

REGINA CÉLIA RODRIGUES MIRANDA MILAGRES

***Bacillus cereus* EM UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO:
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO AR E DE SUPERFÍCIES DE
TRABALHO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

REGINA CÉLIA RODRIGUES MIRANDA MILAGRES

***Bacillus cereus* EM UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO:
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO AR E DE SUPERFÍCIES DE
TRABALHO**

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: 06 de abril de 2004

Prof. Nélio José de Andrade
(Conselheiro)

Prof. Angela Maria Campos Santana
(Conselheira)

Prof. Roberto Gonçalves Junqueira

Prof. Maria do Carmo Gouveia. Peluzio

Prof. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo
(Orientadora)

A Deus por iluminar a minha caminhada.

Aos meus pais, por todas as minhas conquistas.

Ao meu Amor João, pelo companheirismo e pelo apoio.

Aos meus filhos Mateus, Yasmin e Clara pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTO

À Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista, à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização do Curso.

À professora Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, pela orientação, pela dedicação, pela amizade e pelos ensinamentos, não só científicos, mas também de vida.

Aos professores Nélio José de Andrade e Ângela Maria Campos Santana, pelos ensinamentos e pelas sugestões que enriqueceram este estudo.

À Alessandra, à Fernanda, à Francine e à Sânia pelo companheirismo e pela dedicação, fundamentais a realização desta pesquisa.

Aos professores Roberto Gonçalves Junqueira e Maria do Carmo G. Peluzio pela participação na banca examinadora e pelas oportunas sugestões.

À professora Sylvia do Carmo Castro Franceschini, exemplo de dedicação ao trabalho e às pessoas, pelos ensinamentos científicos e pela ajuda na realização dos testes estatísticos.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelos ensinamentos e pela atenção.

À Valéria Costa Salustiano, pelo apoio e pela prontidão.

Aos professores do Departamento de Nutrição e Saúde, pela contribuição ao meu aprimoramento profissional e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, em especial à Solange e à Elaine pela ajuda e pelo carinho.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio e pelos bons momentos compartilhados.

BIOGRAFIA

REGINA CÉLIA RODRIGUES DE MIRANDA MILAGRES nasceu no Rio de Janeiro-RJ, em 16 de outubro de 1971.

Em 1990, ingressou no curso de Economia Doméstica na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 1994.

Em janeiro de 1995, tomou posse como Economista Doméstica, na Escola Federal de São João Evangelista-MG, a qual permanece vinculada.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em abril de 2004.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS.....	Vii
RESUMO	Ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Segurança dos alimentos: a situação no Brasil e no mundo	4
2.2. As doenças de origem alimentar	7
2.3. A questão da segurança dos alimentos em Unidades de Alimentação e Nutrição	9
2.4. <i>Bacillus cereus</i>	14
2.5. Contaminação do ar e de superfícies em ambientes de processamento de alimentos	20
2.5.1. Contaminação do ar por microrganismos	20
2.5.2. Contaminação de superfícies de preparo de alimentos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Coletas das amostras	27
3.1.1. Pontos do ambiente onde foram feitas as coletas.....	27
3.1.2. Frequência das coletas	28
3.2. Avaliação da presença de <i>Bacillus cereus</i> em Unidades de Alimentação e Nutrição	28

3.2.1. Avaliação da presença de <i>Bacillus cereus</i> no ar ..	28
3.2.2. Avaliação da presença de <i>Bacillus cereus</i> em superfícies de bancadas	29
3.3. Isolamento de exemplares presuntivos de <i>Bacillus cereus</i>	30
3.4. Confirmação, diferenciação em espécies e expressão da contaminação ambiental por <i>Bacillus cereus</i>	30
3.5. Teste de hidrólise de amido (para identificar cepas possivelmente eméticas)	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Avaliação da presença de <i>Bacillus cereus</i> em Unidades de Alimentação e Nutrição	34
4.1.1. Avaliação da presença de <i>Bacillus cereus</i> no ar, em Unidades de Alimentação e Nutrição	38
4.1.2. Contagens de <i>Bacillus cereus</i> em superfície de bancadas	45
4.1.3. Teste de Hidrólise de Amido	53
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE A	68
APÊNDICE B	70
APÊNDICE C	72

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Características diferenciais de espécies do grupo de <i>Bacillus cereus</i>	16
2. Características das síndromes atribuídas a <i>Bacillus cereus</i> ..	18
3. Recomendação da NASA (<i>National Aeronautics and Space Administration</i>) para o controle higiênico de ambientes.....	23
4. Limites para contagem microbiológica no ar, de acordo com União Européia	23
5. Definição dos locais (pontos do ambiente) onde foram tomadas as amostras, em cada restaurante	28
6. Coloração de Gram e observação da morfologia, ao microscópio de 252 microrganismos isolados de colônias típicas em ágar MYP, obtidos a partir do ar e de superfícies de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	34
7. Testes de identificação a que foram submetidos 249 microrganismos isolados de colônias típicas em ágar MYP, obtidos a partir do ar e de superfícies de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	35
8. Identificação de 124 cepas típicas em meio de ágar MYP, obtidas de amostras de ar em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	38
9. Contaminação do ar por <i>Bacillus cereus</i> , em cinco restaurantes da cidade de Viçosa, MG	39
10. Contagens de <i>B. cereus</i> no ar, segundo três coletas realizadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG .	40
11. Contagens de <i>Bacillus cereus</i> no ar, em diversos pontos dos ambientes, em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	42

12. Identificação de 125 cepas típicas em meio de ágar MYP, obtidas de superfície de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	46
13. Contaminação de superfícies de bancadas por <i>Bacillus cereus</i> , em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	47
14. Contagens de <i>B. cereus</i> em superfície de bancada, segundo três coletas realizadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	49
15. Contagens de <i>Bacillus cereus</i> em superfície de bancada, em diversos pontos dos ambientes, em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG	50

RESUMO

MILAGRES, Regina Célia Rodrigues Miranda, Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004. ***Bacillus cereus* em Unidades de Alimentação e Nutrição: avaliação da contaminação do ar e de superfícies de trabalho.** Orientadora: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo. Conselheiros: Nélio José de Andrade e Ângela Maria Campos Santana.

Avaliou-se a contaminação por *Bacillus cereus*, no ar e em superfícies de bancadas, em cinco Unidades de Alimentação e Nutrição, escolhidos aleatoriamente na cidade de Viçosa, MG. Foram utilizadas as técnicas de impressão em ágar para coletas de amostras do ar e de remoção por *swabs* para avaliar as superfícies de bancadas. Exemplares Gram-positivos e com morfologia característica do grupo de *B. cereus*, provenientes de colônias típicas em meio de ágar MYP, foram submetidos a testes de confirmação e diferenciação entre espécies, adotando metodologia aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Dos 249 isolados submetidos às provas, *B. cereus* foi a espécie predominante, com 214 (86%) de resultados positivos. Dezesesseis isolados (6%) foram identificados como *Bacillus thuringiensis*, sete (3%) foram caracterizados como *Bacillus mycoides* e doze microrganismos (5%) não apresentaram o conjunto de reações características, podendo representar estirpes atípicas de membros do grupo. Os isolados confirmados como *B. cereus* foram submetidos ao teste de hidrólise de amido para identificar cepas amilase-negativas ou fracamente amilolíticas, possivelmente eméticas, entre os quais 54 (25%) exibiram reações fracas, semelhantes ao de uma cepa emética de referência. A presença do microrganismo no ar foi detectada em todos os restaurantes e pontos ambientais avaliados. Entre 72 amostras examinadas, 52 (72%) apresentaram-se contaminadas por *B. cereus*, em níveis de até 50 UFC/m³. Também nas amostras de bancadas o microrganismo foi identificado em todos os restaurantes, porém três (12,5%) dos 24 pontos ambientais analisados, estavam isentos de contaminação pelo patógeno. Do total de 72 amostras de bancadas, 38 (53%) foram encontradas contaminadas por *B. cereus*, sendo observados níveis de até 6,3 x 10⁴ UFC/250cm². Destacou-se a identificação de um percentual expressivo de cepas fracamente amilolíticas em superfícies de bancadas (36% do total de isolados).

ABSTRACT

MILAGRES, Regina Célia Rodrigues Miranda, Federal University of Viçosa, April/2004. ***Bacillus cereus* in Food Service Establishments: Evaluation of Air and Surface Contamination.** Adviser: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo. Research committee members: Nélio José de Andrade and Ângela Maria Campos Santana.

Air and surface contamination by *Bacillus cereus* were evaluated in five randomly chosen food service establishments in the city of Viçosa, MG. Techniques of sieve samplers were used to collect air samples, and techniques of swabs were used to evaluate surfaces. Gram-positive samples, with morphologic characteristics of *B. cereus* group, originated from typical colonies in MYP agar plates, were submitted to confirmation tests and differentiation among species, adopting the methodology approved by the *Food and Drug Administration* (FDA). Among the 249 isolates tested, *B. cereus* was the predominant specie, with 214 (86%) of the positive results. Sixteen isolates (6%) were identified as *Bacillus thuringiensis*, seven (3%) were characterized as *Bacillus mycoides*, and twelve microorganisms (5%) did not present characteristic reactions, probably representing atypical strains. Isolates confirmed as *B. cereus* were submitted to the hydrolysis of starch test to identify amylase-negative strains or weakly amylolytic, possibly emetics, among which 54 (25%) exhibited weak reactions, similar to a reference emetic-type strain. The presence of the microorganism in the air was detected in all restaurants and ambient points evaluated. Among 72 tested samples, 52 (72%) presented contamination by *B. cereus*, with levels up to 50 CFU/m³. That microorganism was also identified in surface samples collected in all restaurants, however, three (12,5%) of the 24 places analyzed were not contaminated by pathogen. From 72 surface samples, 38 (53%) were contaminated by *B. cereus*, with levels up to 6,3 x 10⁴ CFU/250 cm². It was emphasized the identification of an expressive percentage of weakly amylolytic strains in surfaces (36% of the isolates).

1. INTRODUÇÃO

Há mais de dois mil e quinhentos anos, o grande sábio Hipócrates revolucionou a medicina com um conceito cuja validade permanece inquestionável: “que o alimento seja teu remédio e teu remédio seja o alimento”. Não se discute, pois, o fato de que os alimentos são essenciais para a manutenção da vida e da saúde. Entretanto, os alimentos podem ser, ao mesmo tempo, veículos de agentes responsáveis por enfermidades – as chamadas ‘doenças de origem alimentar’. Em sua grande maioria, essas enfermidades são causadas por agentes de natureza biológica, em especial microrganismos causadores de infecções e intoxicações, os quais contaminam os alimentos e aí se multiplicam, freqüentemente produzindo metabólitos tóxicos. Mundialmente, os surtos das enfermidades veiculadas pelos alimentos constituem um problema de saúde pública de grandes proporções, refletindo a necessidade de investir em ações preventivas, especialmente em países em desenvolvimento.

As fontes de microrganismos patogênicos são diversas: homens e animais, alimentos, superfícies de utensílios e equipamentos que entram em contato com os alimentos e partículas presentes no ar, em ambientes domésticos, indústrias e Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN). Nesse sentido, a monitoração do ar e de superfícies que entram em contato com os alimentos é um recurso de que se dispõe para avaliar a qualidade higiênica dos ambientes, por meio da avaliação de pontos onde o controle se faz mais necessário.

O ar que entra em contato com as matérias-primas durante as etapas de armazenagem, manipulação, embalagem e distribuição, pode ser veículo de microrganismos que, mesmo presentes em baixo número, comprometem a segurança dos alimentos. Da mesma forma, as superfícies que, direta ou

indiretamente, podem contaminar os ingredientes e preparações são outro foco de atenção.

