâmetros na produção segura de alimentos. Valores  $D_{90^\circ\text{C}}$  até >200 min foram relatados, bem como cepas psicrotróficas, capazes de comprometer produtos pasteurizados, armazenados em temperatura de geladeira. Como todas as cepas exibiram capacidade de produzir toxina diarréica, ficou evidente a importância da presença do patógeno, mesmo sob armazenamento frio, em torno de 10°C.

Lin et al. (1998) identificaram as fontes de contaminação de 232 amostras coletadas na linha de processamento de pasteurização do leite, relatando que 10% do total das amostras examinadas apresentavam contaminação por *B. cereus*, ao final da produção.

Na Europa, muitos países mantêm ativos sistemas de vigilância sanitária e incluem testes de identificação de *B. cereus* ao diagnosticar agentes de surtos. Disso resulta que o microrganismo representa uma das principais causas de doença de origem alimentar, segundo citações de Azeredo (1998). Dados do CDC mostram que, nos Estados Unidos, entre 1993 e 1997, foram registrados 14 surtos envolvendo 691 enfermos. Entre 1991 e 2000, em Taiwan, foram relatados 274 surtos de doenças de origem alimentar, originados predominantemente em ambiente doméstico e em escolas. Desses, 171 foram causados por bactérias, sendo *B. cereus* responsável por 113 (41%) do total (Chang e Chen, 2003). Na Inglaterra e País de Gales registraram-se 29 surtos atribuídos ao consumo de arroz contaminado por *B. cereus*, entre 1992 e 1996, com 164 pessoas afetadas.

Mesmo em países como o Brasil, onde os dados relativos a intoxicações alimentares atribuídas a *B. cereus* são escassos, pode-se deduzir sua importância epidemiológica. Investigações da Vigilância Sanitária Municipal, em Campinas, entre 1987 e 1993, levaram a evidências de que *B. cereus* foi incriminado em 68,4% dos surtos comprovados, segundo Passos e Kuaye (1996). Dados anteriores, apresentados por Salzberg et al. (1982), levaram a suspeitar do microrganismo na etiologia de um surto de diarreia registrado em dois restaurantes universitários. Por meio de dados disponíveis no SIRVETA (2003), relativos ao período 1993 - 2003, em nove países da América Central e do Sul foram registrados 27 surtos envolvendo *B. cereus*, atingindo 657 pessoas, sem nenhum óbito; no mesmo registro, cinco surtos foram atribuídos a *B. cereus*, no Brasil, com 26 enfermos. Entre os dados divulgados pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo relativos ao ano de 2002, são relatados três surtos atribuídos a *B. cereus*, envolvendo 45 casos (CVE/SES-SP, 2003).

Rajkowsky e Mykolajcik (1987) mencionaram a possibilidade de que a importância de *B. cereus* como agente etiológico de surtos de intoxicações alimentares seja subestimada, seja porque os laboratórios não o procuram de forma rotineira, seja pela semelhança de sintomas com intoxicações produzidas por outros microrganismos, que pode levar a diagnósticos equivocados. Granum

(1997) atribuiu à curta duração das doenças e ao acometimento de pequenos números de pessoas, em ambientes domésticos, as deficiências nos registros de surtos, tanto na literatura como em estatísticas oficiais.

#### **2.4. Controle de riscos de intoxicações alimentares por *Bacillus cereus***

Nos últimos anos tem-se intensificado a preocupação com a produção higiênica de alimentos e com a proteção do consumidor. Ainda que se reconheça que a obtenção de alimentos absolutamente isentos de contaminação não é viável, todo o esforço deve ser dirigido ao controle de fatores que aumentam os riscos. As operações de resfriamento dos alimentos ocupam lugar de destaque entre esses fatores, (Schlundt, 1999).

Nos Estados Unidos, entre 1977 e 1982, foram estudados diversos surtos de doenças de origem alimentar, com o objetivo de identificar os principais patógenos e respectivos veículos alimentares envolvidos, bem como os fatores que contribuíram para esses surtos. Os dados foram comparados com outros, obtidos entre 1961 e 1976, levando à conclusão de que o cozimento inadequado e a exposição do alimento à temperatura ambiente ou a condições abusivas de resfriamento foram associados à causa da maioria dos surtos, em ambos os períodos. As intoxicações por *B. cereus* foram atribuídas especialmente ao cozimento impróprio ou à manutenção em temperatura abusiva por 12 horas ou mais, entre as fases de preparo e consumo do alimento (Bryan, 1988).

Bryan et al. (1997) e Jermini et al. (1997) comprovaram que o hábito de se manter o arroz cozido à temperatura ambiente realmente contribui para aumentar os riscos da multiplicação de *B. cereus* até níveis perigosos. Segundo observações de Azeredo (1998), ocorrendo a exposição do alimento a temperaturas entre 22 e 46°C, pode-se prever rápida multiplicação do patógeno, de sorte que aumentos de cinco ou mais ciclos logarítmicos podem ser previstos em alimentos submetidos a operações de resfriamento lentas. Populações de *B. cereus* próximas de  $10^7$  UFC/g foram observadas em amostras de arroz mantidas por várias horas a 26°C, recolhidas de cantinas universitárias, segundo relato de Harmon e Kauter (1991).

Notermans et al. (1997) apresentaram um estudo de estimativa do risco de *B. cereus* presente em leite pasteurizado. Entende-se o processo de *risk assessment* como a 'estimativa da probabilidade de que um efeito adverso poderá ocorrer, comprometendo o consumidor'. Uma estimativa de risco consiste, assim, em identificar o perigo, avaliar a exposição e a dose-resposta e caracterizar o risco. No caso em questão, a 'identificação do perigo' representou o potencial de o leite apresentar contaminação por *B. cereus* e, assim, causar efeitos adversos à saúde do consumidor. A 'avaliação da exposição' é a estimativa da quantidade (dose) desse patógeno a que a população será eventualmente submetida. O 'estabelecimento da dose-resposta' resulta de análises epidemiológicas, relacionando o nível de exposição ao agente (população presente nos alimentos incriminados, ou quantidade de toxinas) com o aparecimento das doenças. 'Caracterização do risco' é o processo de identificar e quantificar os fatores envolvidos no risco de haver uma exposição a níveis não aceitáveis de um agente, no caso em questão, *B. cereus*, no momento do consumo do leite. No estudo desenvolvido, os resultados obtidos permitiram estabelecer um limite de sete dias para armazenagem de leite, a 7°C ou menos, para garantir populações menores do que 10<sup>5</sup> UFC/mL. Os estudos de estimativa de risco representam uma grande ajuda para a prevenção das doenças de origem alimentar e controle de seus agentes.

A contaminação e multiplicação dos microrganismos dependem de propriedades intrínsecas e extrínsecas dos alimentos (McMeekin et al., 1992). A temperatura - fixa ou flutuante - é um dos mais importantes fatores que influenciam o desenvolvimento da população microbiana (Dooley e Roberts, 2000; Bréand et al., 1997). A associação temperatura x tempo tem sido muito estudada, para controlar, eliminar ou reduzir o número de microrganismos durante as fases de processamento, manipulação e distribuição dos alimentos, objetivando seu consumo seguro pela população. Como cada microrganismo apresenta peculiaridades de comportamento em relação a esses fatores, os estudos para conhecer as possíveis respostas a condições de uso habitual permitem a orientação de medidas de controle eficazes. Uma das estratégias tecnológicas tem sido a aplicação de 'barreiras', baseadas nas respostas fisiológicas dos microrganismos, valendo-se do controle de parâmetros como temperatura, tempo de exposição, pH do alimento etc. (Leistner 2000).

Uma ferramenta que pode ser extremamente útil para prever e, assim, intensificar medidas de controle das intoxicações por patógenos, é a microbiologia preditiva. O uso de equações matemáticas para descrever o comportamento microbiano tem recebido, desde a década passada, considerável atenção. Mesmo anteriormente, a partir dos anos 40, alguns trabalhos foram desenvolvidos, conforme citações de Ross (1993). O conceito de microbiologia preditiva parte da suposição de que respostas de microrganismos a fatores do meio podem ser expressas por equações matemáticas (Ross e McMeekin, 1994; Skinner et al., 1994).

A capacidade de crescimento de microrganismos em substratos alimentares vem sendo avaliada, historicamente, em condições de laboratório, por meio de estudos de inoculação e contagem das populações, ao longo de um determinado período. Um grande avanço nesse campo deve-se ao uso de modelos matemáticos, de forma que equações descrevem a cinética de crescimento em função de determinados parâmetros, especialmente temperatura, pH e atividade de água (Wilson et al., 2002). A modelagem preditiva tem sido proposta de forma a reduzir gastos com tempo e materiais normalmente despendidos em experimentos de laboratório (Buchanan e Whiting, 1996).

O desenvolvimento desses modelos para prever o crescimento microbiano em alimentos se inicia com a obtenção de dados experimentais de forma que o padrão de crescimento é identificado e o modelo é construído, em função de uma ou mais variáveis (McClure et al., 1994; Skinner et al., 1994). Esses estudos vêm sendo utilizados pelas indústrias de alimentos por permitirem, com a previsão do crescimento de microrganismos, obter uma estimativa razoavelmente precisa acerca da vida de prateleira de produtos perecíveis, como carne (Shimoni e Labuza, 2000), peixe (Dalgaard, 1995; McMeekin et al, 1992) e derivados de leite (Griffiths, 1994).

Vários trabalhos usando modelos matemáticos foram desenvolvidos, em estudos de crescimento ou de resistência térmica de *B. cereus*. Sutherland et al. (1996) testaram a validação de um modelo de crescimento do microrganismo, em meio de cultura, influenciado por condições de temperatura, pH, concentração de NaCl e CO<sub>2</sub>. Os dados estimados foram comparáveis a registros da literatura, relativos a alimentos como leite, carnes e produtos à base de carboidratos.

Chorin et al. (1997) modelaram o crescimento de *B. cereus* em meio laboratorial, em função de temperatura, pH e atividade de água. Os resultados preditos apresentaram alto coeficiente de correlação com os dados experimentais obtidos no estudo, porém os autores recomendaram a continuidade das pesquisas em substratos alimentares.

McElroy et al. (2000) desenvolveram estudos preditivos do crescimento de *B. cereus* a 15, 20 e 30°C, em meio de arroz. Os autores relataram que seus dados foram condizentes com trabalhos de Johnson et al. (1983) e Gilbert et al. (1974), com relação a características de crescimento do microrganismo em meio de arroz.

A cinética do crescimento de diversas cepas de *B. cereus*, em meio de arroz, sob diferentes temperaturas, foi avaliada por Azeredo et al. (2002). Um modelo proposto por Zwietering et al. (1991) foi ajustado aos dados experimentais e permitiu estimar populações que evidenciaram os perigos que podem advir da exposição do alimento a operações lentas de resfriamento.

Modelo semelhante foi utilizado por Choma et al. (2000), para testar o efeito de temperaturas entre 5 e 40°C nas características de crescimento de *B. cereus*, em meio de abobrinha e em meio de cultura enriquecido. O modelo revelou-se adequado, comparado aos dados obtidos experimentalmente.

Considerando a falta de dados na literatura especializada, o segmento dos Serviços de Alimentação não parece, via de regra, ter acesso a modelos de tal natureza, aplicáveis às condições desses locais. Da mesma forma, estudos em ambientes domiciliares são raros, embora não se possa questionar sua validade. Evidenciando esse potencial, um modelo matemático foi utilizado por Delignette-Muller e Rosso (2000), adotando como parâmetros 'crescimento' e 'armazenamento de leite pasteurizado em geladeiras domésticas' com temperaturas não uniformes. A variação das condições de armazenamento levou ao crescimento de *B. cereus* em leite, revelando que o controle da refrigeração pode ser de grande importância na qualidade sanitária de alimentos, no momento de seu consumo.

Nauta et al. (2003) usaram um modelo preditivo para avaliar a exposição de consumidores ao risco de intoxicações por *B. cereus*, em vegetais refrigerados e prontos para o consumo, avaliando o crescimento do microrganismo durante processamento, transporte, comercialização e armazenamento dos produtos em

refrigeradores domésticos. Embora o modelo não tenha sido validado, os autores sugeriram a necessidade de reduzir a temperatura dos refrigeradores abaixo de 4°C e de exercer monitoramento da contaminação dos produtos prontos, como medidas de segurança para a saúde.