No caso particular de bactérias esporuladas, há suficiente comprovação de que constituem um problema de grande magnitude em ambientes que preparam alimentos, visto que nem sempre os tratamentos térmicos são suficientes para destruir seus esporos. Quando esses microrganismos, além de causar deterioração, determinam a ocorrência de doenças de origem alimentar, o problema torna-se ainda mais crítico. Tal é o caso de *Bacillus cereus*, um microrganismo deteriorador, conhecido por sua associação a intoxicações alimentares, uma predominantemente diarréica e outra com sintomas eméticos.

B. cereus é de ocorrência ubíqua, podendo contaminar alimentos a partir de fontes diversas e aí se multiplicar. Seus esporos são, geralmente, resistentes ao calor, à desidratação e a outros fatores destrutivos, o que explica sua ocorrência em grande variedade de alimentos, crus e processados. Existem fortes indícios, suficientemente relatados na literatura especializada, de que a importância desse microrganismo na etiologia de surtos de doenças de origem alimentar seja subestimada. Considerando sua capacidade de adaptação a diversos substratos, sua rápida multiplicação e tolerância a diversas barreiras usadas para preservar os alimentos, a investigação de sua incidência em ambientes que processam alimentos - especialmente quando são comercializados prontos para consumo - reveste-se de interesse para a prevenção de agravos à saúde.

Por outro lado, modificações em hábitos de consumo, no Brasil, têm gerado um significativo aumento no número de refeições fora do lar e, conseqüentemente, nos estabelecimentos que servem refeições para coletividades. Em tais locais, a preparação de grandes lotes de alimentos, a falta de treinamento da mão-de-obra e as dificuldades advindas de condições precárias de instalações são apenas alguns dos fatores que predisõem aos surtos.

Em vista dessas considerações, torna-se oportuna a avaliação da incidência de *B. cereus* em fontes a partir das quais seriam contaminados alimentos que suportam sua sobrevivência e crescimento, com eventual produção de toxinas. O trabalho visa a colaborar para o preenchimento de uma lacuna, já que levantamentos dessa natureza são escassos em nosso país, ainda que a repercussão de seus efeitos na saúde pública seja inquestionável.

O objetivo básico desta pesquisa foi, pois, obter informações sobre a importância do ar e de superfícies de bancadas como fonte de contaminação para os alimentos, em Unidades de Alimentação e Nutrição, na cidade de Viçosa, MG, tomando por base a detecção e quantificação de *B. cereus*. Eventualmente, os resultados poderão orientar medidas viáveis de controle.

O estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos específicos:

1. Detectar e quantificar a presença de membros do grupo de *B. cereus* no ar e em superfícies de bancadas, em ambientes de Unidades de Alimentação e Nutrição comerciais e institucionais
2. Identificar e confirmar os isolados, como espécies distintas.
3. Submeter os isolados a uma prova bioquímica para identificar cepas possivelmente associadas à produção de toxina emética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. - Segurança dos alimentos: a situação no Brasil e no mundo.

Food safety é um termo usado com significado de “garantia do consumo alimentar seguro, no âmbito da saúde coletiva”. A característica essencial do alimento seguro é sua inocuidade, livre de contaminantes de natureza química, biológica ou física ou, ainda, de quaisquer agentes que possam colocar em risco a saúde (Spers & Kassouf, 1996, apud Cavalli, 2001).

O termo *Food Security*, comumente traduzido como “Segurança Alimentar”, engloba um sentido mais amplo, desde que começou a ser utilizado, após o fim da Primeira Guerra Mundial. Com a traumática experiência da guerra, vivenciada sobretudo na Europa, tornou-se claro que um país poderia dominar o outro controlando seu fornecimento de alimentos. A alimentação seria, assim, uma arma poderosa, principalmente se aplicada por uma potência sobre um país que não tivesse a capacidade de produzir de forma autônoma e suficiente seus alimentos. A questão adquiriria, assim, significado de segurança nacional para cada país, apontando para a necessidade de formação de estoques "estratégicos" de alimentos e fortalecendo a idéia de que a soberania de um país dependia de sua capacidade de auto-suprimento de alimentos (Maluf, 2000).

No Brasil utiliza-se a denominação de ‘segurança alimentar’ para os dois enfoques, tanto o quantitativo quanto o qualitativo. O termo pressupõe não apenas a garantia de acesso ao consumo de alimentos, mas abrange todo o conjunto de condições para a obtenção de uma nutrição adequada à saúde (Cavalli, 2001).

Maluf (2000) define Segurança Alimentar e Nutricional como a garantia do direito de todos ao alimento de qualidade, em quantidade suficiente e de modo

permanente, com base em práticas alimentares saudáveis e respeitando as características culturais de cada povo, manifestadas no ato de se alimentar. Esse autor considera responsabilidade dos estados nacionais assegurarem esse direito, em obrigatória articulação com a sociedade civil, dentro das formas possíveis para exercê-lo e – importante - sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, devendo se realizar em bases sustentáveis.

Os programas de segurança alimentar devem propiciar um efetivo controle de qualidade de toda cadeia alimentar, desde a produção, armazenagem e distribuição até o consumo do alimento *in natura* ou processado, bem como os próprios processos de manipulação que se fazem necessários (Cavalli, 2001).

O que se pode constatar é que muito se discute sobre segurança alimentar e segurança dos alimentos, mas a situação ainda é muito distante do ideal, particularmente em países que sofrem os males próprios da pobreza de suas populações. Na Índia, por exemplo, apesar de muitas das Boas Práticas de Produção serem recomendadas há quase 4.000 anos e seguidas por alguns modernos estabelecimentos processadores de alimentos, como o uso de rede nos cabelos, unhas aparadas, máscaras e banho antes do preparo de qualquer refeição, ainda é comum se observarem práticas que denunciam falta de consciência em relação à higiene na manipulação e industrialização de alimentos: a segurança alimentar não é prioritária, assim como a própria conscientização da importância da higiene e seriedade das doenças de origem alimentar (Marthi, 1999).

Segurança dos alimentos em nível absoluto implica em “risco zero”, o que é uma meta praticamente impossível de se alcançar. É mais realista trabalhar em termos de “risco insignificante” ou “risco aceitável” (Griffith et al., 1998). Essa questão tem sido amplamente discutida, principalmente nos países desenvolvidos, pelos setores público e privado, assim como consumidores, visando disponibilizar para a população alimentos que não sejam prejudiciais à saúde (Caswell, 1991). Entretanto, mesmo com grandes inovações tecnológicas nas várias fases das cadeias produtivas dos diferentes alimentos, tem sido notada a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar de forma crescente, o que é preocupante.

Para Griffith & Redmond (2001), a responsabilidade da segurança dos alimentos deveria ser compartilhada entre governo, indústria e consumidores.

Estudos mostram que estas instâncias, demonstrando preocupação com a segurança dos alimentos, têm promovido iniciativas, principalmente em países desenvolvidos, resultando em mais pesquisas, de forma que as notificações dos casos de doenças de origem alimentar são bem mais freqüentes (Schlundt, 2002).

No âmbito internacional, a segurança alimentar é preconizada por organismos e entidades como a Organização para Agricultura e Alimentos (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS). No âmbito nacional, o Ministério da Saúde (MS), o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA) e o Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) são os principais órgãos responsáveis (Cavalli, 2001).

No Brasil, o processo para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos enfrenta dificuldades, tanto no que se refere ao papel do governo, das unidades de produção agropecuária, das indústrias e dos distribuidores, quanto no que compete aos consumidores. A parcela da população que exerce e exige o controle de qualidade dos alimentos ainda é pequena. Aqui, a fome e a miséria coexistem com baixos padrões de qualidade sanitária (Cavalli, 2001).

O problema da falta de informação da população, com relação à segurança dos alimentos, tem sido percebido e relatado. Uma pesquisa elaborada por Rodrigues & Salay (2001), com 152 consumidoras, mostrou que a procedência do ovo, a cor da casca e o tamanho do produto, foram os aspectos sobre os quais mais de 50% das mulheres entrevistadas apresentaram conhecimentos equivocados. A refrigeração, que é um item importantíssimo para a qualidade sanitária desse alimento, não foi avaliada corretamente por cerca da metade das consumidoras. Outro estudo, que avaliou os níveis de conhecimento e percepção de riscos de doenças de origem alimentar, em Viçosa, Minas Gerais, demonstrou que, entre universitários, as preocupações com agrotóxicos e com perigos de natureza biológica foram preponderantes, mas evidenciou fortes discrepâncias entre conhecimentos a respeito de questões de higiene de alimentos e a percepção de riscos relacionados à contaminação dos alimentos (Azeredo et al., 2003).

2.2. – As Doenças de Origem Alimentar

Por definição, doenças de origem alimentar são patologias – usualmente infecciosas ou tóxicas, por natureza – causadas por agentes veiculados por alimentos. O risco atinge as pessoas de forma irrestrita, já que se associa ao ato de ingestão alimentar. Essas doenças, por sua distribuição universal e por constituírem um problema em ascensão, preocupam autoridades tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (*World Health Organization - WHO, 2002*).

As doenças de origem alimentar decorrem da ingestão de alimentos contaminados por agentes físicos, biológicos e químicos. A causa mais comum dessas doenças é a contaminação microbiana, sendo, na maioria das vezes, as bactérias as grandes responsáveis. A contaminação ocorre tanto pela falta de conhecimento e por negligência do manipulador de alimentos quanto pela inadequação do espaço de trabalho e dos locais de armazenamento e, ainda, por deficiências na limpeza de equipamentos e na higiene pessoal. A consequência disso é a ocorrência de surtos que representam danos, algumas vezes irreversíveis, aos consumidores (Schlundt, 2002; Hazelwood & Mclean, 1991).

Em países ocidentais, grandes esforços têm sido feitos para melhorar a qualidade e segurança dos alimentos. Na verdade, a importância das doenças de origem alimentar está em destaque, por suas implicações na saúde individual e no desenvolvimento de grupos sociais. A percepção da magnitude do problema levou a Assembléia Mundial de Saúde, o foro governante da OMS, a adotar uma resolução que conclama os países a reconhecer a segurança dos alimentos como uma função essencial de saúde pública (Schlundt, 2002).

Mundialmente, as doenças de origem alimentar ainda representam uma das maiores causas de morbidade (Angelillo et al., 2001). Embora a incidência dessas doenças seja difícil de ser estimada, pode-se ter uma idéia de sua importância para a saúde das populações ao se verificar que, apenas no ano 2000, registraram-se mais de dois milhões de mortes por diarreia (*World Health Organization, 2002*).

De acordo com dados divulgados pela *World Health Organization* (2002), 76 milhões de pessoas sofrem todos os anos, nos Estados Unidos, doenças de

origem alimentar. Desses, 325 mil são hospitalizadas e 5 mil morrem. Extrapolando os dados dos Estados Unidos para o resto do mundo, significaria que até um terço da população, em países desenvolvidos, é afetada por doenças veiculadas por alimentos, a cada ano, o que pode ser ainda mais expressivo em países em desenvolvimento (Käferstein & Abdussalam, 1999, citados por Schlundt, 2002). Dados fornecidos pelo Centro de Controle e de Prevenção de Doenças (CDC) sugerem que a contaminação da comida e da água mata quase dois milhões de crianças por ano, em países em desenvolvimento (Ackerman, 2002).

Mesmo em países como os Estados Unidos, a magnitude das doenças de origem alimentar é expressiva. Doyle (2000) estimou que aproximadamente uma em cada quatro pessoas sofrem esses problemas a cada ano. Os custos dessas doenças são, também, alarmantes. Uma estimativa feita naquele país avaliou em uma cifra anual entre 6,6 e 37,1 bilhões de dólares o total de despesas diretas e indiretas decorrentes dessas enfermidades, o que corresponde a uma média entre 25 e 150 dólares por pessoa (Schlundt, 2002). Se isso for verdade para o Brasil – e é muito provável que nossos valores sejam maiores, já que essas doenças atingem com mais frequência e intensidade as populações mais pobres e menos esclarecidas – podemos estimar entre 3,5 e 20 bilhões de dólares as despesas anuais com doenças ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados.

Como a maioria dos casos de doenças de origem alimentar não é notificada, a verdadeira dimensão do problema é desconhecida. A ausência de dados confiáveis impede a compreensão de sua importância para a saúde pública e para o desenvolvimento de soluções. O problema é tão amplamente sentido que os membros da WHO têm sido encorajados formalmente a implementar e manter mecanismos nacionais e regionais de vigilância das doenças de origem alimentar (WHO, 2000, conforme citação de Schlundt, 2002).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a situação é ainda mais crítica, uma vez que a notificação de doenças transmitidas por alimentos é uma exceção, comprometendo a avaliação de um problema que afeta toda a sua população, porém que assola com mais intensidade a camada dos mais carentes e mais desprotegidos membros da sociedade (Lucca & Torres, 2002).

A importância das doenças de origem alimentar costuma ser subestimada pela maioria das pessoas, mesmo aquelas que têm um certo grau de instrução. Em entrevistas feitas por telefone, nos EUA, a maioria dos entrevistados descreveu tais enfermidades como sendo “algo de pouca importância, caracterizada por um mal-estar gastrointestinal sem febre, que aparece depois de certo tempo que a pessoa ingere um alimento contaminado”. Para os autores, a falta de informação pode gerar falhas na identificação de doenças ou levar a falsos diagnósticos. Além disso, se os consumidores não atribuem importância ao risco pessoal, também não procuram modificar seus hábitos de manipulação e consumo de alimentos (Fein et al., 1995).

2.3. – A questão da segurança dos alimentos em Unidades de Alimentação e Nutrição

Os estabelecimentos que trabalham com produção e distribuição de alimentação para coletividades recebem a denominação de Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), observando-se a tendência de englobar tanto os locais destinados a alimentação de coletividades sadias quanto enfermas. São serviços ligados a indústrias, escolas, hospitais, creches e estabelecimentos comerciais, entre outros, que reúnem pessoas por um determinado período de tempo que justifique o fornecimento de refeições. O termo corresponde ao que se denomina comumente *food service*, nos Estados Unidos, e *catering*, na Europa (Proença, 1997).

As mudanças no estilo de vida do consumidor, cada vez mais pressionado pela exigüidade de tempo, vêm levando as pessoas a usar alimentos preparados fora do ambiente domiciliar. O *Food Marketing Institute*, dos Estados Unidos, desenvolveu uma pesquisa com consumidores, verificando, em 1996, que 10% dos entrevistados compravam alimentação pronta. De acordo com a pesquisa, os restaurantes convencionais detinham 25% desse mercado e os *fast-food*, 48% (Collins, 1997).

No Brasil, estimativas do final dos anos 1990 referiam-se à cerca de 2 mil toneladas de alimentos consumidos diariamente no mercado de refeições coletivas e, então, um potencial superior a 20 milhões de refeições ao dia (ABERC, 1995). Atualmente, esse potencial é avaliado em cerca de 40 milhões de

refeições/dia, sendo 23 milhões para empregados de empresas e 17 milhões em escolas, hospitais e outras instituições. Esses dados permitem concluir que os serviços de alimentação para coletividades representam um negócio em expansão, em nosso país, tendo faturado, em 2003, cerca de dez bilhões de reais, excluindo desse total o referente a cestas básicas e ao sistema “vale-alimentação”. Nesse ano, nove milhões de pessoas, em média, foram atendidas diariamente por restaurantes de empresas e restaurantes comerciais conveniados do sistema “vale-refeição” (ABERC, 2004).

Essas análises evidenciam a responsabilidade das UAN em relação à segurança dos alimentos. Com o crescimento desses serviços, os alimentos ficaram mais expostos a uma série de perigos representados pelas chances de contaminação microbiana, associadas a práticas incorretas de manipulação e processamento (Almeida et al, 1995). A importância das UAN na origem de surtos de doenças de origem alimentar parece proporcional às substanciais quantidades de alimentos preparados e servidos nesses locais (Bryan & Bartleson, 1985; Avens et al.,1978).

A educação das pessoas envolvidas no preparo, no processamento e na distribuição dos alimentos constitui linha crucial de defesa na prevenção de grande parte dessas enfermidades, as quais tanto podem ser causadas pelo contato direto do manipulador com o alimento quanto pela contaminação cruzada. Os fatores mais importantes que contribuem para a ocorrência dessas doenças são: refrigeração inadequada, o preparo do alimento várias horas antes da sua distribuição, o congelamento inadequado, a presença de manipuladores portadores assintomáticos de microrganismos patogênicos, o reaquecimento inadequado, a contaminação cruzada e a limpeza inadequada dos equipamentos e utensílios envolvidos no preparo (Martínez-Tomé et al., 2000; Bryan, 1988).

A falta de consciência dos manipuladores faz com que a maioria dos surtos ocorra como resultado do manuseio incorreto do alimento, tanto em residências quanto em restaurantes, bufês e lanchonetes. Em pesquisas realizadas nos Estados Unidos, os restaurantes foram os lugares mais incriminados na origem dos surtos (Martínez-Tomé et al., 2000; Fein et al., 1995; Todd, 1992). No Reino Unido, por exemplo, 57% de 444 manipuladores de alimentos que trabalhavam em 104 pequenas empresas de alimentos não sabiam que a intoxicação alimentar

podia ser causada por alimentos aparentemente inócuos quando avaliado por meio dos sentidos (visão, olfato e paladar) e não compreendiam aspectos cruciais de higiene, como limpeza de superfície de trabalho, além de não conhecerem valores de temperatura de cozimento e de estocagem de alimentos, necessários para controlar os agentes microbianos (Walker et al., 2002).

Autores como Fessenden-Raden (1987) e Lee (1989), citados por Frewer et al. (1994), têm enfatizado a importância da informação na determinação da percepção de risco. Nesse aspecto, destaca-se o papel da educação em segurança alimentar, pois só o indivíduo consciente da cadeia de contaminação, dos perigos associados e do controle efetivo para a prevenção das enfermidades associadas aos alimentos é capaz de garantir ou mesmo exigir a qualidade sanitária do alimento (Angelillo et al., 2001; Martinez-Tomé et al., 2000; Bryan et al., 1988). Em quaisquer das etapas de produção, os manipuladores de alimentos têm participação fundamental na prevenção, redução ou eliminação dos perigos, através da adoção de práticas básicas de higiene pessoal, do ambiente, dos equipamentos, dos utensílios e dos alimentos (Griffith et al., 1998; Fein et al., 1995).

No Brasil, estimativas de Silva Jr. et al., de 1990, apontavam unidades de produção de alimentos como responsáveis por mais de 50% dos surtos de toxinfecções alimentares de origem bacteriana. Em países desenvolvidos, como é o caso da Holanda, Simone et al. (1997) pesquisaram as origens de surtos e verificaram que mais de 50% do total ocorreram em serviços de alimentação, locais onde se registraram, também, aqueles que envolveram os maiores números de pessoas.

Apesar dos problemas freqüentemente encontrados em ambientes de processamento de alimentos, Collins (1997) afirmou que um grande número de programas tem sido desenvolvido para a indústria de *food-service*, nos EUA, para educar manipuladores sobre aspectos relacionados a alimentos e comportamentos pessoais, em prol da segurança dos alimentos. O *Food Marketing Institute*, por exemplo, tem um Programa de Certificação e Proteção de Alimentos para pessoal de supermercados, informando sobre requerimentos da *Food and Drug Administration* (FDA), relativos à manipulação de alimentos e à higiene. Semelhantemente, a *National Restaurant Association* tem desenvolvido

um programa denominado *Serve-Safe*, desenvolvido para educar trabalhadores de serviços de alimentação sobre a manipulação segura dos alimentos. Associada a estes, a *United States Environmental Protection Agency* desenvolveu um programa para melhorar a educação de consumidores, varejistas, empregados de serviços de alimentação, veterinários e pessoal de indústrias (*United States Department of Agriculture – USDA*, 1997). No Brasil, ressen-te-se da falta de programas tão abrangentes e efetivos, especialmente em níveis de comunidades municipais.

Mesmo em países que empreendem esforços de educação na área de higiene, os manipuladores de alimentos não estão plenamente preparados para suas funções. Vários estudos têm demonstrado que o grau de consciência ainda está longe do desejável, mais ainda em países em desenvolvimento. Além disso, percebe-se que há discrepância entre o que se sabe e o que realmente se pratica (Fein et al., 1995; Frewer et al., 1994; Brewer et al., 1994). Um estudo realizado recentemente em um hospital militar na Turquia demonstrou que práticas de processamento e distribuição de alimentos, nível de higiene pessoal e precauções com relação à contaminação cruzada são insatisfatórios, requerendo investimentos para sua melhoria (Ayçiçek et al., 2003). Achados semelhantes foram encontrados em um hospital da cidade de Belém, no Brasil, onde se constataram péssimas condições higiênico-sanitárias (Sousa & Campos, 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde é responsável pela fiscalização dos alimentos industrializados e tem por atribuição o controle de segurança da qualidade. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) coordena o sistema de controle nos serviços de alimentação - incluindo restaurantes, bares, lanchonetes, empresas de refeições coletivas, panificadoras, lojas de conveniência e mercearias. (Cavalli, 2001). Apesar dos programas de fiscalização, a constatação de que a maioria dos surtos de doenças de origem alimentar é causada por patógenos veiculados por alimentos preparados em UAN justifica a preocupação com a magnitude e expansão do setor. Os números de surtos de toxinfecções alimentares parecem estar correlacionados às magnitude dos pólos de industrialização de um país, em unidades de alimentação de grande porte, locais em que centenas ou milhares de quilos de alimentos são preparados e

passam por longos períodos de espera, entre preparo e distribuição, nos refeitórios das fábricas (Schilling, 1998).

O controle higiênico-sanitário é um desafio constante para proteger os consumidores e garantir a qualidade dos produtos e serviços (Anklam & Battaglia, 2001). A detecção e rápida correção das falhas no processamento dos alimentos, bem como a adoção de medidas preventivas, são as principais estratégias para o controle de qualidade desses produtos, especialmente em UAN (Almeida et al., 1995). Com esse objetivo, o sistema conhecido no Brasil como APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) vem sendo mostrado como de grande eficiência para identificar, avaliar e controlar perigos de diversas naturezas (CEL, 2002; Ropkins & Beck, 2000). É um sistema basicamente preventivo, que busca a produção de alimentos inócuos e tem como base a aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manejo dos alimentos, desde o campo até a mesa do consumidor (Almeida, 1998; Almeida, 1995). A portaria 1428/93, instituída pelo Ministério da Saúde através do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1993a) recomenda a adoção desse sistema para avaliar a eficácia e efetividade dos processos, meios e instalações dos estabelecimentos produtores de refeições. Esse método vem sendo difundido no mundo inteiro e recomendado pela Organização das Nações Unidas (ONU) aos seus países membros (Rêgo et al., 2001).

Mesmo existindo falhas nas instalações físicas e deficiência de equipamentos – fatos corriqueiros, infelizmente, na grande maioria de nossas UAN - é possível obter êxito no controle dos pontos críticos no processo de produção de refeições, utilizando-se o APPCC. Isto é corroborado por vários autores que confirmam a importância da aplicação do sistema na produção de alimentos, de forma a garantir que o produto final seja seguro para consumo (Sousa & Campos, 2003; Jeng & Fang, 2003; Campos et al., 2001; Collins, 1997; Tancredi et al., 2001). A implementação do APPCC, entretanto, só pode ser plenamente efetivada mediante a adoção das Boas Práticas de Manipulação, as quais reúnem os procedimentos básicos para se atingir padrões de identidade e qualidade de produtos e serviços na área de alimentos (Jeng & Fang, 2003).