Há, entretanto, ocasiões em que ocorrem discrepâncias entre o modelo e o crescimento observado, em geral com os valores preditos superando valores obtidos experimentalmente. Na verdade, pior seria o contrário, caso em que o modelo levasse a subestimar o crescimento microbiano e a uma falsa idéia de segurança. Seja como for, o aperfeiçoamento dos modelos depende da continuidade dos estudos e as vantagens de seu uso não podem ser ignoradas (Wilson et al., 2002).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

#### **3.1. Alimentos**

Os alimentos que serviram para compor os substratos de crescimento foram adquiridos no comércio local: arroz (polido, classe 'longo', variedade 'EEA 406', tipo 1); açúcar refinado; leite em pó integral; canela em pó e sal de cozinha.

#### **3.2. Microrganismos**

A pesquisa foi desenvolvida com as cepas de referência NCTC 11145, de tipo diarréico, e NCTC 11143, de tipo emético, adquiridas da *National Collection of Type Cultures* por intermediação da Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello, Campinas, SP.

#### **3.3. Ativação das culturas de *Bacillus cereus***

Amostras das cepas de *B. cereus*, em forma liofilizada, foram hidratadas com 1 mL de solução salina a 0,9%. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas na superfície das placas contendo meio de ágar MYP, seletivo para *B. cereus*. O preparo desse meio de cultura seguiu a descrição do Bacteriological Analytical Manual (BAM, 1995), no entanto, uma vez que o trabalho foi desenvolvido com culturas puras, foi suprimida a adição de Sulfato de Polimixina - B, já que sua adição inibitória e seletiva não se fazia necessária.

Depois do período de incubação a 35°C por 18 a 24 horas, amostras das colônias típicas foram isoladas em forma de estrias em superfícies de placas contendo o mesmo meio seletivo e submetidas a idêntico procedimento de incubação. Verificada a pureza do material, por observação em microscópio de características morfológicas e coloração de Gram, amostras das colônias foram transferidas para tubos contendo ágar nutriente inclinado e mantidas em refrigerador até o momento do preparo das suspensões de esporos.

### **3.4. Planejamento experimental**

A pesquisa compreendeu dois experimentos. No primeiro, o crescimento de duas cepas de *B. cereus* em meio de arroz-doce foi avaliado em função de seis tratamentos de temperatura. As cepas foram testadas, a cada temperatura, sob as mesmas condições experimentais. Os testes foram feitos segundo duas repetições.

No segundo experimento, cada cepa foi submetida a uma operação de resfriamento particular, caracterizando uma operação de resfriamento lento para cada microrganismo testado.

Em ambos os experimentos, as contagens dos números de UFC foram tomadas a partir de amostras (tubos inoculados) em duplicata e, para cada amostra, sementeiras em duplicata de duas ou mais diluições do material em teste.

O ajuste do modelo de Zwietering et al. (1991) aos dados obtidos experimentalmente foi desenvolvido utilizando o *software* ORIGIN® - versão 5.0, da Technical Graphics and Data Analysis in Windows®, Micrococcal Software, Inc.

### **3.5. Avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce a diferentes temperaturas**

#### **3.5.1. Preparo das suspensões de esporos**

Procedeu-se, inicialmente, à ativação das colônias conservadas em refrigerador, a 4°C, transferindo-se amostras dessas colônias para tubos contendo ágar nutriente inclinado. O preparo das suspensões de esporos iniciou-se após a terceira repicagem, quando havia uma grande massa de células formadas na superfície dos referidos tubos. A cada um dos tubos, então, adicionou-se 0,5 mL da solução salina esterilizada para remover a massa celular, com auxílio de alça de platina. Essas suspensões de células foram usadas para inocular, em superfície, o meio de esporulação previamente preparado em frascos *Schott* de 1.000 mL, devidamente identificados de acordo com a cepa correspondente.

O meio para cultivo dos esporos foi elaborado conforme proposta de Martin e Blackwood (1972), usando caldo nutriente suplementado com

0,01% MnSO<sub>4</sub>, 1% de amido e 2% de ágar. Cada cepa foi cultivada em quatro frascos, cujo meio foi solidificado com o frasco tombado, de forma a aumentar a superfície para o cultivo dos esporos.

Depois de um período de incubação de 48 a 72 horas a 35°C e, em seguida, 72 a 96 horas a 5°C, os esporos de cada frasco foram removidos com auxílio de bastões de vidro estéreis e suspensos em 20 mL de água destilada esterilizada. Ao final, dispunha-se de quatro amostras de cada uma das suspensões concentradas de esporos, relativa a cada cepa. Em seguida, cada alíquota de 20 mL foi transferida para tubo de centrífuga com capacidade de 50 mL, também esterilizado, e levado à centrifuga com autonomia para dez tubos devidamente equilibrados, seguindo a programação de 5.000 g por 20 minutos, com temperatura ajustada em 4°C, adotando procedimento descrito por Wescott et al. (1995). Esse procedimento foi repetido cinco vezes, descartando o sobrenadante, de forma a concentrar as suspensões com  $\geq 98\%$  de esporos refrateis.

Após a última centrifugação, adicionaram-se 10 mL de água destilada a cada tubo e submeteu-se o material à agitação, para desprender e transferir os esporos para frascos contendo 50 mL de água destilada e pérolas de vidro. Após contagem, as suspensões foram acrescidas de água destilada até padronizar as populações em, aproximadamente,  $10^9$  esporos/mL. Desta forma, dispunha-se de quatro frascos relativos a cada cepa, constituindo as suspensões-estoque, as quais foram armazenadas a 4°C.

### **3.5.2. Preparo do meio de arroz-doce**

O meio de arroz-doce, utilizado em toda a pesquisa como substrato de crescimento para os microrganismos em estudo, foi preparado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, providos de tampas de aço inoxidável, sendo elaborado com a seguinte composição: 4,0 g de arroz; 2,4 g de açúcar; 0,032 g de sal; 0,016 de canela em pó e 14 mL de leite reconstituído conforme instruções de rótulo. Essa formulação foi feita seguindo exatamente as mesmas proporções adotadas por um restaurante institucional e apresentava-se similar à uma típica preparação de uso domiciliar. A relação aproximada de duas partes de líquido (14 mL) para uma de sólidos (6,45 g) apresentou-se em conformidade com o meio formulado por Azeredo et al. (2002).

Os tubos contendo os ingredientes relacionados foram levados à autoclave a 121°C por 15 minutos, tornando o meio uma réplica do alimento pronto para consumo. Partindo dessas formulações, cada tubo apresentou, após ser esterilizado, cerca de 20 gramas de substrato pronto para receber o inóculo, com a seguinte composição de macronutrientes:

**Tabela 3.1.** Composição do meio de arroz-doce utilizado como substrato de crescimento.

Constituintes	Quantidade (g)	glicídeos (g)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Valor energético (kCal)
Açúcar refinado	2,4	2,38	0	0	9,55
Arroz polido cru.	4,0	3,19	0,29	0,02	14,10
Canela	0,016	-	-	-	-
Leite de vaca integral	14,0	0,68	0,5	0,42	8,50
Sal refinado	0,032	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>20,44</b>				<b>32,15</b>

Fonte: FRANCO, G. Tabela de Composição Química dos Alimentos, 1998.

### 3.5.3. Determinação das taxas máximas de crescimento ( $\mu$ ) e dos tempos de geração (G) relativos a cada microrganismo e temperatura, testadas

Inicialmente, antes da inoculação, amostras das suspensões de esporos, correspondentes a cada cepa, foram transferidas para frascos esterilizados e rediluídas com água destilada esterilizada, de forma a permitir que o material a ser inoculado viesse a apresentar uma população inicial próxima de  $10^2$  esporos/g. Em seguida, alíquotas de 15 mL dessas suspensões foram transferidas para tubos de ensaio tampados e esterilizados, para serem submetidas a choque térmico a 70°C em banho-maria, durante 15 minutos, segundo preconiza Johnson et al. (1984). Findo esse tempo, esses tubos foram mergulhados em banho de gelo, para interromper o tratamento térmico.

Cada tubo contendo o substrato de crescimento - 20 g de arroz-doce - foi inoculado com 0,5 mL de suspensão assim tratada, e a população de *B. cereus* situou-se, sempre, dentro dos limites pré-estabelecidos. Como cada cepa foi testada em separado e de forma a observar o crescimento ao longo de

toda a fase exponencial, foram inoculados entre sete e dez duplicatas de tubos, por estirpe estudada e a cada temperatura.

O material de cada tubo foi, então, transferido para saco de plástico esterilizado e homogeneizado em digestor tipo *stomacher*, sendo devidamente lacrado para evitar contaminação. Ao final, quando todos os pares de tubos haviam sido inoculados, eram transferidos para estufas de incubação, de acordo com a temperatura em teste, a saber: 10, 15, 22, 30, 37 e 45°C, incluídas na faixa em que o crescimento de *B. cereus* é esperado (Azeredo, 1998). A observação do crescimento das cepas, a cada temperatura e por repetição, demandou uma semana, de forma que essa fase da pesquisa estendeu-se por 12 semanas.

A partir do tempo zero e a intervalos convenientes, duplicatas das amostras de cada cepa, foram retiradas e homogeneizadas em *stomacher*, com 180 mL de solução peptonada esterilizada, obtendo-se uma diluição inicial de  $10^{-1}$ . A partir dessa diluição, foram feitas as diluições em série apropriadas, tendo o cuidado de semear alíquotas de, pelo menos, duas diluições, para evitar falhas na contagem. Para cada tubo, as sementeiras foram feitas em duplicata, em placas contendo ágar MYP, as quais foram incubadas a 30°C por, aproximadamente, 20 horas, para que os tamanhos reduzidos das colônias facilitassem sua contagem (Azeredo, 1998).

Os intervalos para retiradas das amostras e contagens das UFC foram estipulados mediante consulta à literatura (Azeredo, 1998), segundo expectativa de crescimento do microrganismo a cada temperatura (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Intervalos entre contagens de *Bacillus cereus* em meio de arroz, a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Intervalos (h)
10	0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192
15	0, 8, 16, 24, 30, 35, 48, 60
22	0, 4, 8, 12, 16, 20, 24
30	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12
37	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12
45	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12

Os dados relativos aos números de microrganismos, a cada intervalo, permitiram a obtenção das curvas de crescimento, a cada temperatura, expressas como logaritmos dos números de UFC, em função do tempo de incubação. Foram selecionados os segmentos correspondentes às taxas de crescimento exponencial e, por regressão linear, calculados os coeficientes angulares segundo cada temperatura de exposição. Esses coeficientes, denominados  $\mu(T)$ , expressaram o aumento das populações de microrganismos em ciclos logarítmicos por hora.

Os tempos de geração (**G**), ou o número de minutos necessários para duplicar o número de microrganismos, foram calculados com base na Equação 1.

$$G = \log 2 / \mu(T) \quad \text{Equação 1}$$

### 3.6. Ajuste de um modelo proposto para estimar o crescimento de microrganismos, em função da temperatura, aos dados experimentais

Uma equação proposta por Zwietering et al. (1991) para estimar o crescimento de microrganismos em função da temperatura, foi utilizada nesta pesquisa para verificar sua confiabilidade ao estimar o crescimento de *B. cereus* em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento. Esta equação, aqui denominada Equação 2, permite estimar as taxas máximas de crescimento microbiano ao longo de uma ampla faixa de temperatura e apresenta-se como:

$$\mu(T) = [a(T-T_{\min})]^2 \cdot \{1-\exp[b \cdot (T-T_{\max})]\} \quad \text{Equação 2}$$

em que  $\mu(T)$  representa a taxa máxima de crescimento em função da temperatura, compreendendo o intervalo que pode comportar crescimento de cada cepa estudada, entre  $T_{\min}$  e  $T_{\max}$  (mínima e máxima temperaturas que limitam essa faixa de crescimento potencial). Os valores de  $T_{\min}$  e  $T_{\max}$ , bem como as letras **a** e **b**, representam parâmetros obtidos pelo ajuste.

### **3.7. Avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* em meio-arroz doce, durante resfriamento**

O crescimento dos microrganismos, em meio de arroz-doce, foi acompanhado ao longo de uma operação lenta de resfriamento, cujo monitoramento e registro de temperaturas foi feito utilizando um aparelho de aquisição de dados com doze canais de varredura (*12-Channel Scanning Thermocouple Thermometer*, da Cole-Parmer) e termopares de tipo T, de cobre constantan.

Oito duplicatas de tubos de ensaio, contendo 20 g do meio descrito em 3.4.2 e equilibradas a uma temperatura entre 48 e 49°C, foram inoculadas com alíquotas de 0,5 mL das suspensões de esporos de *B. cereus* (obtidas segundo 3.4.1), de forma a se partir de uma população inicial estimada em torno de  $10^2$  esporos/g de meio.