2.4. - *Bacillus cereus*

Entre as intoxicações veiculadas por alimentos estão aquelas causadas por *Bacillus cereus*, que é um bastonete móvel, Gram-positivo, formador de esporos, aeróbio ou anaeróbio facultativo, microrganismo deteriorador e patogênico, responsável por duas formas de intoxicação alimentar, uma emética e outra diarréica (Agata et al., 2002; Kotiranta et al., 2000; Granum, 1994). Além de comumente encontrado no solo, o microrganismo tem sido isolado de diversos alimentos, entre os quais se incluem carnes, arroz, sopas, pudins, vegetais crus (Rhodehamel & Harmon, 1995), e também produtos farmacêuticos (Arribas et al., 1988).

Considerando a importância de *B. cereus* como agente patogênico alimentar, o conhecimento de suas características é relevante para seu controle. De acordo com dados compilados a partir de diversos autores, *B. cereus* exibe as seguintes propriedades:

- crescem em alimentos com atividade de água (aw) $\geq 0,95$, conforme observações de Bryan et al. (1981) e Raevuori & Genigeorgis (1975);
- multiplicam-se entre 5 e 50°C (Johnson et al., 1983), com faixa ótima situada entre 28 e 35°C (Gilbert, 1979);
- exibem crescimento na faixa de pH entre 4,35 a 9,3 (Kim & Goepfert, 1971);
- a germinação de esporos ocorre entre 5 e 50°C e os tempos de geração podem variar entre 26 e 57 min, a temperaturas próximas de 30°C, segundo Johnson et al. (1983);
- a resistência térmica dos esporos varia entre estirpes e com o substrato em que são aquecidos: Sarrías et al. (2002) encontraram valores $D_{100^\circ\text{C}}$ entre 0,4 a 1,1 min e Rajkowsky & Mykolajcik (1987), observaram esses tempos na faixa de 0,6 a 27 min; Dufrenne et al. (1994) registraram variações de $D_{90^\circ\text{C}}$ entre 4,6 e 200 min.

Essa bactéria apresenta notável resistência e capacidade para sobreviver a tratamentos de descontaminação, o que torna difícil seu controle, especialmente em ambientes de processamento de alimentos (Peng et al., 2001). É importante

ressaltar, também, que cepas psicrófilas de *B. cereus* têm sido observadas com frequência. Dufrenne et al. (1994) isolaram estirpes capazes de crescer a temperaturas $\leq 7^{\circ}\text{C}$ e relataram que não são essencialmente diferentes das que crescem em temperaturas $> 10^{\circ}\text{C}$, o que representa um problema emergente na produção de alimentos seguros.

A contagem de *B. cereus* em alimentos pode ser feita pelo método de semeadura direta em placas ou pelo método do número mais provável (NMP), este recomendado quando se esperam contagens abaixo de 10 microrganismos/g de material. No método de contagem em placas, o meio de cultura mais utilizado é o Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), que usa a polimixina B-sulfato como agente seletivo, enquanto a gema de ovo e o manitol são usados como agentes diferenciais. Colônias de *B. cereus* são manitol-negativas e apresentam-se usualmente róseas, cor que se torna mais intensa após incubação adicional. A reação de produção de lecitinase evidencia-se pelo halo denso e opaco de precipitação de lecitina (Rhodehamel & Harmon, 1995). O meio MYP foi avaliado recentemente por um grupo de laboratórios europeus e seu desempenho equiparado ao do ágar PEMBA, meio que contém, também, polimixina e gema de ovo, usando, como indicador, o azul de bromotimol (Schulten et al., 2000).

A caracterização de *B. cereus* e de outros membros do grupo tem sido conseguida pelo uso de técnicas bioquímicas e moleculares. Como rotina, os laboratórios continuam adotando a metodologia de identificação por meio de testes morfológicos e bioquímicos, cuja validade tem sido confirmada em estudos feitos por laboratórios de referência (Schulten et al., 2000).

Um sumário das características marcantes desses microrganismos é apresentado no Quadro 2.1, reunido a partir de dados fornecidos por Rhodehamel & Harmon (1995) e Claus & Berkeley (1986).

Quadro 2.1. – Características diferenciais de espécies do grupo de *Bacillus cereus*

Propriedade	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
Reação de Gram	+ ^a	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Lecitinase	±	±	±	+
Ácido a partir de manitol	–	–	–	–
Utilização aneróbia de glicose	+	+	+	+
Motilidade	± ^b	– ^c	±	–
Hemólise em sangue de carneiro	+	+	+	–
Crescimento rizóide	–	+	–	–
Produção de cristais tóxicos	–	–	+	–
Redução de nitrato	+	+	±	+
Reação VP	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	+	±	+	– ^d
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Utilização de citrato	+	+	+	+

Fonte: Rhodehamel & Harmon (1995); Claus & Berkeley (1986)

^a + 90 a 100% as cepas são positivas

^b ± 50 a 90% as cepas são positivas

^c – 90 a 100% das cepas são negativas

^d – a maioria das cepas são negativas

A maioria das cepas de *B. cereus* é capaz de elaborar uma grande variedade de metabólitos extracelulares, principalmente durante a fase de crescimento exponencial, entre os quais toxinas ou fatores de virulência identificados em ensaios de laboratório, associados epidemiologicamente a surtos de infecções ou intoxicações alimentares (Turnbull et al., 1979; Kramer & Gilbert, 1989). Dois tipos de intoxicação são atribuídas a *B. cereus*: uma diarreica e outra emética (Agata et al., 2002; Finlay et al., 2002; Granum, 1994; Turnbull et al.,

1979). A toxina diarréica foi testada pela primeira vez na Noruega (Hauge, 1955) e a intoxicação emética foi reconhecida pelo *Public Health Laboratory Service*, de Londres, em 1972 (Rivas & Rodricks, 1979).

A toxina diarréica, mais exatamente o complexo enterotóxico, é de natureza protéica, termolábil e sensível a extremos de pH e à ação de enzimas proteolíticas (Granum & Lund, 1997; Turnbull et al., 1979). A enterotoxina pode ser pré-formada no alimento, mas existem fortes evidências de que a síndrome decorre, especialmente, da ingestão de esporos e células, seguida da colonização do íleo e produção do agente tóxico no próprio organismo (Granum, 1997; Singh et al., 1984).

Já a toxina emética, ou cereulídeo, é um peptídeo lipofílico termoestável, resistente a mais de 100°C por tempo superior a 90 min, a valores de pH entre 2 e 11 e à exposição a pepsina e tripsina (Jääskeläinen et al., 2003; Azeredo & Serrano, 1999). De maneira geral, os sintomas associados à toxina emética são leves e de curta duração, fato que pode, inclusive, explicar a dificuldade de seu diagnóstico. Entretanto, Mahler et al. (1997) relataram casos fatais decorrentes de danos hepáticos causados pelo cereulídeo, um dos quais associado ao consumo de macarrão altamente contaminado com o microrganismo.

As características dos dois principais tipos de intoxicações alimentares causadas por *B. cereus* estão relacionadas no Quadro 2.2, compilado a partir de dados de diversos autores (Granum & Lund, 1997; Granum, 1997, 1994; Kramer, 1989).

Com relação à dose infectante, o BAM - *Bacteriological Analytical Manual* (Rhodehamel & Harmon, 1995) considerou o consumo de alimentos com contagem $\geq 10^6$ *B. cereus*/g capaz de causar intoxicação alimentar. Entretanto, já foram observadas cepas de *B. cereus* capazes de causar intoxicação alimentar com números bem mais baixos, entre 10^3 - 10^4 UFC/g, fato que suscitou a preocupação de produtores de alimentos (Andersson et al., 1995). Anteriormente, os níveis de contaminação considerados de risco eram bem mais altos: em 1976, a FDA, por meio de seu *Bureau of Foods*, instituiu a contagem de 10^7 UFC/g com potencialidade para causar toxinfecção alimentar.

Quadro 2.2. - Características das síndromes atribuídas a *Bacillus cereus*

Característica	Síndrome Diarréica	Síndrome Emética
Dose infectante	$10^5 - 10^7$ UFC/g	$10^5 - 10^8$ UFC/g
Produção de toxina	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Protéica	Cadeia polipeptídica
Período de incubação	8-16 horas (ocasionalmente > 24h)	0,5-5h
Duração da doença	12-24h (ocasionalmente vários dias)	6-24h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa e, ocasionalmente, náusea	Náusea, vômito e mal-estar (pode evoluir para diarreia, por produção de enterotoxina)
Alimentos mais envolvidos	Carnes, sopas, vegetais, pudins, molhos, leite e derivados	Arroz cozido ou frito, macarrão e massas

Fonte: Granum & Lund, (1997); Granum, (1997, 1994); Kramer, (1989)

A associação de *B. cereus* a intoxicações alimentares tem sido relatada desde 1955. Os agentes de doenças de origem alimentar diferem de país para país, de forma que a importância de cada um se reflete na porcentagem de surtos ou casos atribuídos a esse agente. O tipo diarréico, por exemplo, tem sido registrado na Hungria, Finlândia, Bulgária e Noruega com maior frequência que o tipo emético, este prevalente no Japão e Reino Unido entre 1950-1985. Entre 1973 e 1985 *B. cereus* foi considerado responsável por 17,8% de intoxicações alimentares na Finlândia, 11,5% na Holanda, 0,8% na Escócia, 0,7% na Inglaterra e País de Gales, 2,2% no Canadá, 0,7% no Japão e 15% (entre 1960-1968) na Hungria (dados de Kramer & Gilbert, 1989). Na Noruega, em 1990, *B. cereus* foi o microrganismo mais incriminado em surtos de intoxicações alimentares. Em Taiwan foram estudados 74 surtos de doenças de origem alimentar causadas por bactérias no ano de 1994, dos quais 14,9% foram atribuídos a *B. cereus* (Aas et al., 1992, e Pan et al., 1996, apud Kotiranta et al., 2000). De acordo com Simone et al. (1997), foi o microrganismo responsável pelo maior número de incidentes de etiologia conhecida, na Holanda, entre 1991 e 1994.

Apesar das evidências da contaminação dos alimentos atribuídos a *B. cereus*, os dados relativos a intoxicações alimentares por este patógeno no

Brasil, são escassos, porém sua importância epidemiológica não pode ser subestimada. Um estudo desenvolvido por Salzberg et al. (1982), levou à imediata suspeita do microrganismo na etiologia de um surto ocorrido em dois restaurantes institucionais, na cidade de Campinas - SP. Um levantamento publicado por Passos & Kuaye (1996), referentes aos anos de 1987 a 1993, apresentaram resultados de investigação da Vigilância Sanitária Municipal de Campinas, segundo os quais, de 19 surtos comprovados, *B. cereus* foi incriminado em 68,4% dos casos.

Destaca-se ainda, em dados recentes da literatura, a associação de *B. cereus* a uma citotoxina (que vem sendo denominada CytK) capaz de causar enterite necrótica, similar, porém não tão severa, à causada pela β -toxina de *Clostridium perfringens* tipo C. Essa toxina já levou a vários casos de intoxicações alimentares, tendo sido a causa responsável por três óbitos (Lund et al., 2004).

Muitas tentativas foram feitas para identificar e caracterizar cepas de acordo com o tipo patogênico. O teste de amido foi proposto por Jinbo & Kokubo (1982), como parte de um esquema simples de biotipagem, de forma que cepas patogênicas de *B. cereus* poderiam ser identificadas a partir de sua incapacidade em hidrolisar amido. Shinagawa et al. (1979) já haviam verificado que 82 exemplares de *B. cereus* isolados de surtos eméticos eram todos amilase-negativos. Posteriormente, Shinagawa et al. (1985) comprovaram que apenas as cepas eméticas são, sistematicamente, negativas ou fracamente amilolíticas, enquanto cepas diarréicas comumente hidrolisam amido: de 53 isolados amilase-positivos, 41,5% produziam toxina diarréica. O teste de amido foi recomendado por Shinagawa (1993), como forma preliminar de selecionar cepas eméticas de *B. cereus*. A associação de cepas amilase-negativas com produção de toxina emética foi confirmada, também, por Nishikawa et al. (1996).