Uma das duplicatas foi imediatamente homogeneizada para os procedimentos de diluição e semeadura em ágar MYP, para contagem da população inicial, relativa ao tempo zero do experimento.

Em seguida, os tubos foram colocados em recipiente isotérmico, contendo arroz cozido com temperatura equilibrada, também, entre 48 e 49°C. O tamanho da batelada de arroz cozido (em torno de 3,5 kg) foi estabelecido em testes preliminares, de forma a proporcionar um declínio lento de temperatura, simulando uma situação real de resfriamento desse alimento. Essa operação prolongou-se por 12 h, de forma a que o material em estudo exibiu uma taxa de resfriamento média em torno de 2 a 2,5°C/h, até equilibrar-se à temperatura ambiente.

Para monitorar e registrar as temperaturas, foram inseridos quatro sensores em tubos não inoculados, contendo o mesmo meio de arroz-doce. Assim como os tubos inoculados, os quatro tubos onde esses sensores foram inseridos estavam posicionados equidistantes do centro da batelada de arroz cozido, a qual serviu de suporte para sua colocação.

As amostras (tubos inoculados, em duplicata) foram retiradas a cada 2 h de intervalo e submetidos a resfriamento em banho de gelo, de modo a paralisar o crescimento dos microrganismos. Foram desenvolvidos, então, os procedimentos de homogeneização e diluição seriada, para contagem do número de unidades formadoras de colônias, em placas contendo meio MYP.

Durante todo o tempo, foram feitas tomadas de temperatura de resfriamento do meio de arroz-doce, por meio dos termopares. O equipamento era acoplado a um microcomputador e os registros de temperatura se fizeram de minuto em minuto, durante os 720 min de duração de cada ensaio, um relativo a cada cepa. Assim se obtiveram, a cada ensaio, medidas de temperatura que permitiram construir curvas de resfriamento de arroz-doce em função do tempo, ou seja, valores de temperatura (T) em função do tempo (t).

Por outro lado, as contagens dos microrganismos, a cada intervalo, levaram à construção de curvas de crescimento das cepas estudadas, naquele substrato, ao longo do tempo de exposição ao resfriamento.

### **3.8. Estimativas e dados experimentais relativos ao crescimento de *Bacillus cereus* em meio-arroz doce, durante operação de resfriamento**

No presente trabalho, a equação de Zwietering et al. (1991) foi ajustada aos dados experimentais de crescimento de *B. cereus* em meio de arroz-doce, entre 10 e 45°C e, a partir desse ajuste, foi possível estimar as taxas máximas de crescimento, em função da temperatura, ao longo de toda a faixa limitada pelos valores  $T_{min}$  e  $T_{max}$  correspondentes a cada cepa.

Partindo dos dados obtidos, conforme descrição em 3.4.5, relativos às medições de temperatura de arroz-doce em função do tempo, durante resfriamento, foi possível estabelecer, para cada instante de tempo (t) uma temperatura (T) e, assim, obter os dados de taxas máximas de crescimento em função do tempo, ou  $\mu(T)$ . As estimativas desses valores puderam ser utilizadas para construir curvas preditivas de crescimento, em função do tempo, a partir da Equação 3.

$$N = N_0 \cdot 10^{\mu(T) \cdot t} \quad \text{Equação 3}$$

Em que **N** representa a magnitude da população no instante **t**, **N<sub>0</sub>** representa a população inicial e  $\mu(T)$  é a taxa de crescimento, obtida pelo ajuste, expressa em relação ao tempo.

Os valores estimados foram, então, comparados aos dados experimentais obtidos anteriormente, relativos ao crescimento das cepas estudadas, durante a operação de resfriamento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do crescimento de *Bacillus cereus*, em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas

Essa etapa consistiu de seis ensaios, correspondentes às seis temperaturas testadas, cada um deles desenvolvido simultaneamente com cada uma das duas cepas estudadas: *B. cereus* NCTC11143 (tipo emético) e NCTC11145 (tipo diarréico), em duas repetições. Vinte e quatro curvas de crescimento (Figuras 4.1 a 4.4) foram construídas a partir dos resultados, expressando o crescimento dos microrganismos em log UFC/h.

As taxas máximas de crescimento, obtidas a partir dos segmentos relativos à fase exponencial, são apresentadas na Tabela 4.1, detalhando cepas e temperaturas. Na Tabela 4.2 foram registrados os tempos, em minutos, necessários para duplicar as populações (valores G), excluídas as observações relativas à temperatura de 10°C, em razão de terem sido calculados valores muito altos, superiores a 3.000 min.

O crescimento de ambas as cepas, inoculadas no meio de arroz-doce, foi bastante evidente na faixa de temperatura entre 15 e 45°C. Especialmente a 30 e 37°C, as taxas calculadas revelaram intensa capacidade de multiplicação naquele substrato, com tempos G registrados entre 28 e 40 min. No entanto, a 10°C o crescimento foi inexpressivo, mesmo após 192 h de incubação. Talvez isso se deva a uma fase *lag* muito longa desses microrganismos, sob tais condições, ou dependa do controle de outras variáveis, suposições que encontram suporte em relatos de experimentos envolvendo *B. cereus*. Na faixa de temperatura entre 5 a 10°C, Choma et al. (2000) não observaram crescimento em substrato comum, somente em meio enriquecido e sob determinadas condições de pH e aeração. Somente após 14 dias a 8°C, Lin et al. (1998) observaram o crescimento de cepas psicrófilas, previamente cultivadas em substrato enriquecido e inoculadas em amostras de leite. Dufrenne et al. (1994) não relataram crescimento para a maioria de 31 cepas de *B. cereus* depois de quatro semanas de incubação a temperaturas abaixo de 11°C, ainda que algumas tenham crescido segundo tempos de geração maiores do que 200 min.

Observou-se, neste trabalho, que ambas as cepas exibiram crescimento a 15°C (Figura 4.1 e 4.3), registrando-se aumentos populacionais de, aproximadamente, três ciclos logarítmicos, após um período de incubação de 60 horas. A cepa diarréica pareceu reagir melhor a essa temperatura do que a cepa emética, considerando os tempos de geração observados, de 225 e 261 min, respectivamente (Tabela 4.2).

**Tabela 4.1.** Taxas máximas de crescimento ( $\mu$ ) de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas, expressas em ciclos  $\log.h^{-1}$

Microrganismos	Temperaturas (°C)					
	10	15	22	30	37	45
Cepa emética	0,0043	0,0692	0,2374	0,5005	0,6493	0,3923
Cepa diarréica	0,0054	0,0802	0,2494	0,4525	0,5762	0,3757

**Tabela 4.2** - Tempos de geração (G) de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce, a diferentes temperaturas, expressos em minutos

Microrganismos	Temperaturas (°C)				
	15	22	30	37	45
Cepa emética	261	76	36	28	46
Cepa diarréica	225	72	40	31	48

A 22°C o crescimento foi bem maior do que a 15°C, evidenciando-se aumentos da população inicial da cepa emética em torno de quatro ciclos logarítmicos, enquanto a cepa diarréica exibiu aumentos de até cinco ciclos, após apenas 24 h de incubação. Novamente se verificou que a cepa diarréica pareceu mais bem adaptada a temperaturas abaixo da faixa ideal.

Por outro lado, entre 30 e 45°C a cepa emética apresentou menores tempos de geração do que a cepa diarréica, o que condiz com observações de Fermanian et al. (1994) que relataram melhor adaptação das cepas eméticas a temperaturas acima da faixa ideal. Segundo Gilbert et al. (1974), a maior tolerância dos tipos eméticos a temperaturas mais altas contribui, inclusive, para a sobrevivência e crescimento dessas cepas em arroz cozido.

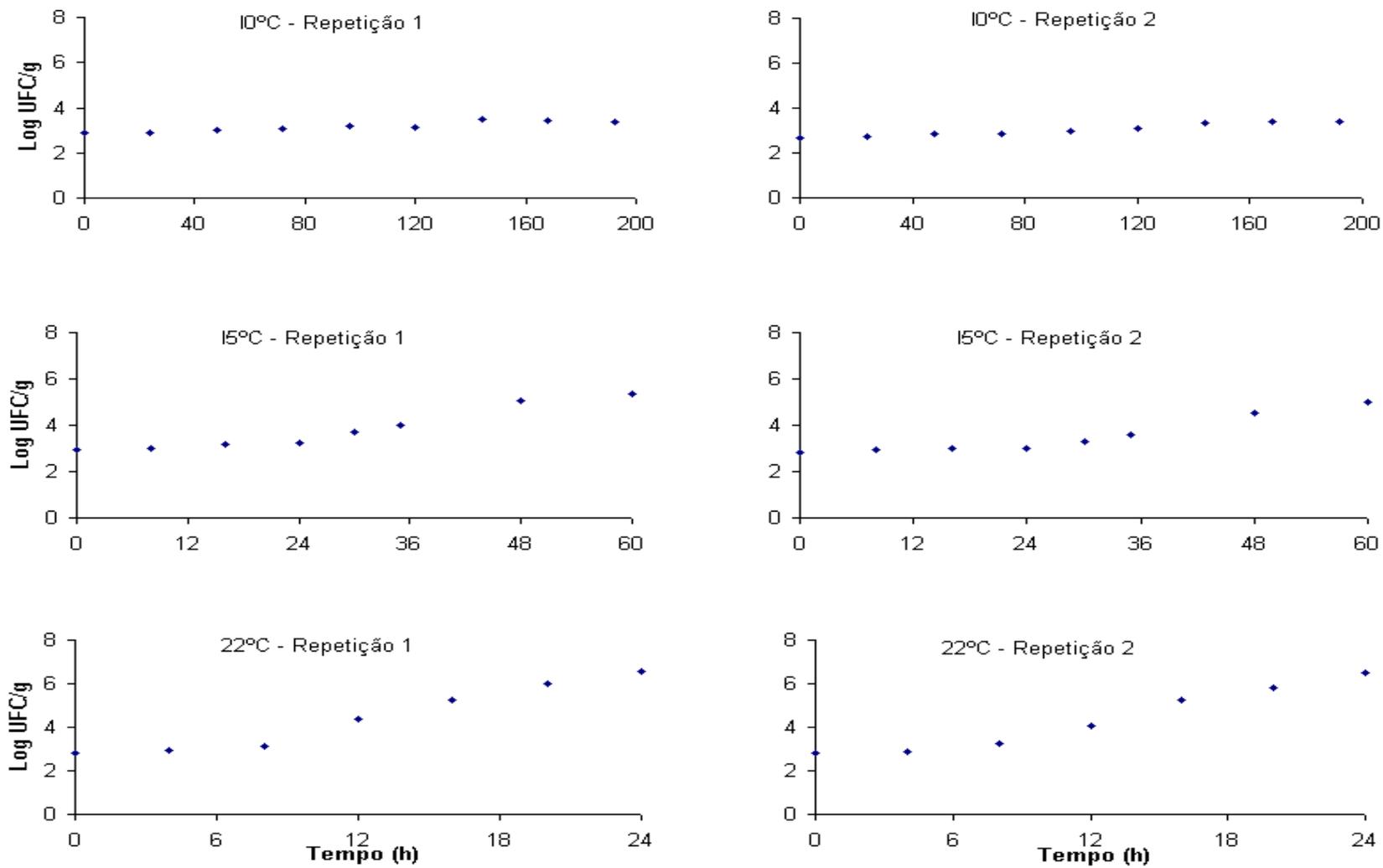
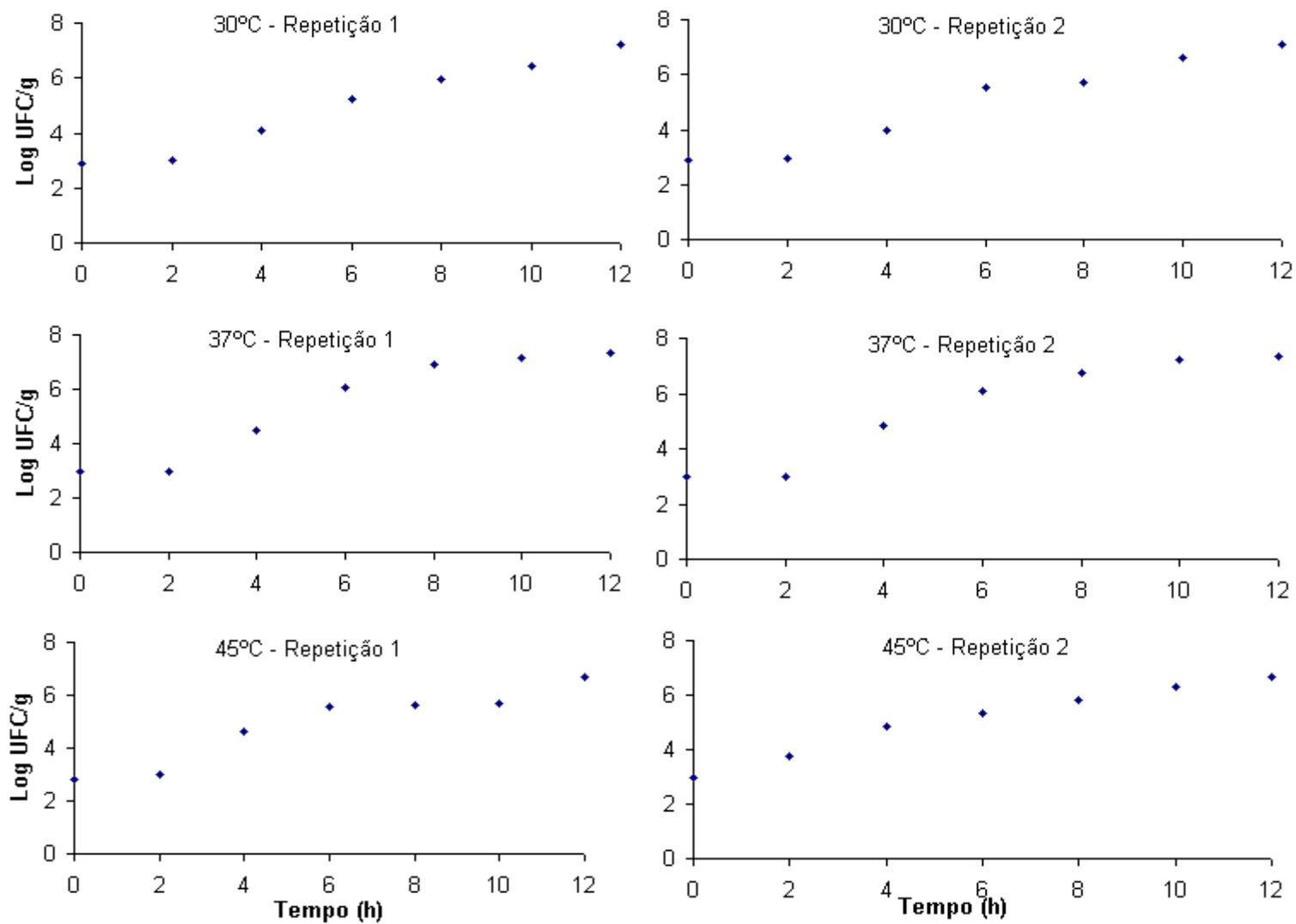