Uma das características de *B. cereus* que se reveste de importância primária, ao se tratar de formas de controle de disseminação do patógeno, refere-se ao fato de que seus esporos são particularmente resistentes ao calor, à desidratação e à luz UV (Pirttijärvi et al., 2000). 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.

Para Kotiranta et al. (2000) os esporos não só são importantes para disseminar o microrganismo como, também, podem favorecer sua adesão. São esporos muito aderentes a diferentes superfícies, o que leva à grande dificuldade no seu controle. A aderência de *B. cereus* deve-se a três características: morfologia, hidrofobicidade e baixa carga de superfície dos seus esporos, os quais são cobertos com apêndices que promovem a adesão (Andersson et al, 1995).

2.5. - Contaminação do ar e de superfícies em ambientes de processamento de alimentos

2.5.1. - Contaminação do ar por microrganismos

A qualidade do ar em unidades de processamento de alimentos pode não afetar diretamente a segurança microbiológica, ou a manutenção da qualidade, em se tratando de alimentos pouco perecíveis. No entanto, alimentos mais suscetíveis à deterioração são particularmente sensíveis à contaminação por microrganismos transportados pelo ar (Sveum, 1992). Assim, a avaliação do nível de contaminação microbiológica do ar em locais de risco é considerada um passo básico em direção à prevenção (Pasquarella et al., 2000).

De acordo com a Portaria nº 368, de 4/9/1997 do MAA (BRASIL, 1997), o ar contaminado deve ser eliminado dos ambientes das áreas onde os alimentos são processados ou preparados, e deve ser renovado freqüentemente, através de equipamentos de insuflação e exaustão, devidamente dimensionados.

Além das partículas não biológicas, provenientes principalmente da combustão de cigarro e de combustíveis, que estão associadas a agravos na saúde, destacam-se os bioaerossóis, que correspondem a material biológico transmitido pelo ar. Os contaminantes biológicos incluem microrganismos (bactérias, fungos, vírus), ácaros, pólen, traças, pêlos e fezes de animais. As bactérias e os fungos são os contaminantes mais freqüentemente associados a queixas relativas à qualidade do ar de interiores (Gontijo Filho et al., 2000). Em áreas de processamento de alimentos, são fontes reconhecidas de aerossóis a atividade de pessoal, os drenos do piso, os sistemas de ventilação, a comunicação entre salas distintas, os alimentos derramados, os sistemas de transporte etc. (Hedrick, et al., 1969; Heldman, 1974; Kang & Frank, 1990, apud, Salustiano, 2002). Quaisquer superfícies onde microrganismos possam aderir ou

se depositar irão agir como fontes de contaminação para o ar, em condições apropriadas para a formação de aerossóis (Heldman, 1967, apud Salustiano, 2002).

Células vegetativas de bactérias costumam estar presentes em menor número, no ar, em comparação com esporos bacterianos e de fungos. Isto ocorre em virtude de que as células vegetativas não sobrevivem por longo período em substratos inertes, enquanto esporos são altamente resistentes, mesmo sob condições adversas (Kang & Frank, 1989, apud Salustiano, 2002).

De acordo com Sveum et al. (1992), a determinação da qualidade microbiológica do ar pode ser realizada por uma variedade de métodos, incluindo sedimentação em placas, impressão em superfície de ágar, filtração, centrifugação, precipitação eletrostática, colisão em líquido e precipitação térmica. Os métodos mais comuns são a sedimentação e a impressão em ágar.

Os amostradores de ar por sucção constituem um equipamento baseado no método de impressão em ágar. São denominados 'amostradores de placas' (*sieve samplers*) e imprimem um volume de ar conhecido sobre a superfície de ágar em placa de Petri (Kang & Frank, 1989, apud Salustiano, 2002). Seu princípio de funcionamento está esquematizado na Figura 2.1.

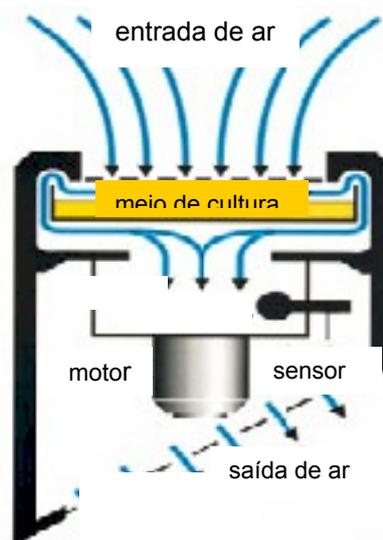


Figura 2.1: Princípio de funcionamento do amostrador de ar.

O equipamento MAS -100, *Air Sampler-Merck*, com um fluxo constante de 100 litros de ar por minuto, é um amostrador capaz de coletar e recuperar partículas viáveis acima de 1 μm (MERCK, 2001). Baseado no amostrador de ar

de Andersen (1958), coleta e imprime o ar na superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultura, logo após atravessar uma placa de metal com 400 poros, igualmente distribuídos, à velocidade de 0,45 metros por segundo (aspiração horizontal). O equipamento tem seu *design* e funcionamento planejados para compensar fatores como influência do fluxo de ar, volume de ágar e dimensão da placa, fornecendo resultados precisos e sendo considerado oficialmente como método Classe B, ou seja, é um método testado, confiável, podendo ser usado com sucesso em situações de pesquisa (Salustiano, 2002). De acordo com Pasquarella et al. (2000), muitos amostradores de ar existentes no mercado apresentam limitações: são caros, pesados, ruidosos e difíceis de higienizar. Eles devem ser continuamente calibrados, caso contrário o volume de ar processado não corresponde às expectativas, além da desvantagem em relação do tamanho da amostra de ar coletada, que pode não ser suficiente para caracterizar a contaminação do ambiente.

Com relação às recomendações para a qualidade microbiológica do ar, alguns padrões têm sido sugeridos. Sveum et al. (1992) sugeriram as recomendações da NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), adotadas pela APHA (*American Public Health Association*), em que são definidas três classes de limpeza (100, 10.000 e 100.000), com níveis de exigência diferentes, de acordo com ambas as técnicas, de sedimentação e por amostradores de sucção de ar (Quadro 2.3). A classe 100 é a mais rígida, utilizada para produção de *microchips*, sendo a classe 100.000 utilizada pela indústria de alimentos, segundo Salustiano (2002).

Quadro 2.3. - Recomendação da NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) para o controle higiênico de ambientes

Teste	Classes de Limpeza do Sistema Métrico Internacional		
	100	10.000	100.000
Nº máximo de partículas viáveis por m ³ de ar	3,5	17,6	88,4
Nº médio de partículas viáveis por cm ² por semana	1,3	6,5	32,0

Fonte: Sveum et al. (1992)

A União Européia estabeleceu, em seu Guia para Manufatura de Produtos Estéreis, na área de medicina, níveis de exigências de qualidade higiênica. Esses limites estão dispostos no Quadro 2.4, compilado por Pasquarella et al. (2000).

Quadro 2.4. – Limites para contagem microbiológica no ar, de acordo com União Européia *

Classe	UFC/m ³	UFC/placa **
A	<1	<1
B	10	5
C	100	50
D	200	100

* Fonte: Pasquarella et al. (2000)

** Placas de Petri com diâmetro de 90 mm, expostas por 4 h

Como as relações entre dose x exposição por biocontaminantes de interiores são usualmente pouco conhecidas, estudos integrados, incluindo pesquisadores de área básica, clínicos e epidemiologistas, são necessários para: a) auxiliar no diagnóstico de doenças; b) estabelecer limites de exposição para os usuários; c) definir qualidade aceitável para o ar de interiores; d) estabelecer protocolos e estratégias para o monitoramento do ambiente de interiores; e) avaliar a aplicabilidade e relação de custo/efetividade das medidas, nas diversas regiões do Brasil (Gontijo Filho et al., 2000). Tais considerações aplicam-se a microrganismos, para que seus níveis de incidência, no ar, sejam estabelecidos como limites seguros, em função da natureza de cada patógeno e do ambiente em questão.

2.5.2. - Contaminação de superfícies de preparo de alimentos

Em muitas atividades humanas, os microrganismos presentes no ambiente representam um importante fator de risco (Pasquarella et al., 2000). O ambiente em Unidades de Alimentação e Nutrição é constituído de superfícies de equipamentos, bancadas, utensílios, pisos, paredes etc., os quais podem representar fontes de contaminação, levando à contaminação de matérias primas e de produtos, fato que se intensifica em função de condições higiênicas desse ambiente e do tempo de exposição (Sveum et al., 1992).

Relacionados à indústria de laticínios, por exemplo, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos, para identificar fontes de microrganismos. A contaminação de superfícies e a microflora proveniente do ar são consideradas as principais fontes de agentes patógenos e deterioradores, nesses locais (Kumar & Anand, 1998). Trabalhos semelhantes, em cozinhas de restaurantes e instituições, são raros. Se a contaminação de superfícies por microrganismos patogênicos e deterioradores é causa de preocupação na indústria de alimentos, a mesma preocupação se estende às UAN.

As propriedades de superfícies de materiais que entram em contato com alimentos têm sido levadas em consideração por autoridades regulatórias, ao determinarem especificações de topografia. Nos Estados Unidos, por exemplo, há padrões exigentes de acabamento para superfícies que determinam sua condição livre de ranhuras e fendas (Jullien et al., 2002). No Brasil, a Portaria nº 368, de 4/9/1997 do MAA (BRASIL, 1997) prevê que essas superfícies deverão ser lisas e isentas de imperfeições (fendas, amassaduras etc) que possam comprometer a higiene dos alimentos ou sejam fontes de contaminação. Os argumentos decisivos na escolha do material para os equipamentos da linha de processamento são as condições higiênicas (baixa capacidade de acumular sujeira ou alta facilidade de limpeza), juntamente com suas propriedades anticorrosivas e mecânicas, segundo Holah & Thorpe (1990), apud Jullien et al. (2002).

Entre os materiais freqüentemente utilizados em unidades de alimentação e nutrição, o aço inoxidável vem sendo preferencialmente escolhido para superfícies de trabalho ou pias, há muitos anos, por ser resistente à corrosão, duradouro, de fácil fabricação e altamente higiênico. Ainda que materiais como policarbonato, resina mineral e alguns aços esmaltados, quando novos, sejam de limpeza tão fácil quanto o aço inoxidável, este tende a conservar essas características por muito mais tempo, devido à sua resistência à abrasão e ao impacto (Stevens & Holah, 1993; Holah & Thorpe, 1990, apud Kusumaningrum et al., 2003).

B. cereus desempenha um papel destacado entre os contaminantes de superfícies, já que possui esporos e células com grande habilidade de aderir a aço inoxidável e outros materiais. A presença de estruturas celulares de *B. cereus*, como flagelos, *pili* e polissacarídeos extracelulares, contribuem para a adesão do microrganismos a superfícies diversas, inclusive aço inoxidável (Peng et al.,

2001). A multiplicação das células aderidas pode, subseqüentemente, levar à formação de biofilmes, os quais são excepcionalmente resistentes aos produtos de higienização, representando um grave problema para unidades de processamento de alimentos (Kumar e Anand, 1998).

Os microrganismos são atraídos para superfícies sólidas que contêm partículas de nutrientes, essenciais à sua viabilidade e ao seu crescimento. Inicialmente, microrganismos em forma de células viáveis ou de esporos se depositam nas superfícies ricas em nutrientes de equipamentos, bancadas e utensílios, onde ficam aderidas. As células (e os esporos, após passarem pelo processo de germinação) começam a se multiplicar e formar colônias suficientemente grandes para englobar materiais orgânicos e inorgânicos, formando o filme microbiano (Kumar & Anand, 1998). O termo 'biofilme' pode ser descrito como uma matriz biologicamente ativa, formada por células microbianas e substâncias extracelulares, em associação com uma superfície sólida (Bakke et al., 1984, citados por Kumar & Anand, 1998). Outros autores definem o biofilme como um "consórcio funcional de microrganismos aderidos a uma superfície, embebido em substâncias poliméricas extracelulares, produzidas pelos próprios microrganismos" (Costerton et al. 1987, apud Kumar & Anand, 1998).

Algumas considerações relacionadas aos biofilmes são extremamente relevantes, sob a ótica deste trabalho: formados em superfícies de ambientes onde se preparam alimentos, favorecem a contaminação cruzada e a deterioração de alimentos prontos, levando a problemas de higiene e a perdas econômicas (Kumar & Anand, 1998).

O controle dos biofilmes é mais eficaz quando preventivo, evitando o acúmulo de partículas e, conseqüentemente, inibindo o crescimento bacteriano nas superfícies. Outros importantes fatores de prevenção são o desenho higiênico de equipamentos e a natureza dos materiais utilizados nos acabamentos de superfícies, os quais devem proporcionar condições para dificultar a aderência e facilitar a limpeza. O *layout* correto é mais um item em prol da prevenção, por proporcionar fluxos de atividades que contribuem para a redução das chances de contaminação cruzada dos alimentos e do próprio ambiente (Kumar & Anand, 1998). A eliminação dos biofilmes, por sua vez, requer procedimentos de higienização que incluem a remoção física dos resíduos e a aplicação de

sanitizantes químicos (Kumar & Anand, 1998). Vale mencionar que os biofilmes manifestam acentuada resistência à ação de agentes antimicrobianos, incluindo sanitizantes de uso comum em cozinhas, como compostos clorados e quaternários de amônia, podendo degradar esses agentes por meio de enzimas produzidas pelos microrganismos constituintes do filme (Peng et al., 2002; Kumar & Anand, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em cinco Unidades de Alimentação e Nutrição, sendo uma unidade institucional (aqui denominada 'restaurante 1') e quatro unidades comerciais (denominadas restaurantes 2, 3, 4 e 5), tomadas aleatoriamente na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

As atividades de identificação e quantificação do microrganismo foram realizadas no Laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

3.1. - Coletas das amostras

3.1.1. - Pontos do ambiente onde foram feitas as coletas

No Quadro 3.1 estão relacionados os restaurantes e os respectivos pontos do ambiente onde ocorreram as coletas. As diferenças entre os restaurantes – com relação a fluxo e organização de trabalho, dimensões e, mesmo, atividades desenvolvidas, determinaram a escolha dos pontos ambientais onde se fizeram as coletas, procurando obter abrangência que garantisse a representatividade das áreas de cada unidade em estudo. No caso do restaurante 5, as dimensões reduzidas do ambiente e o pequeno número de bancadas levaram à redução do número de pontos para quatro.

A definição dos pontos foi feita com base na atividade predominante do local, ainda que, freqüentemente, duas ou mais tarefas distintas fossem executadas em áreas comuns.

Quadro 3.1. – Definição dos locais (pontos do ambiente) onde foram tomadas as amostras, em cada restaurante

Pontos do ambiente	Restaurantes				
	1	2	3	4	5
A	Pré-preparo de vegetais	Pré-preparo de vegetais	Pré-preparo de vegetais	Pré-preparo de vegetais	Pré-preparo de vegetais
B	Lanches	Massas	Massas	Massas	Lanches e apoio
C	Cocção	Cocção	Cocção	Cocção e lavagem de vasilhames	Cocção e lavagem de vasilhames
D	Lavagem de vasilhames	Lavagem de vasilhames	Lavagem de vasilhames	Preparo de bebidas	Distribuição
E	Distribuição	Carnes e distribuição	Distribuição	Apoio e distribuição	

3.1.2. - Frequência das coletas

Foram feitas três coletas em cada unidade selecionada, distribuídas durante o período compreendido entre agosto e setembro de 2003. A cada coleta, todos os pontos ambientais eram submetidos à avaliação da contaminação do ar e das superfícies de trabalho. Assim, foram realizadas 144 amostragens, sendo 72 no ar e outras 72 em superfícies de bancadas, relativas às três repetições de coletas feitas nos cinco restaurantes, em quatro ou cinco pontos ambientais.

3.2. - Avaliação da presença de *Bacillus cereus* em Unidades de Alimentação e Nutrição

3.2.1. - Avaliação da presença de *Bacillus cereus* no ar

As análises das amostras de ar foram feitas por método de impressão em ágar (Sveum et al., 1992), usando equipamento que dirige o fluxo de ar aspirado a uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20 mL do meio de ágar MYP, seletivo para *B. cereus*.

O equipamento em questão foi o “*Microbiological Air Sampler*” (MAS-100) da Merck, de um estágio, escolhido devido à praticidade e conveniência de uso desse amostrador portátil. A cada ponto analisado, o volume de ar coletado foi de 500 L, definido por testes preliminares em função do grau de dificuldade na

recuperação do microrganismo, a partir do ar. A cada coleta, o processo de aspiração era feito em duplicata, em cada ponto selecionado.

Antes das coletas, a tampa do amostrador era esterilizada em autoclave (121°C/15 minutos) e sanitizada com álcool etílico a 70%, nos intervalos entre amostragens. Após cada ciclo de aspiração, a placa em questão era removida do amostrador, tampada e incubada a 32°C, por 24 h.

3.2.2. - Avaliação da presença de *Bacillus cereus* em superfícies de bancadas

As superfícies de bancadas e equipamentos foram examinadas por meio da técnica do *swab*, adotando procedimento proposto pela APHA (*American Public Health Association*), descrito por Sveum et al. (1992), para remoção dos microrganismos das bancadas (cinco pontos ambientais nos restaurantes 1, 2, 3 e 4; quatro pontos no restaurante 5).

Previamente, os *swabs* foram esterilizados a 121°C/15 minutos, inseridos em frascos de vidro dotados de tampas rosqueáveis. Para o procedimento de coleta, cinco *swabs* eram mergulhados em tubos contendo 10 mL de solução estéril de peptona a 0,1%, adicionada de *Tween-80* na proporção de 1% (v/v). Então, cada *swab* era friccionado na superfície da bancada a um ângulo de 30°, percorrendo uma área de 50 cm² em cada bancada, por três vezes consecutivas, mudando a direção ao final de cada passagem. A operação se repetiu com os cinco *swabs*, em diferentes áreas da mesma bancada, totalizando uma coleta em 250 cm². A seguir, cada *swab* foi devolvido ao tubo com solução peptonada, sendo a parte manuseada quebrada e descartada. As coletas foram realizadas durante as operações de processamento dos produtos, tomando-se a precaução de não interferir nos procedimentos habituais dos funcionários.

O material coletado foi levado ao laboratório, dentro de um recipiente isotérmico resfriado com gelo, para os procedimentos de isolamento e contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) típicas, em meio de ágar MYP.

3.3. - Isolamento de exemplares presuntivos de *Bacillus cereus*

Alíquotas de 0,1 mL das diluições (10⁰ e 10⁻¹) eram semeadas em duplicatas de placas de Petri contendo ágar vermelho de fenol - gema de ovo -

manitol - Polimixina B, conhecido como ágar MYP ou meio de Mossel, seletivo para *B. cereus*, para contagem e isolamento de exemplares presuntivos do microrganismo, seguindo metodologia descrita por Rhoddehamel & Harmon (1995), aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). As placas eram, então, incubadas a 32°C por 18 a 24 h para a contagem de colônias típicas de *B. cereus*.

Eram consideradas como presumíveis UFC de *B. cereus* as colônias que tornavam o meio rosado, circundadas por um halo denso e opaco de precipitação de lecitina (bactérias pertencentes ao grupo de *B. cereus* são, em geral, manitol-negativas e produzem forte reação de lecitinase).

Em placas com três ou mais colônias características, pelo menos duas delas eram submetidas aos testes de confirmação e identificação. Quando o número de colônias foi inferior a três, procurava-se isolar todas as colônias. As colônias eram repicadas para tubos de cultura contendo ágar nutriente inclinado, incubados por 24 h a 32°C e, então, estocados a 4°C.

3.4. - Confirmação, diferenciação em espécies e expressão da contaminação ambiental por *Bacillus cereus*

A confirmação dos isolados como membros do grupo de *B. cereus* e a sua diferenciação em espécies foi feita de acordo com a metodologia aprovada pela FDA, descrita por Azeredo (1998). As culturas estocadas sob refrigeração eram, inicialmente, ativadas por cultivo em forma de estrias feitas em meio de ágar nutriente, em tubos inclinados, incubados a 32°C por 18 a 24 horas.

Amostras de cada cultura eram, então, submetidas à coloração de Gram para observação de características morfológicas, ao microscópio e, também, preparadas suspensões individuais, em solução peptonada, para os testes de confirmação e diferenciação de espécies. Cada suspensão era preparada tomando-se uma alçada de 3 mm que era suspensa em 0,7 mL do diluente.

Bastonetes longos, Gram-positivos, dispostos em cadeias e apresentando esporos que não distendem o esporângio, foram submetidos à confirmação com base nas respostas às seguintes provas, todas desenvolvidas em duplicatas:

- **Teste de decomposição da tirosina:** alçadas de 3 mm de cada cultura em teste foram estriadas nas rampas de tubos contendo ágar tirosina inclinado. Após incubação a 35°C por 48 h (prolongados por até sete dias), observou-se o desenvolvimento de uma zona transparente de decomposição e dissolução dos cristais de tirosina, na região abaixo da rampa (teste positivo), ou não formação dessa zona, mantendo o meio opaco inalterado (teste negativo). Cepas de *B. cereus* decompõem a tirosina, formando um halo transparente sob a cultura, normalmente após 48 h.
- **Teste de utilização de glicose em anaerobiose:** alçadas de 2 mm de cada cultura foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo glicose-vermelho de fenol, os quais eram incubados sob anaerobiose a 35°C por 24h. Após esse tempo, o crescimento dos microrganismos foi evidenciado pela turbidez do meio. A ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio vermelho para amarelo, indicava resultado positivo. A manutenção da cor vermelha foi interpretada como incapacidade de o microrganismo produzir ácido, a partir de glicose, sob condições anaeróbias (teste negativo). As cepas de *B. cereus* utilizam glicose e produzem ácido, sob tais condições.
- **Teste Voges-Proskauer (VP), modificado para *B. cereus*:** alçadas de 3 mm de cada cultura foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio esterilizado, que foram incubados a 35°C por 48h. Para testar a produção de acetilmetil-carbinol, 1,0 mL de cada tubo era pipetado para um tubo extra e adicionado de 0,6 mL de solução de α -naftol a 5% e 0,2% de solução de KOH 40% e agitados antes da adição de uma pitada de cristais de creatina, na ordem indicada. Periodicamente, por até 1 hora, foi observado o desenvolvimento de cor rósea ou arroxeadada no meio da cultura (teste positivo) ou cor amarela (teste negativo). Cepas de *B. cereus* são VP positivas.
- **Teste de nitrato:** alçadas de 3 mm de cada cultura em teste foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo nitrato. Após incubação a 35°C por 24h, adicionou-se 0,25 ml de cada solução reagente, sendo uma preparada com ácido acético 5N (125 mL) e ácido sufanílico (1 g) e a outra preparada com com ácido acético 5N (200 mL) e α - naftol (0,5%). A redução de nitrato a nitrito é evidenciada

pela cor do meio, que se torna vermelho, característica comum a cepas de *B. cereus*.