Figura 4.1. Crescimento da cepa emética em meio de arroz-doce, a 10, 15 e 22°C.



**Figura 4.2.** Crescimento da cepa emética em meio de arroz-doce, a 30, 37 e 45°C.

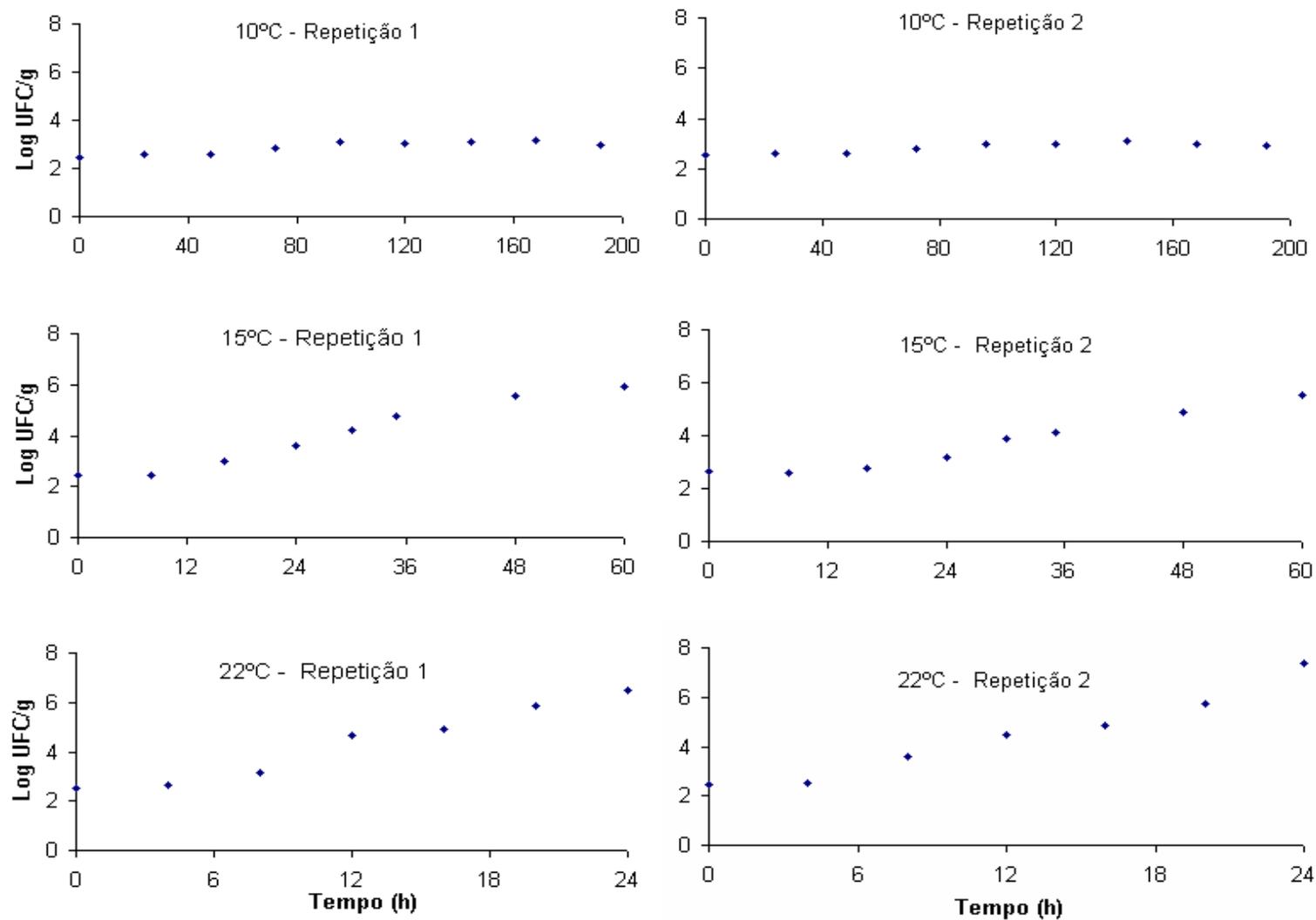
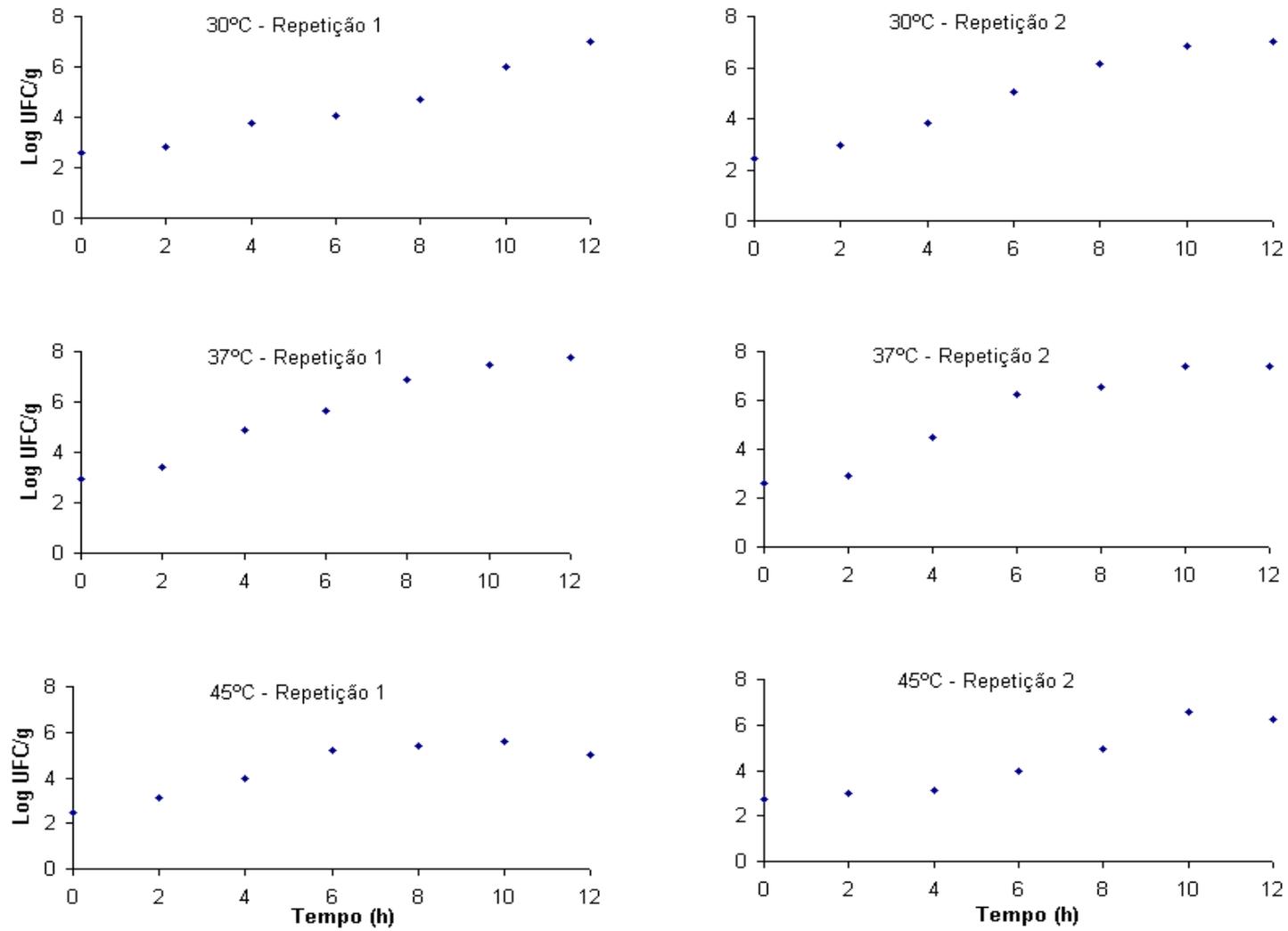


Figura 4.3. Crescimento da cepa diarréica em meio de arroz-doce, a 10,15 e 22°C.



**Figura 4.4.** Crescimento da cepa diarréica em meio de arroz-doce, a 30, 37 e 45°C.

As taxas máximas de crescimento ( $\mu$ ) e os menores tempos de geração (G) foram associados às temperaturas ótimas de crescimento, a 30 e 37°C. Foram calculados valores G de 36 e 28 minutos, para a cepa emética, e para a cepa diarréica, 40 e 31 minutos, respectivamente a 30 e 37°C (Tabela 4.2). A essas temperaturas foram observadas as maiores contagens, de até  $10^7$  microrganismos/grama do alimento, após 12 horas de incubação, revelando aumentos populacionais da ordem de cinco ciclos *log*. Após apenas seis horas de incubação, as contagens das populações chegaram a  $10^5$  UFC/g, números francamente associados por vários autores a episódios de intoxicações alimentares, segundo Azeredo (1998).

A 45°C, o crescimento de ambas as cepas apresentou taxas em franco declínio, evidenciando a proximidade dos limites de temperatura que permitem o crescimento de *B. cereus*, segundo evidências obtidas em diversos estudos (Borge et al., 2001; Azeredo, 1998; Fermanian et al., 1994). O comportamento de onze cepas isoladas de arroz e carne foi estudado por Borge et al. (2001), os quais concluíram que a maioria das cepas apresentava crescimento limitado a temperaturas até 43°C, ainda que uma das cepas tenha mostrado crescimento mesmo a 50°C, após uma fase *lag* de 72 horas.

Os resultados verificados neste estudo são compatíveis, de forma geral, com outros trabalhos envolvendo preparações de arroz, com ou sem adição de leite em suas formulações (Agata et al., 2002; Johnson et al., 1983; Bryan et al., 1981; Gilbert et al., 1974). As populações finais observadas no arroz-doce foram menores do que as observadas por Azeredo et al. (2002), que relataram densidades populacionais de até  $10^9$  UFC/g, partindo de populações iniciais semelhantes às deste trabalho, em estudo envolvendo diversas cepas inoculadas em meio de arroz adicionado de alho, sal e óleo, testadas a várias temperaturas, entre 10 e 45°C.