Todas as amostras que apresentaram as características básicas reveladas por esses testes, foram consideradas como pertencentes ao grupo de *B. cereus* e submetidas aos testes de diferenciação, para definição de espécies, sempre submetendo os isolados aos testes em duplicatas:

- **Teste de motilidade:** para esse teste o inóculo foi feito em forma de picada no centro de tubos contendo o meio de motilidade, semi-sólido, com, apenas 0,3% de ágar, conforme proposto na metodologia adotada. Diferente de *B. mycoides* e de *B. anthracis*, exemplares típicos de *B. cereus* apresentam motilidade, crescendo difusamente ao longo da linha do inóculo em profundidade.
- **Teste de crescimento rizóide:** para este teste foram usadas placas contendo ágar nutriente, tendo-se o cuidado de trabalhar com a superfície do meio especialmente seca. No centro de cada placa se inoculou, com leve toque da alça de platina, a suspensão referente a cada isolado a ser identificado. Após incubação a 30°C por 48 a 72 h, as colônias formadas foram examinadas para observação morfológica. Estruturas semelhantes a raízes, que se estendem a partir do ponto de inoculação até vários centímetros em direção às bordas da placa, caracterizam o crescimento rizóide, típico de *B. mycoides*, que o diferencia de *B. cereus*.
- **Coloração de cristais paraesporais:** os isolados foram cultivados em ágar nutriente durante quatro a cinco dias, à temperatura ambiente, para permitir a formação de esporos e a lise dos esporângios. Após esse tempo, foram preparados esfregaços devidamente corados que, levados ao microscópio, usando aumento de 2000 vezes, permitiram detectar eventual presença de cristais paraesporais bipiramidais - forma como se apresentam proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* (BRASIL, 1993b).
- **Teste de atividade hemolítica:** este teste foi planejado para diferenciar *B. anthracis*, caso algum dos isolados tido como membro do grupo, sendo imóvel, não apresentasse característica de crescimento rizóide e não tivesse capacidade de decompor tirosina.

Uma vez identificados, os microrganismos caracterizados como *B. cereus* tiveram suas contagens expressas como UFC por unidade de área ou por volume de ar amostrado.

3.5. - Teste de hidrólise de amido (para identificar cepas possivelmente eméticas)

Exemplares dos microrganismos foram cultivados em placas de Petri com ágar nutriente contendo 1% de amido solúvel e incubados a 30°C por 24 h. Após esse tempo, as colônias foram cobertas com solução de lugol para observar a formação de zona de transparência sob e ao redor das colônias, indicativa de hidrólise do amido (o iodo colore de azul arroxeado escuro as cadeias de amido que se mantêm íntegras, não atacadas por amilases). Os resultados foram comparados com uma cepa emética clássica, a NCTC 11143, que se caracteriza por capacidade limitada de hidrolisar as cadeias de amido. Segundo Shinagawa (1990), o teste é considerado negativo para cepas fracamente amilolíticas, com halo pouco definido, restrito aos limites da colônia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. – Avaliação da presença de *Bacillus cereus* em Unidades de Alimentação e Nutrição

Ao todo, 252 colônias típicas em ágar MYP foram seletivamente submetidas a isolamento, obtidas do ar e de bancadas, nos diversos estabelecimentos. Preliminarmente, os microrganismos isolados foram submetidos à coloração de Gram, para visualização ao microscópio. Apenas dois isolados Gram negativo foram encontrados. Três isolados apresentavam morfologia atípica: um exemplar Gram positivo e ambos os isolados Gram negativo não foram reconhecidos como exemplares típicos do grupo de *B. cereus*, por apresentarem formas e, ou dimensões não características (Quadro 4.1).

Quadro 4.1. – Coloração de Gram e observação da morfologia, ao microscópio, de 252 microrganismos isolados de colônias típicas em ágar MYP, obtidos a partir do ar e de superfícies de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG.

Testes	Resultados positivos	
	Nº	%
Coloração de Gram	250	99,2
Morfologia típica	249	98,8

O Quadro 4.2 oferece uma visão geral de como se comportaram, com relação aos testes de identificação (confirmação e diferenciação em espécies), as 249 amostras de microrganismos reconhecidos como possíveis membros do

grupo de *B. cereus*, sendo 124 microrganismos provenientes de amostras de ar e 125 de superfícies de bancadas.

Quadro 4.2. - Testes de identificação a que foram submetidos 249 microrganismos isolados de colônias típicas em ágar MYP, obtidos a partir do ar e de superfícies de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG.

Testes	Resultados positivos	
	Nº	%
Decomposição de tirosina	245	98,4
Utilização de glicose em anaerobiose	247	99,2
Voges-Proskauer, modificado para <i>Bacillus cereus</i>	242	97,2
Redução de nitrato	242	97,2
Motilidade	222	89,2
Crescimento rizóide	16	6,4
Produção de cristais paraesporais	7	2,8

Enquanto neste trabalho a redução de nitrato a nitrito foi observada em 97,2% das amostras obtidas nos restaurantes avaliados, os resultados encontrados por Shinagawa (1990) e Jinbo & Kokubo (1982) revelaram números bem maiores de cepas negativas, 15% e 11,4%, respectivamente. Dados apresentados por Pirttijärvi et al. (2000) relataram a grande ocorrência de cepas atípicas de *B. cereus* em indústria de processamentos de trigo, com 77% de resultados negativos para redução de nitrato, entre 96 isolados. Entretanto, o teste positivo é preconizado pelo sistema ISO (*International Organization for Standardization*), segundo esses mesmos autores, para identificar *B. cereus*. Quanto aos demais testes, os resultados são compatíveis com diversos estudos desenvolvidos a partir de microrganismos isolados de alimentos (Cardoso, 2000; Azeredo, 1998; Shinagawa, 1990).

Todas as cepas que não apresentaram característica de motilidade nem exibiram crescimento rizóide em placas de ágar nutriente eram capazes de hidrolisar tirosina, o que descartou a necessidade de pesquisar possíveis cepas não-hemolíticas de *B. anthracis*.

O desenvolvimento desses testes permitiu identificar a grande maioria dos isolados como espécies relacionadas ao grupo de *B. cereus*, que inclui

B. thuringiensis e *B. mycoides*. Apesar de pertencerem a espécies ainda consideradas distintas, relata-se grande semelhança nas seqüências de DNA entre *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*. Os dois últimos microrganismos podem causar, à semelhança de *B. cereus*, deterioração e intoxicações alimentares (estas em episódios raros), condição acentuada pela capacidade de sobrevivência a tratamento térmico de fervura, comum ao gênero (Manzano et al., 2003). No caso particular de *B. thuringiensis*, existem fortes evidências de sua associação com a produção de enterotoxinas, o que leva a suspeitar de que a presença dessa bactéria em alimentos pode representar um perigo potencial ainda pouco avaliado (Hansen & Hendriksen, 2001; Rivera et al., 2000; Prub et al., 1999).

Com base na metodologia de Rhodehamel e Harmon (1995), foram consideradas pertencentes à espécie de *B. cereus* todas as amostras (geralmente móveis) que apresentaram respostas positivas aos seguintes testes: decomposição de tirosina, utilização anaeróbia de glicose, reação de Voges-Prokauer e redução de nitrato. As cepas com as mesmas características, porém cujos cultivos de esporos exibiam formações coloridas de cristais bipiramidais, quando observadas ao microscópio, foram identificadas como exemplares de *B. thuringiensis*. Da mesma forma, amostras com reações típicas da espécie, porém imóveis e apresentando crescimento rizóide em placas contendo ágar nutriente, eram consideradas *B. mycoides*.

A Figura 4.1 reproduz os resultados do processo geral de identificação. Dos 249 isolados submetidos às provas, 237 foram classificados em três espécies distintas e 12 isolados não apresentaram o conjunto de reações características esperadas, podendo, entretanto, representar estirpes atípicas de membros do grupo. Entretanto, muitos dos microrganismos assim considerados por não serem tidos como VP-positivo, podem enquadrar o grupo de “falsos-negativos” previstos em estudo realizado na Europa, segundo relato de Schulten et al., 2000. Como se esperava, *B. cereus* foi a espécie predominante, com 214 resultados positivos. Dezesseis isolados foram identificados como espécies de *B. mycoides* e sete isolados foram caracterizados como *B. thuringiensis*.

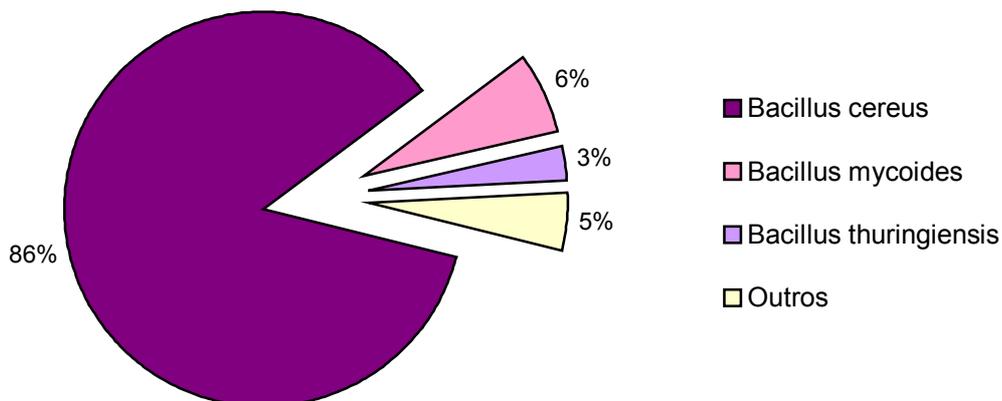


Figura 4.1. - Diferenciação de espécies isoladas de amostras de ar e de superfícies de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

A presença de *B. cereus* foi detectada em todos os restaurantes, em 89 (61,80%) das 144 amostras de ar e bancadas, obtidas em todo o decorrer do experimento. São escassos os dados de pesquisas semelhantes, relatando porcentagens de ambientes contaminados por *B. cereus*. O trabalho descrito por Mosso et al. (1996) relatou a detecção do microrganismo em 24% de 307 amostras coletadas em ambientes de doze serviços de alimentação, na Itália. Evans et al. (2004) encontraram níveis baixos de contaminação por *B. cereus* em nove entre quinze plantas de processamento de alimentos. De forma geral, entretanto, são poucos os trabalhos dedicados a avaliar o ambiente como fonte de contaminação, especialmente em se tratando de *B. cereus*. A detecção do microrganismo na frequência encontrada vem confirmar a hipótese de sua importância como fonte potencial de contaminação nos ambientes em que o estudo foi realizado, especialmente viabilizando a contaminação cruzada dos alimentos.

4.1.1. – Avaliação da presença de *Bacillus cereus* no ar, em Unidades de Alimentação e Nutrição

Os resultados de identificação dos microrganismos provenientes do ar estão dispostos no Quadro 4.3.

Quadro 4.3. – Identificação de 124 cepas típicas em meio de ágar MYP, obtidas de amostras de ar em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Local	Total de isolados	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus mycoides</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>		Outros	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Restaurante 1	13	11	84,6	2	15,4	0	0,0	0	0,0
Restaurante 2	17	16	94,1	0	0,0	1	5,9	0	0,0
Restaurante 3	35	30	85,7	4	11,4	0	0,0	1	2,9
Restaurante 4	23	16	69,6	5	21,7	1	4,3	1	4,3
Restaurante 5	36	27	75,0	4	11,1	2	5,6	3	8,3
Total	124	100	80,6	15	12,1	4	3,2	5	4,0

A predominância de *B. cereus*, entre bactérias que apresentam reações semelhantes em meio de ágar MYP, evidencia a ubiquidade desta espécie deterioradora e patogênica em plantas de processamento de alimentos (Beattie & Williams, 2002; Kramer & Gilbert, 1989). A segunda bactéria mais comum, *B. mycoides*, ainda que seja geralmente isenta de suspeitas como agente de doenças de origem alimentar, é uma bactéria associada a processos de deterioração de alimentos (Manzano et al., 2003). No caso de *B. thuringiensis*, tanto suas propriedades de agente deteriorador quanto sua eventual capacidade de produzir enterotoxinas (Hansen & Hendriksen, 2001; Rivera et al., 2000; Prub et al., 1999) merecem ser levadas em consideração.