A sobrevivência e, ou crescimento de cepas de *B. cereus* foram avaliados em substrato de cereal à base de arroz, reconstituído com leite ou suco de maçã, quando sob armazenamento a 15, 21 e 30°C. Isto foi particularmente observado quando o cereal foi reconstituído com leite. A 30°C, a população aumentou 4,42 ciclos *log* em apenas nove horas, sendo evidenciado o potencial de risco representado pela preparação assim armazenada, especialmente para crianças e imunodeprimidos. A 15 e 21°C o

crescimento das cepas veio a exceder o equivalente a seis ciclos *log* depois de 48 e 24 horas, respectivamente (Jaquette e Beuchat, 1998).

Na Espanha, um total de 65 amostras de diferentes sobremesas contendo leite, como pudim de arroz e *mousse* de frutas, elaboradas em estabelecimentos de hotelaria e restaurantes, foram submetidas a análises microbiológicas, e a contaminação média por *B. cereus* foi estimada em níveis abaixo de  $10^2$  UFC/grama (Busto, 2000). Os resultados mostraram que, quando mantidas sob temperatura de refrigeração, as amostras se situaram, geralmente, dentro dos padrões de comercialização e aptas para o consumo. Essa medida preventiva foi endossada por Choma et al. (2000) que, estudando o comportamento do patógeno a temperaturas entre 5 e 13°C, enfatizaram que a maioria das cepas patogênicas de *B. cereus* não é bem adaptado a baixas temperaturas e ressaltaram a importância do controle das temperaturas de refrigeração, de forma a prevenir o seu desenvolvimento.

A produção de toxina em arroz tem sido um fato amplamente constatado em diversos estudos. Agata et al. (2002) avaliaram a produção de toxina emética em vários alimentos, inclusive arroz, e verificaram intenso crescimento nesse substrato, entre 20 e 35°C, com produção de toxina a partir de 30°C. As populações máximas observadas, após 24 h a 30 ou 35°C, chegaram a  $10^8$  UFC/g. A detecção de toxina emética, feita em cultura de células HEP-2, foi sensivelmente maior em arroz e alimentos farináceos do que em preparações à base de carne, ovos e alimentos líquidos.

Vários autores consideram que o enriquecimento de preparações amiláceas com ingredientes protéicos seja favorável ao crescimento de *B. cereus* (segundo citações de Azeredo, 1998; Kramer e Gilbert, 1989), o que seria uma agravante, quando em associação com o uso inadequado de temperatura de armazenamento.

Nesta pesquisa, embora o arroz-doce tenha-se mostrado adequado ao crescimento do patógeno, os resultados não corresponderam à expectativa de favorecimento das populações em teste, considerando relatos de outros autores, a exemplo de Azeredo (1998). É de se supor, então, que outros ingredientes da preparação de arroz-doce tenham interferido negativamente no crescimento das cepas estudadas. O meio, elaborado à base de arroz e leite, foi acrescido de uma mistura de açúcar, canela e sal. Em 20g do produto

pronto, as proporções finais aproximadas foram de 20% de arroz, 12,01% de açúcar, 0,08% de canela, 0,16% de cloreto de sódio e 67,76% de leite integral. Simulando uma preparação típica de arroz-doce, esse substrato apresentou pH em torno de 6,0 ( $\pm$  0,3) e atividade de água 0,99, condições adequadas ao crescimento do microrganismo.

O cloreto de sódio não pareceu afetar o crescimento de diferentes cepas de *B. cereus*, no estudo conduzido por Azeredo et al. (2002), os quais utilizaram 1,15% de sal na preparação de substrato à base de arroz. Também Mahakarnchanakul e Beuchat (1999) observaram crescimento de cepas psicotróficas e mesófilas em preparações à base de batatas e de frango, com até 4% de cloreto de sódio.

Quanto ao açúcar, seu uso em baixas concentrações é considerado como forma de enriquecer os substratos, favorecendo o metabolismo de microrganismos. Dessa forma, Choma et al. (2000) utilizaram 2% de glicose em meio para crescimento de cepas psicotróficas de *B. cereus* (em caldo de abobrinha), a temperaturas abaixo de 20°C. No presente trabalho, mesmo tendo sido utilizada uma concentração de 12%, não se supõe que este tenha sido um ingrediente com efeito inibidor, visto que a atividade de água do meio (0,99) manteve-se ótima para o crescimento de microrganismos em geral. Chorin et al. (1997) observaram que apenas valores inferiores a 0,95 inibiram crescimento de *B. cereus*. Esses dados são compatíveis com os de Raevuori e Genigeorgis (1975), que relataram o mesmo valor de atividade de água limitante para o crescimento desse microrganismo.

Ao contrário de sal e açúcar, pode ser atribuído à canela efeito inibitório para o crescimento das cepas de *B. cereus*. As especiarias são importantes ingredientes, em razão de seus óleos essenciais: por exemplo, eugenol em cravos, alicina em alho, aldeído cinâmico e eugenol em canela, carvacol e timol em orégano etc. (Valero e Salmerón, 2002). A canela tanto é rica em óleos essenciais quanto em taninos e ambos apresentam efeito antagonista do crescimento bacteriano, embora seu uso seja mais difundido em razão de suas propriedades como agente de sabor e odor (Hsieh et al., 2001). Estes autores submeteram extratos de plantas, inclusive da canela, a tratamentos térmicos de 60, 80, 100 ou 121°C por 0, 5, 10, 15 e 20 minutos e observaram que os extratos foram muito estáveis aos tratamentos térmicos, mesmo após 20 minutos às

temperaturas mais altas. Segundo os autores, os efeitos inibitórios foram ligeiramente aumentados, após o aquecimento.

Valero et al. (2002) testaram a atividade antibacteriana de onze óleos essenciais, entre esses o óleo de canela, no crescimento de cepas psicrotróficas de *B cereus* inoculadas em caldo de cenoura e incubadas a 5, 8, 12 e 16°C. Na concentração de 5 µL de óleo de canela/100mL de caldo de cenoura, a fase *lag* de *B cereus* foi de treze horas e a taxa máxima de crescimento não passou de 0,1 ciclos log/h, a 16°C.

#### 4.2. Ajuste de um modelo proposto para estimar o crescimento de microrganismos, em função da temperatura, aos dados experimentais

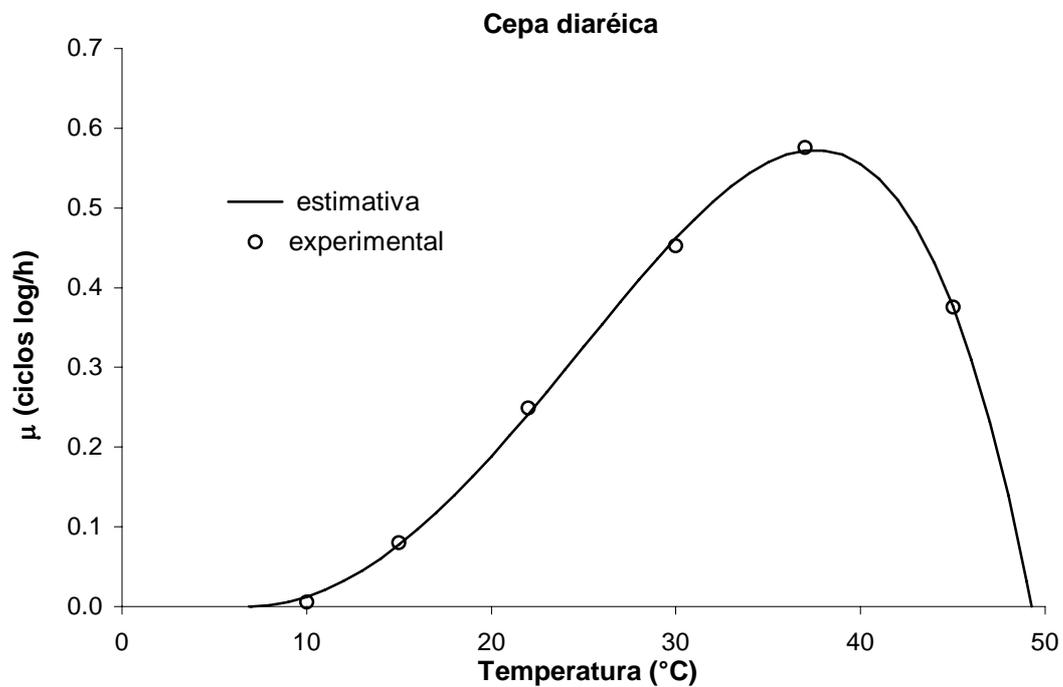
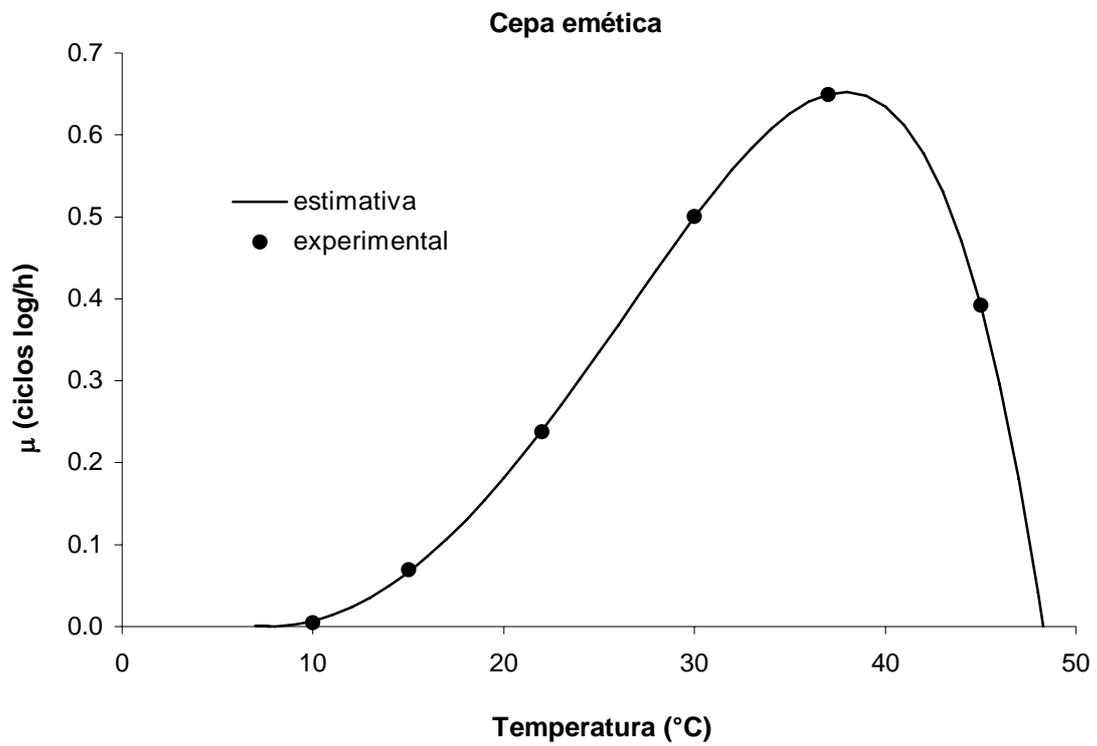
A Figura 4.5 permite visualizar o ajuste da Equação 2, proposta por Zwietering et al. (1991), aos dados obtidos experimentalmente, relativos às taxas máximas de crescimento das cepas de *B. cereus*, em função das temperaturas de 10, 15, 22, 30, 37 e 45°C. Na Tabela 4.3 estão relacionados os parâmetros obtidos por esse ajuste. Dessa forma, foram estimados os valores de  $\mu(T)$ , relativos a cada uma das cepas estudadas, em toda a faixa de temperatura que permite seu crescimento, em meio de arroz-doce.

**Tabela 4.3:** Parâmetros obtidos pelo ajuste da 'Equação 2'\* aos dados experimentais relativos ao crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce

Microrganismos	Parâmetros			
	a	b	T <sub>mínimo</sub>	T <sub>máximo</sub>
Cepa emética	0,0377	0,0081	7,8 (±0,3)	48,3 (±0,1)
Cepa diarréica	0,0389	0,0440	6,9 (±1,3)	49,3 (±0,6)

- Equação 2:  $\mu(T) = [a(T-T_{\min})]^2 \cdot \{1-\exp[b \cdot (T-T_{\max})]\}$

A equação proposta é amplamente citada na literatura, em associação ao seu valor para predizer o crescimento de diferentes microrganismos em vários substratos. Exemplos de sua utilização, mencionados por vários autores, atestam de sua confiabilidade e da amplitude de suas aplicações, em microbiologia preditiva (Choma et al., 2000; Nyati, 2000; Azeredo, 1998; McMeekin et al., 1997).



**Figura 4.5.** Taxas de crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce e ajuste da Equação 2\* aos dados experimentais

$$* \mu(T) = [a(T-T_{min})]^2 \cdot \{1 - \exp[b \cdot (T - T_{max})]\}$$

#### 4.3. Estimativas e dados experimentais relativos ao crescimento de *Bacillus cereus* em meio-arroz doce, durante operação de resfriamento

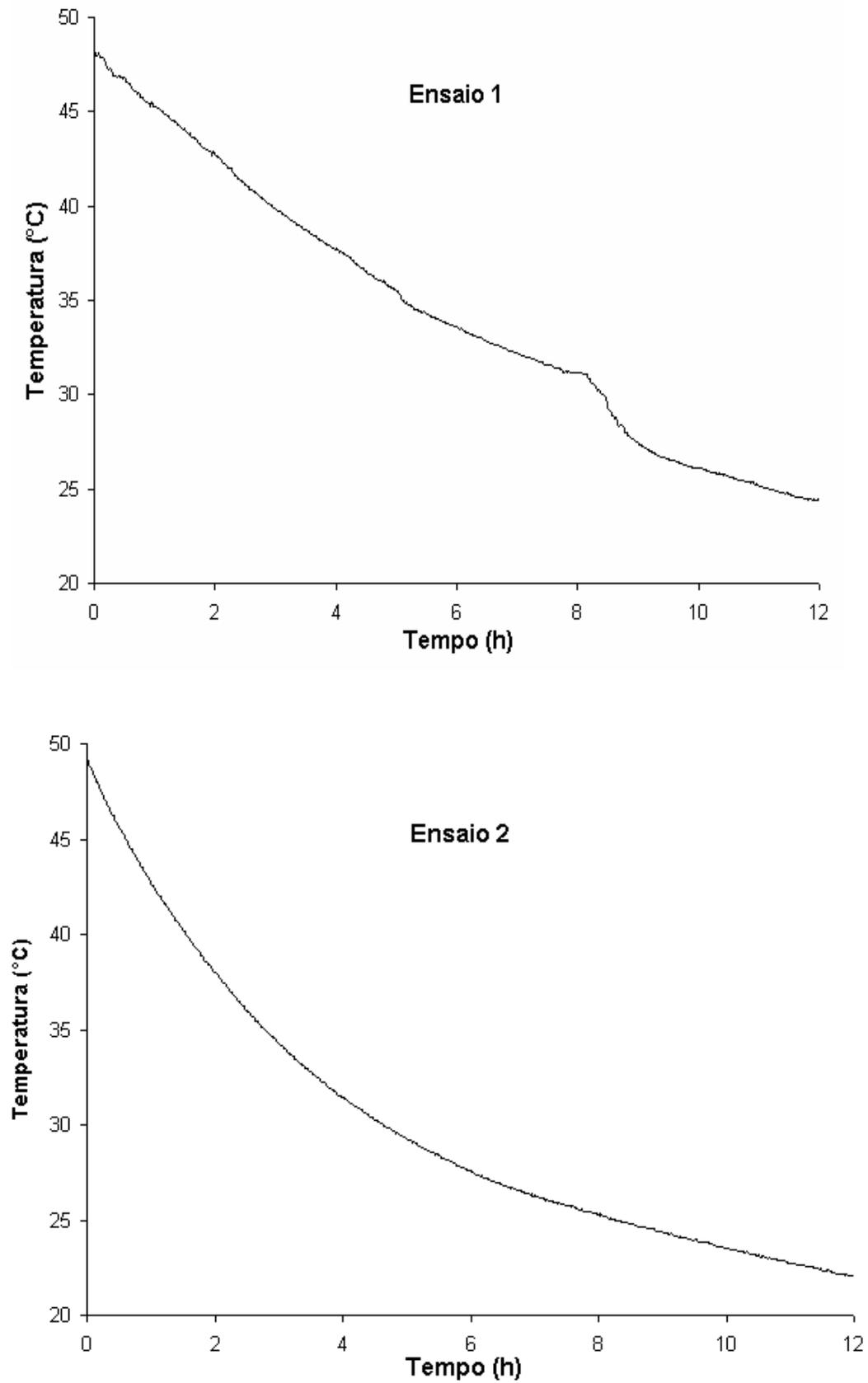
O processo de resfriamento de arroz-doce, distribuído em tubos que, por sua vez, foram inseridos em batelada de arroz cozido, ocorreu lentamente, como esperado. Os dados de temperatura, obtidos de minuto em minuto e tomados como média das medidas de quatro sensores, permitiram a elaboração dos gráficos constantes da Figura 4.6.

As temperaturas registradas no tempo zero (momento da inoculação) foram de 48,1°C, no ensaio conduzido com a cepa emética, e 49,3°C no ensaio em que foi testada a cepa diarréica. Ao final de doze horas, as temperaturas registradas nos ensaios relativos a cada cepa foram de 24,3 e 22,1 °C, respectivamente. As taxas médias de resfriamento foram de 1,9°C/h e de 2,3°C, nos ensaios desenvolvidos com a cepa emética e com a cepa diarréica. A queda de temperatura, obviamente, não seguiu um padrão linear, de maneira que o resfriamento foi mais rápido nas primeiras horas (Tabela 4.4) e quase se mostrava estável nas últimas quatro horas. Quando foi desenvolvido o ensaio com a cepa diarréica, a temperatura ambiente se situava pelo menos três graus mais baixa do que a temperatura medida no dia em que a cepa emética foi testada, o que talvez explique a maior rapidez de resfriamento, especialmente na fase inicial.

**Tabela 4.4:** Taxas de declínio de temperatura de arroz-doce (°C/h), durante operação de resfriamento

Microrganismos	Tempo (h)					
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12
Cepa emética	3,8	2,5	2,1	1,5	1,2	0,8
Cepa diarréica	5,6	3,2	2,0	1,2	0,9	0,7

As taxas médias de resfriamento calculadas neste trabalho reproduzem dados de 2,34°C/h, relatados por Azeredo (1998) e refletem o que ocorre quando o alimento é resfriado à temperatura ambiente. Tratou-se, portanto, de uma operação típica de resfriamento de preparações de arroz, comum em ambientes em que a temperatura se situa em torno de 22 a 25°C, fato constatado em testes preliminares realizados durante esta pesquisa.



**Figura 4.6.** Curvas de operação de resfriamento de arroz-doce (ensaio 1, desenvolvido com a cepa emética, e ensaio 2, com a cepa diarréica).

Disso resulta que os microrganismos foram expostos a condições favoráveis ao seu crescimento, uma vez que a temperatura se situou, sempre, dentro dos limites máximos e mínimos que permitem esperar a multiplicação da maioria das cepas de *B. cereus* (Tabela 4.3). Por isso, é de se supor que mesmo as temperaturas mais altas não tenham exercido efeitos adversos sobre os microrganismos.

O crescimento dos microrganismos foi acompanhado durante as doze horas de resfriamento lento, sendo um ensaio desenvolvido com cada microrganismo. Sob as condições descritas, a cepa emética cresceu em torno de cinco ciclos logarítmicos e a cepa diarréica, quatro ciclos. Os dados relativos às contagens, a cada intervalo de 2 h, constam da Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Crescimento de *Bacillus cereus* (UFC/g) em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.

Microrganismos	Tempo (h)						
	0	2	4	6	8	10	12
Cepa emética	$1,15 \times 10^2$	$7,80 \times 10^2$	$8,00 \times 10^3$	$1,05 \times 10^5$	$9,75 \times 10^5$	$8,25 \times 10^6$	$6,85 \times 10^7$
Cepa diarréica	$1,30 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2$	$5,25 \times 10^3$	$4,35 \times 10^4$	$1,75 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$

Na faixa de temperatura em que ocorreu o resfriamento, aproximadamente entre 49 e 22°C, durante doze horas, o incremento de quatro a cinco ciclos logarítmicos na população bacteriana permite estimar um alto risco de intoxicação para eventuais consumidores. Trabalhos como o de Agata et al. (2002) evidenciam esse potencial: arroz cozido, mantido a 20°C por 12 a 16 horas, foi relatado como suspeito de causar intoxicação emética. Nos Estados Unidos, entre 1988 a 1992, 76% das causas de doenças de origem alimentar associada a *B. cereus* foram relacionadas a condições inadequadas da temperatura no armazenamento. Entre esses surtos, 10% envolveram consumo de arroz.

É, portanto, de todo desaconselhável submeter arroz-doce a uma operação lenta de resfriamento, prolongando sua exposição a temperaturas de risco por períodos de várias horas. O recomendável seria distribuir o produto em pequenas porções, para favorecer o resfriamento rápido, e armazenar sob refrigeração, de preferência abaixo de 7°C, dentro do prazo máximo de três horas (Baker, 2002).

As taxas máximas de crescimento em função da temperatura, obtidas a partir do ajuste da equação de Zwietering et al. (1991) aos dados experimentais, permitiram estimar as populações, a cada intervalo de tempo, partindo de uma população hipotética de 1 microrganismo (célula ou esporo) por grama de alimento, no caso, arroz-doce. Assim, os dados preditos e experimentais (estes, com seus valores normalizados, pela divisão de cada contagem pela contagem inicial) compõem as Tabela 4.6 e 4.7 e ilustram a figura 4.7 com as curvas preditivas e experimentais.

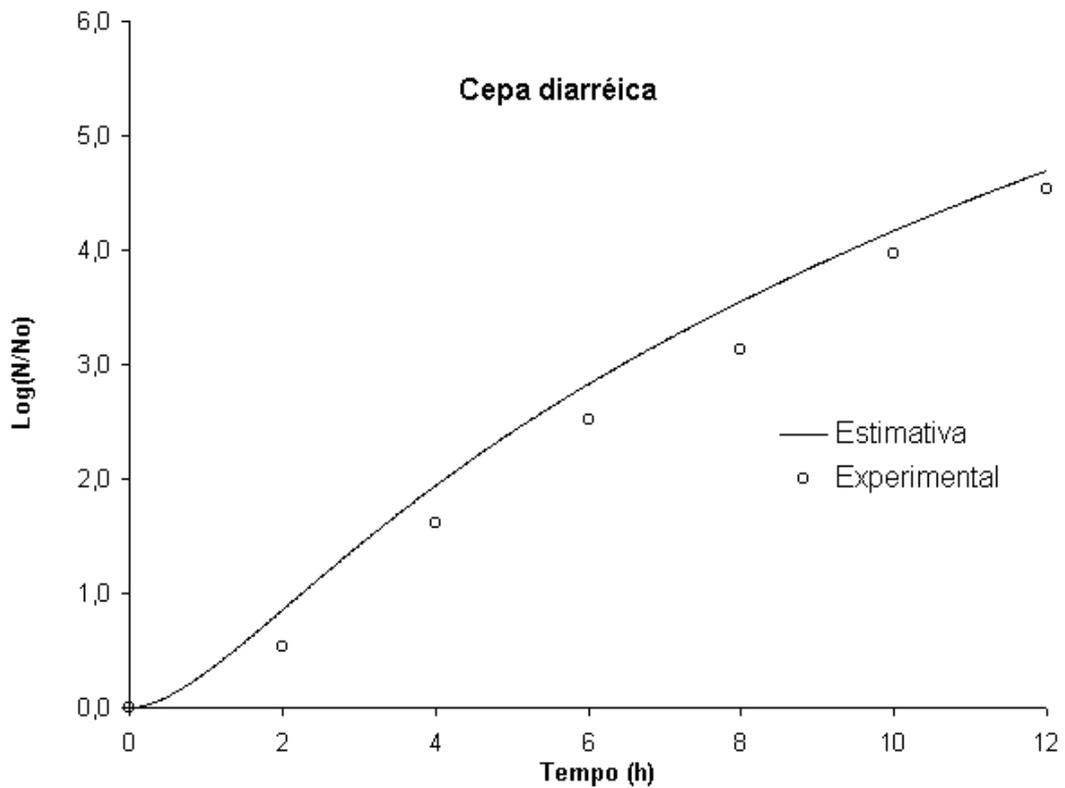
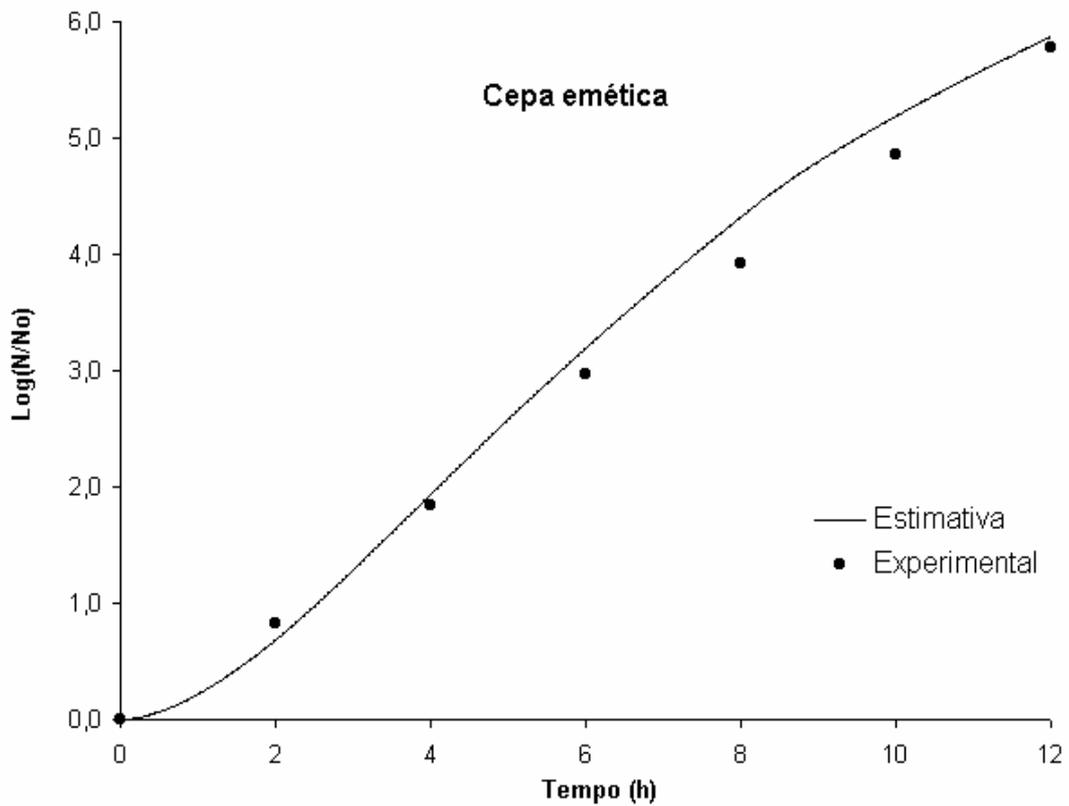
**Tabela 4.6:** Crescimento da cepa emética, submetida a resfriamento: dados experimentais ( $N/N_0$ ) e estimativas, em UFC por grama do meio de arroz-doce

Dados	Tempo (h)						
	0	2	4	6	8	10	12
Experimentais	1	7	70	$9,10 \times 10^2$	$8,50 \times 10^3$	$7,20 \times 10^4$	$6,00 \times 10^5$
Estimados	1	5	86	$1,60 \times 10^3$	$2,10 \times 10^4$	$1,50 \times 10^5$	$7,40 \times 10^5$

**Tabela 4.7:** Crescimento da cepa diarréica, submetida a resfriamento: dados experimentais ( $N/N_0$ ) e estimativas, em UFC por grama do meio de arroz-doce

Dados	Tempo (h)						
	0	2	4	6	8	10	12
Experimentais	1	3	40	$3,30 \times 10^2$	$1,30 \times 10^3$	$9,20 \times 10^3$	$3,50 \times 10^4$
Estimados	1	7	87	$6,70 \times 10^2$	$3,60 \times 10^3$	$1,50 \times 10^4$	$4,90 \times 10^4$

Em ambos os casos, os dados experimentais foram achados menores que os dados estimados, especialmente com relação às contagens dos tempos intermediários, entre 6 e 10 h, quando as populações preditas se situaram em torno de 0,3 a 0,4 ciclos logarítmicos maiores do que as populações observadas pela contagem em placas. Entretanto, também em ambos os casos, após 12 horas de resfriamento essa diferença se reduziu e as contagens estimadas excediam as experimentais em valores equivalentes, aproximadamente, a 0,1 ciclo logarítmico.



**Figura 4.7.** Avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz-doce, durante operação de resfriamento.

Essas discrepâncias, em que os dados estimados superam os valores observados na experimentação, foram salientadas por Wilson et al. (2002) como uma ocorrência comum, quando se usam modelos preditivos. Quando McElroy et al. (2000) observaram o crescimento de *B. cereus* a 15, 20 e 30°C e utilizaram os dados para modelar o crescimento do microrganismo, o modelo exibiu a mesma tendência para maior, o que garantiria, segundo o autor, uma margem de segurança. Nesse trabalho, os autores citaram dados relativos a tempos de geração, obtidos por diversos autores que pesquisaram o crescimento do microrganismo no mesmo substrato, para sustentar a adequação e confiabilidade do modelo.

O crescimento de *B. cereus*, como de vários outros microrganismos, tem sido testado por diversos autores, utilizando ou propondo modelos matemáticos. Chorin et al. (1997) modelaram curvas de crescimento de *B. cereus* em meio BHI (Brain Heart Infusion) em função da temperatura, entre 20 e 30°C. Os resultados encontrados reproduziram observações anteriores de Raevuori e Genigeorgis (1975), sugerindo a capacidade preditiva do modelo proposto. Eles ressaltaram que, até aquele momento, esses modelos não haviam sido validados em alimentos. Também Choma et al. (2000) testaram o efeito da temperatura, entre 5 e 40°C, nas características de crescimento de *B. cereus* em meio de abobrinha e em meio enriquecido. Os autores consideraram o modelo bem ajustado para prever o incremento das populações, naquelas condições.

É de se esperar que um modelo bem ajustado represente uma ferramenta de grande utilidade, com possibilidade de oferecer rapidez de resposta a indagações sobre a segurança sanitária de alimentos armazenados. No caso particular do modelo utilizado nesta pesquisa, a similaridade das curvas (estimadas e experimentais) permite supor que a capacidade do modelo seja adequada ao seu propósito preditivo, sob as condições testadas.

## 5. CONCLUSÕES

Com o objetivo de obter dados que possam servir de referência à prevenção de intoxicações alimentares por *Bacillus cereus* veiculadas por arroz-doce, este trabalho foi desenvolvido para avaliar a capacidade de multiplicação de duas cepas de referência do microrganismo, uma de tipo emético (NCTC 11143) e outra diarréica (NCTC 11145), inoculadas em meio de cultura que reproduziu a composição dessa preparação e incubadas a 10, 15, 22, 30, 37 e 45°C. O crescimento das cepas também foi observado, mediante inoculação no mesmo substrato, quando submetidas a um processo de resfriamento lento, entre 49 e 22°C, aproximadamente, durante 12 h.

- O crescimento de ambas as cepas a 10°C foi muito lento, com tempos de geração superiores a 3.000 min.
- A partir de 15 até 37°C as taxas de crescimento foram crescentes, sendo os maiores valores observados a 30 e 37°C, com os tempos de geração variando entre 28 e 40 min, a estas temperaturas.
- A 45°C percebeu-se um nítido declínio da velocidade de multiplicação, evidenciando a proximidade dos limites máximos de temperatura que permitem o crescimento de *B. cereus*.
- Populações iniciais em torno de  $10^2$  UFC/g podem, dentro de seis horas, dar origem a números suficientes para causar as intoxicações caracteristicamente atribuídas ao patógeno, se o alimento ficar estocado a temperaturas entre 30 e 45°C.
- Quando submetidas a uma operação de resfriamento, situação em que o alimento sofreu um declínio lento de temperatura, a partir de 49°C ( $\pm 1$ ) até 23°C ( $\pm 1$ ), durante 12 h, as cepas inoculadas no meio de arroz-doce passaram por aumentos das populações da ordem de quatro a cinco ciclos logarítmicos.
- O processo de resfriamento, nas condições testadas, oferece risco expressivo de que as populações de *B. cereus* alcancem magnitude inaceitável, do ponto de vista de proteção à saúde do consumidor.
- O substrato mostrou-se adequado ao crescimento do patógeno, mas os resultados observados permitiram supor que a canela em pó, dispersa no alimento, tenha exercido efeito inibitório da multiplicação de *B. cereus*.

Entretanto, mesmo considerando essa possibilidade, o fato de a canela representar uma fonte potencial de contaminação contra-indica seu uso como componente da preparação, sugerindo-se sua adição, em separado, no momento do consumo.

- Um modelo que descreve o crescimento microbiano em função da temperatura, utilizado para estimar a evolução das contagens dos microrganismos quando submetidos ao processo de resfriamento, foi considerado com potencial para contribuir na avaliação de riscos a que se expõem os consumidores de preparações de arroz-doce, uma vez mantido a temperaturas que permitem o crescimento de diferentes cepas de *B. cereus*.
- Reafirma-se a necessidade de optar pelo resfriamento rápido e manter preparações de arroz-doce sob refrigeração, de preferência abaixo de 10°C e durante tempo não superior a três dias, como medida preventiva de intoxicações por *B. cereus*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, J. Comida: é segura? É alterada? **National Geographic Brasil**, maio, p. 65-100, 2002.

AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M.; SUWAN, S.; OHTANI, I.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, n. 1, p.31-41, aug. 1994.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1 p. 23-27, feb. 2002.

ARANGO, J.; AGOSTINI, A.; SILVESTRE, A.; YAAFAR, M.; LÓPEZ, C.; FISHMANN, H. Sanitary Conditions in Community dining halls in greater Buenos Aires, Argentina. **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v. 2, n. 4, p. 225-231, out. 1997.

AZEREDO, R.M.C. Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus*, 1998. 142 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas.

AZEREDO, R.M.C.; PASSOS, F.J.V.; KUAYE, A.Y. Cinética do crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz, sob diferentes temperaturas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 111-114, set. 2002.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL, 8<sup>th</sup>. edition/ revision A, 1995.

BAKER, D.A. Use of food safety objectives to satisfy the intent of food safety law. **Food Control**, v. 13, n. 6/7, p. 371-376, sept.-oct. 2002.

BARRETO, S.A.J.; CYRILLO, D.C. Análise da composição dos gastos com alimentação no Município de São Paulo (Brasil) na década de 1990. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.1, fev., 2001.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v. 62, n 3, p. 381-390, nov. 2002.

BORGE, G.I.A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD T.; GRANUM, P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 237-246, sept. 2001.

BRÉAND, S.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J.P.; ROSSO, L.; TOMASSONE, R. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, n. 2/3, p. 157-167, sept. 1997.

BRYAN, F.L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 663-673, aug. 1988.

BRYAN, F.L.; BARTLESON, C.A.; CHISTOPHERSON, N. Hazard analyses, in reference to *Bacillus cereus* and fried rice in cantonese-style restaurants. **Journal of Food Protection**, v. 44, n.7, p. 500-512, july 1981.

BRYAN, F.L.; JERMINI, M.; SCHMITT, R.; CHILUFYA, E.N.; MICHAEL, M.; MATOBA, A.; MFUME, E.; CHIBIYA, H. Hazard associated with holding and reating foods at vending sites in a smal town in Zambia. **Journal of Food Protection**, v.60, n. 4, p. 391-398, apr. 1997.

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. Risk assessment and predictive microbiology. **Journal of Food Protection**, p. 31-36, 1996 supplement.

BUSTO, P.M.B. Calidad microbiologica de los postres lacteos elaborados en establecimientos de hosteleria de la cominidad autonoma del pais Vasco durante 1999. **Alimentaria**, v. 37, n. 318, p. 31-33. 2000.

CARLIN, F.; GIRARDIN, H.; PECK, M.W.; STRINGER, S.C.; BARKER, G.C.; MARTINEZ, A.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, P.; WAITES, W.M.; MOVAHEDI, S.; VAN LEUSDEN, F.; NAUTA, M.; MOEZELAAR, R.; DEL TORRE, M.; LITMAN, S. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2/3, p. 117-135, sept. 2000a.

CARLIN, F.; GUINEBRETIERE, M.H.; CHOMA, C.; PASQUALINI, R.; BRACONNIER, A.; NGUYEN-THE, C. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purees. **Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 153-165, apr. 2000b.

CASWELL, A.J. Economic approaches to measuring the significance of food safety in international trade, **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 261-266, dec. 2000.

CDC/NCID/DBMD. Diseases Information. Estados Unidos, Disponível em: [www.cdc.gov/foodborneoutbreaks](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks). Pesquisado em 15 jun., 2003.

CHAIMOWICZ, F.A saúde dos idosos brasileiros às vespuras do século xxi: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 1-26, abr.1997.

CHANG, J.M.; CHEN, T. H. Bacterial foodborne outbreaks in central Taiwan, **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 2003.

CHEN, C.H.; DING, H.C.; CHANG, T.C. Rapid identification of *Bacillus cereus* based on the detection of a 28.5-kilodalton cell surface antigen. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 3, p. 348-354, mar. 2001.

CHOMA, C.; CLAVEL, T.; DOMINGUEZ, H.; RAZAFINDRAMBOA, N.; SOUMILLE, H.; NGUYEN-THE, C.; SCHMITT, P. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1/3, p. 73-77, apr. 2000.

CHORIN, E.; THUAULT, D.; CLÉRET, J.J.; BOURGEOIS, C.M. Modelling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, n. 2/3, p. 229-234, sept. 1997.

CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 79-87, 1993.

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C. Genus *Bacillus*. In: Holt, J. G., editor-in-chief. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. II, p. 1105-1139.

CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. San Diego, California: Academic Press, 1990. 395 p.

COLLINS, J.E. Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 1-9, oct.-dec. 1997.

CVE/SES-SP. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Disponível em: [www.cvs.saude.sp.gov.br](http://www.cvs.saude.sp.gov.br) Pesquisado em: 20 jun., 2003.

DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf-life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 305-317, 1995.

DAMASCENO, K.S.F.S.C.; ALVES, M.A.; FREIRE, I.M.G.; TÔRRES, G.F.; AMBRÓSIO, C.L.B.; GUERRA, N.B. Condições higiênicas-sanitárias de "self-services" do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidas. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 74-78, nov./dez. 2002.

DELIGNETTE-MULLER, M.L.; ROSSO, L. Biological variability and exposure assessment **International Journal of Food Microbiology**, v. 58 n. 3, p. 203-212, jul. 2000.

DeWAAL, C.S. Safe food from a consumer perspective. **Food Control**. v. 14, n. 2, p. 75-79, mar. 2003.

DOOLEY J.S.G.; ROBERTS T.A. Control of vegetative micro-organisms in foods. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 142-157, 2000.

DROBNIOWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, oct. 1993.

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2/3, p. 175-183, oct. 1995.

DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food-production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 99-109, sept. 1994.

ELEFThERIADOU, M.; VARNAVA-TELLO, A.; METTA-LOIZIDOU, M.; NIKOLAOU, A.S.; AKKELIDOU, D. The microbiological profile of foods in the Republic of Cyprus: 1991–2000. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 463-471, oct. 2002.

FANG, J.T.; WEI, Q.K.; LIAO, C.W.; HUNG, M.J.; WANG, T.H. Microbiological quality of 18 C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 241-250, feb. 2003.

FERMANIAN, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 414-418, dec. 1994.

FIGUEIREDO, R.M. **As armadilhas de uma cozinha**. Manole, São Paulo, 2002, 217p.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 423-430, oct. 2002a.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice, **Journal of Food Microbiology**, v.19, n. 5, p. 431-439, oct. 2002b.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. Semiautomated Metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1811-1812, apr. 1999.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos** Atheneu, São Paulo, 1998, 307p.

GARCIA-ARRIBAS, M.L.; KRAMER, J.M. The effect of glucose, starch and pH on growth, enterotoxin and haemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-34, aug. 1990.

GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Riemann, H.; Bryan, L.F., eds. **Foodborne infections and intoxications**. 2.ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.

GILBERT, R.J.; STRINGER, M.F.; PEACE, T.C. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. **Journal of Hygiene**, v. 73, n. 3, p. 433-444, 1974.

GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 35, n. 4, p. 213-226, 1972.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 615-665, Symposium Supplement, 1994.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T.J., ed. **Microbiology Fundamentos and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997, p. 327-336.

GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; O'SULLIVAN, K.; NISSEN, H. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: Production and biochemical characterization. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 63-70, 1993.

GRANUM, P.E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**. n. 157, p. 223-228, 1997.

GRIFFITHS, M.W. Predictive modelling: Applications in the dairy industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 305-315, 1994.

GUIARO, H. Higiene e conservação de alimentos: redução de perdas e prevenção de doenças de origem alimentar. **Conjuntura Alimentos**, v. 7, n. 1, p. 19-23, 1995.

GUINEBRETIERE, M.H.; GIRARDIN, H.; DARGAIGNARATZ, C.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 223-232, may 2003.

HARMON, S.M.; KAUTTER, D. A. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. **Journal of Foods Protection**, v. 54, n. 5, p. 372-374, may 1991.

HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming *bacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 18, n. 3, p. 591-595, dec.1955.

HSIEH, P.C.; MAU, J.L.; HUANG, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.18, n.1, p.35-43, feb. 2001.

HUSMARK, U.; SIK., U.R. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 557-562, 1990.

JAQUETTE, C.B.; BEUCHAT, L.R. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. **Journal of Food Protection**, v.61, n. 12, p.1629-1635, dec. 1998.

JERMINI, M.; BRYAN, F.L.; SCHMITT, R.; MWANDWE, C.; MWENYA, J.; ZYUULU, M.H.; CHILUFYA, E.N.; MATOBA, A.; HAKALIMA, A.T.; MICHAEL, M. Hazard and critical control points of food vending operations in a city in Zambia. **Journal of Food Protection**, v.60, n.3, p.288-299, mar.1997.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and rice. **Journal of Food Science**, v. 48, n.1 , p. 286-287, jan./feb.1983.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Heat-induced temperature sensitivity of outgrowing *Bacillus cereus* spores. **Applied and Environmental Microbiology** v. 47, n.4, p. 768-774, apr. 1984.

KÄFERSTEIN, F.K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness **Food Control**, v. 14, n. 2, p. 101-109, mar. 2003.

KIM, H.U.; GOEPFERT, J.M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 581-587, oct. 1971.

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and others *Bacillus* species. In: DOYLE, M.P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 21-69.

LANGEVELD, L.P.M.; VAN SPRONSEN, W.A.; VAN BERESTEIJN, E.C.H.; NOTERMANS, S.H.W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 723-726, july 1996.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1/3, p. 181-186, apr. 2000.

LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J.A.; GRIFFITHS, M.W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p.159-171, sept.1998.

MAHAKARNCHANAKUL, W.; BEUCHAT, L.R. Influence of temperature shifts on survival, growth, and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy, **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 179-187, mar. 1999.

MAISTRO, L.C. Alface minimamente processada: Uma revisão. **Revista Nutrição**, v.14, n. 3, Campinas, set./ dez. 2001.

MARTIN, J.H.; BLACKWOOD, P.W. Effects of sub-lethal heat-shock, B-alanine, and L-alanine on germination and subsequent destruction on *Bacillus* spores by pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 5, p. 577-580, may 1972.

McCLURE, P.J., BLACKBURN, C.D.W., COLE, M.B., CURTIS, P.S., JONES, J.E., LEGAN, J.D., OGDEN, I.D., PECK, M.W., ROBERTS, T.A., SUTHERLAND, J.P. AND WALKER, S.J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: The UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 265-275, nov.1994.

McELROY, D.M.; JAYKUS, L.A.; FOEGEDING, P.M. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 2, p. 268-272, feb. 2000.

McMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.; SALTER, M.; SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: A basis for food safety., v. 3, n. 4, 1997.

McMEEKIN, T.A.; ROSS, T.; OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 1-2, p.13-32, jan./feb., 1992.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; Linda F. McCaig, Joseph S. Bresee, Craig Shapiro, Patricia M. Griffin, and Robert V. Tauxe. Food-Related illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**Atlanta, v. 62, n. 7, p.9, 1999.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/> Pesquisado em 18 jun., 2003.

NAUTA, M.J.; LITMAN, S.; BARKER, G.C.; CARLIN, F.A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 205-218, june 2003.

NICHOLS, G.L.; LITTLE, C.L.; MITHANI, V.; De LOUVOIS, J. The Microbiological Quality of Cooked Rice from Restaurants and Take-Away Premises in the United Kingdom. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 877-882, aug.1999.

NORTJE, G.L.; VORSTER, S.M.; GREEBE, R.P.; STEYN, P.L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-217, jun. 1999.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; BEUMER, R.; TE GIFFEL, M.; WEEM, P.P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk, **Food Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 143-151, apr. 1997.

NUNES, I.F.S.; FERREIRA, G.P.; ALBUQUERQUE, W.F. Perfil microbiológico dos microorganismos causadores de DTA's em restaurantes self-services na cidade de Teresina - PI. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 59-62, nov./dez. 2002.

NYATI, H. Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, n. 2/3, p. 123-132, june 2000.

OPAS. Disponível em: [www.opas.org.br](http://www.opas.org.br). Pesquisado em: 18 jun.,2003.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas- SP- no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, jan./jun. 1996.

PEDROSO, D.M.M.; IARIN, S.T.; GAMBA, R.C.; HEIDTMANN, S.; RALL, V.L.M. Critical Control Points for meat balls and Kibbe preparations in a hospital kitchen. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p. 347-355, 1999.

PIRES, E.F.; SHINOHARA, N.K.S.; RÊGO, J.C.; LIMA, S.C.; STAMFORD, T.L.M. Surtos de toxinfecções alimentares em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101. p. 20-24, out. 2002.

POTTER, E.M., AYALA, S.G., SILARUG, N. Epidemiology of foodborne disease. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 376-390.

RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 68-73, 1975.

RAJKOWSKY, K.T.; MIKOLAJCIK, E.M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 99-205, mar. 1987.

ROSS, T. Belehrádek-type models. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 3/5, p. 180-189, 1993.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3/4, p. 241-264, nov. 1994.

SALZBERG, S.P.; MASSAGUER, P.R.; SERRANO, A.M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Revista de Microbiologia**, v.13, n. 1, p.26-30, jan./mar. 1982.

SARRÍAS, J.A.; VALERO, M.; SALMERÓN, M.C. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice, **Journal of Food Microbiology**, v.19, n. 6, p. 589-595, dec. 2002.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1/2, p. 3-17, sept. 2002.

SCHLUNDT, J. Principles of food safety risk management. **Food Control**, n.10, p. 299-302, abr. 1999.

SHAH, R.C.; WADHER, B.J.; BHOOSREDDY, G.L. Incidence and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from Indian foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 249-250, may/june 1996.

SHIMONI, E.; LABUZA, T.P. Modelling pathogen growth in meat products: future challenges. **Food Science & Technology**, n.11, p.394-402, 2000.

SINGH, R.S.; BATISH, V.K.; PARKASH, O.; RANGANATHAN, B. Toxigenic *Bacillus cereus* var. *fluorescens* in human milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 3, p. 513-517, mar. 1984.

SIRVETA Sistema de Informação para Vigilância das Enfermidades Transmitidas por Alimentos. Disponível na Internet em <http://www.panalimentos.org/sirveta>. Pesquisado em 15 jun. 2003.

SKINNER, G.E.; LARKIN, J.W.; RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modelling of microbial growth: a review. **Journal of food Safety**, v. 14, p. 175-217, 1994.

SPERBER, W.H. Hazard identification: from a quantitative to qualitative approach. **Food Control**, v.12, n. 4, p.223-228, june, 2001.

SUTHERLAND, J.P.; AHERNE, A.; BEAUMONT, A.L. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effect of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 359-372, july ,1996.

TAUXE, R.V. Surveillance and investigation of foodborne diseases; roles for public health in meeting objectives for food safety. **Food Control**, v. 13, n. 6/7, p. 363-369, sep./oct., 2002.

VALERO, M.; FERNÁNDEZ, P.S.; SALMERÓN, M.C. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates, **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 71-79, apr. ,2003.

VALERO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, L.A.; FERNÁNDEZ, P.S.; SALMERÓN, M.C. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 491-499, oct. 2002.

VALERO, M.; SALMERÓN, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 1/2, p. 73-81, aug.,2003.

VAN NETTEN, P.; KRAMER, J.M. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 85-89, oct. 1992.

WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus Stearothermophilus* spores inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 446-450, may/june 1995.

WILSON, P.D.G.; BROCKLEHURST, T.F.; ARINO, S.; THUAUL, D.; JAKOBSEN, M.; LANGE, M.; FARKAS, J.; WIMPENNY J.W.T.; VAN IMPE, J.F. Modeling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2/3, p. 275-289, mar. 2002.

ZWIETERING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; WIT, J.C.; VAN'T RIET, K.  
Modelling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1094-1101, apr. 1991.

# **ANEXOS**