O Quadro 4.4 reúne dados relativos às porcentagens de pontos do ambiente contaminados por *B. cereus*, nos diversos restaurantes, a cada coleta de amostras de ar.

Quadro 4.4. – Contaminação do ar por *Bacillus cereus*, em cinco restaurantes da cidade de Viçosa, MG.

Coletas	Restaurante				
	1*	2*	3*	4*	5**
	% contaminação				
Primeira	0	20	80	80	75
Segunda	80	100	100	20	100
Terceira	80	80	100	80	100
Média	53	67	93	60	92

* Cinco pontos examinados a cada coleta

** Quatro pontos examinados a cada coleta

O microrganismo foi detectado em todos os restaurantes e em todos os pontos ambientais. Como se pode observar, apenas em uma situação, relativa à primeira coleta feita no restaurante 1, os cinco pontos ambientais examinados apresentaram-se isentos de contaminação pelo microrganismo. Em outros casos, pelo menos um dos pontos apresentava-se contaminado. Considerando-se o total de 72 amostras de ar examinadas (cinco pontos de quatro restaurantes, repetidos em três coletas, e quatro pontos de um restaurante, igualmente repetidos em três coletas), em 52 (72%) dessas amostras detectou-se a presença de *B. cereus*. Tais resultados denunciam a freqüência da presença deste patógeno em ambientes de UAN e corroboram observações como as de Azeredo et al. (2001), que isolaram o microrganismo de todas as amostras de ar coletadas em doze pontos ambientais de um restaurante institucional e dezoito pontos de uma unidade de alimentação hospitalar, na cidade de Campinas, SP.

A expressão da contaminação do ar, como UFC de *B. cereus* encontradas em volumes de 1.000 L (1 m³) de ar nos diversos restaurantes, pode ser observada nos Quadros 4.5 e 4.6.

Os resultados exibidos no Quadro 4.5 revelam a contaminação dos ambientes como um todo, em forma de médias de todos os pontos ambientais analisados em cada unidade, a cada coleta, e das variações observadas entre esses pontos, nos diversos restaurantes.

Quadro 4.5. - Contagens de *B. cereus* no ar, segundo três coletas realizadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Coletas	UFC/m ³ de ar									
	Restaurantes									
	1		2		3		4		5	
	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação
Primeira	0,0	0 - 0	0,4	0 - 2	5,6	0 - 8	7,2	0 - 20	22,0	0 - 50
Segunda	2,4	0 - 4	6,8	2 - 10	7,6	2 - 18	0,4	0 - 2	6,5	2 - 8
Terceira	2,4	0 - 4	2,4	0 - 4	10,8	6 - 14	6,8	0 - 16	8,0	4 - 18
Médias²	1,6	—	3,2	—	8,0	—	4,8	—	12,2	—

⁽¹⁾ Médias dos pontos do ambiente (cinco pontos nos restaurantes 1 a 4 e quatro pontos no restaurante 5)

⁽²⁾ Médias de três coletas, em duplicatas

As contagens de *B. cereus* apresentaram variabilidade expressiva entre coletas: por exemplo, no caso do restaurante 5, a primeira coleta foi equivalente ao triplo do valor encontrado nas demais coletas, enquanto no restaurante 3 a terceira coleta representou praticamente o dobro da contagem da primeira. Constatou-se, também, grande variação entre as contagens relativas aos diferentes pontos, em uma mesma coleta, fato bem evidente nos restaurantes 4 e 5, nos quais as contagens situaram-se na faixa entre 0 e 20 e 0 e 50 UFC/m³, respectivamente (Quadro 4.5). Tais observações dão suporte à hipótese de que, de forma geral, essas unidades carecem de investimentos em procedimentos de higienização, padronizados e efetivos.

O Quadro 4.6 permite visualizar a contaminação dos diversos pontos ambientais analisados, em cada restaurante, de maneira a se avaliar a incidência de *B. cereus* no ar, nas diferentes áreas de trabalho, em cada restaurante. Aqui, as variações entre coletas são evidenciadas pelas faixas de contaminação observadas: por exemplo, no restaurante 5, foram detectados níveis de contaminação variando entre 4 e 50 UFC/m³, no ponto A (destinado a operações de pré-preparo de vegetais), e entre 6 e 30 UFC/m³, contagens relativas ao ponto D (local onde alimentos prontos ficavam à espera, para distribuição).

Vários estudos têm mostrado significativa ocorrência de microrganismos mesófilos no ar, em ambientes de processamentos de alimento. Salustiano (2002) encontrou contagens médias acima de 90 UFC/m³ de ar em todos os ambientes analisados em indústria de laticínios. Segundo Andrade et al. (2003), apenas 18,5% dos ambientes avaliados em UAN, localizadas nas regiões da Zona da Mata e Metalúrgica de Minas Gerais, encontravam-se em condições que poderiam ser consideradas aceitáveis, segundo recomendações da APHA. Em estudo realizado na Espanha, Reguera et al. (1995) chamaram a atenção para a necessidade de melhorar práticas de higiene em 14 serviços de alimentação, após analisarem 388 amostras de ar com contagens médias de bactérias mesófilas aeróbias de 339 UFC/m³ de ar, nível muito maior do que o observado nesta pesquisa, porém que incluía diversas espécies bacterianas (no presente trabalho, relatamos a detecção de um patógeno em particular, impedindo o crescimento de outros microrganismos pelo uso de um meio seletivo).

Quadro 4.6. - Contagens de *Bacillus cereus* no ar, em diversos pontos dos ambientes, em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Pontos do ambiente	UFC/m ³ de ar									
	Restaurantes									
	1		2		3		4		5	
	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação
A	2,7	0 - 4	2,0	0 - 4	5,3	0 - 12	5,3	0 - 16	20,7	4 - 50
B	1,3	0 - 4	3,3	0 - 10	10,0	8 - 12	9,3	0 - 20	8,7	0 - 18
C	0,7	0 - 2	3,3	0 - 8	12,7	6 - 18	2,7	0 - 6	4,7	2 - 8
D	2,0	0 - 4	4,0	0 - 8	6,7	2 - 10	4,0	0 - 6	14,7	6 - 30
E	1,3	0 - 2	3,3	2 - 6	5,3	4 - 6	2,7	0 - 4	—	—
Médias²	1,6	—	3,2	—	8,0	—	4,8	—	12,2	—

⁽¹⁾ Médias de três coletas, em duplicatas

⁽²⁾ Médias dos pontos do ambiente (cinco pontos nos restaurantes 1 a 4 e quatro pontos no restaurante 5)

Com relação à presença de *B. cereus* em unidades processadoras de alimentos, Ueda et al. (1992) verificaram, em estudo feito no Japão, que 55% das bactérias encontradas no ar em plantas de beneficiamentos de arroz foram identificadas como *B. cereus*, evidenciando a prevalência do microrganismo nesse tipo de ambiente. Azeredo et al. (2001) relataram níveis de contaminação máximos de 38 UFC/m³ de ar, em restaurante universitário, apontando as áreas de cocção e distribuição como os pontos mais contaminados, entre os ambientes examinados. Os mesmos autores encontraram contaminações de até 20 UFC/m³ em ambiente de cozinha hospitalar.

No caso deste trabalho, não se descarta a possibilidade de a contaminação real ter sido subestimada, em razão do uso de um meio de cultivo contendo agente seletivo (polimixina-B) e do estado de estresse dos microrganismos sob a forma de aerossóis. Segundo SVEUM et al. (1992), essa associação pode dificultar a recuperação e o crescimento de microrganismos.

No levantamento realizado, todas as amostras de ar revelaram contaminações inferiores aos padrões propostos pela NASA, endossados pela APHA (Sveum et al., 1992), enquadrando-se nos limites definidos para a Classe 100.000. Segundo Andrade et al. (2003), referindo-se a essa recomendação, os serviços de alimentação, em função das exigências de qualidade microbiológica dos ambientes, podem ser enquadrados nessa classificação. A partir deste raciocínio, seriam considerados em condições higiênicas satisfatórias, adequadas ao processamento de alimentos, aqueles ambientes que apresentarem contagens de microrganismos mesófilos aeróbios de até 88,4 UFC/m³ de ar. Entretanto, a ausência de recomendações específicas para níveis de *B. cereus* no ar dificulta a avaliação dos resultados obtidos. As recomendações da NASA referem-se a padrões para mesófilos aeróbios. Adotar esses limites em relação a *B. cereus* é uma decisão que reflete bastante tolerância, já que se trata de um patógeno reconhecido, de difícil controle e excepcional capacidade de multiplicação em diversos substratos (Granum & Lund, 1997). Além do mais, quando se consideram os limites para mesófilos aeróbios, supõe-se a existência de um *pool* de microrganismos, enquanto, no caso desta pesquisa, a busca restringiu-se a um microrganismo em particular, daí se supor que os limites propostos devam ser mais seguros.

Para subsidiar a decisão de não recomendar os limites propostos pela APHA, certas considerações merecem ser destacadas. Primeiro, deve-se lembrar do potencial de crescimento do patógeno, com capacidade de se multiplicar expressivamente, mesmo a temperaturas relativamente baixas, entre 15 e 22°C, em substratos alimentares (Souza, 2003; Azeredo et al., 2002). Frequentemente se expõem alimentos a essas temperaturas, em ambientes de restaurantes, por tempos suficientes para permitir o crescimento de várias gerações. Além disso, salienta-se o fato de que a bactéria pode causar intoxicações – especialmente diarreicas – a partir de alimentos contaminados com populações baixas - a partir de 10^3 bactérias por grama de alimento - segundo Andersson et al. (1995). Andersson e colaboradores (1998) também mencionaram características de virulência em algumas cepas de *B. cereus*, envolvendo mecanismos de aderência a células epiteliais e provocando síndromes graves e persistentes a partir de doses infectantes excepcionalmente baixas, por volta de 200 UFC/g de alimento. Uma vez que se registram tempos de geração do patógeno muito curtos (em torno de 30 min, a temperaturas entre 30 e 37°C, segundo Souza, 2003 e Azeredo et al., 2002), os riscos de intoxicação são expressivos após poucas horas de exposição de um alimento com população inicial em torno de, por hipótese, 10 UFC/g.

É certo que existem recomendações ainda menos exigentes que as da APHA, descritas na literatura. A União Européia, estabeleceu, em seu Guia para Manufatura de Produtos Estéreis, área de medicina, quatro níveis decrescentes de exigências de qualidade higiênica. O nível D, sendo o mais tolerante, poderia ser aplicado a ambientes de UAN, para o qual é proposto o limite de até 200 UFC de microrganismos por m^3 de ar, sem especificar sua natureza ou grau de virulência (Pasquarella et al., 2000). Seguindo o mesmo raciocínio supra citado, o limite não se aplica a um patógeno com as características de *B. cereus*.

A contaminação do ar como agente de transmissão de patógenos para alimentos e superfícies de trabalho é uma questão cuja importância é sentida e compartilhada por indústrias de alimentos, restaurantes e cozinhas domésticas. A exposição de alimentos a patógenos provenientes do ar pode acontecer tanto por contato indireto, por meio de superfícies de utensílios, equipamentos e bancadas contaminados por aerossóis, quanto por contato direto, por meio de partículas em

suspensão (Lindsay & Von Holy, 1999, apud Kusumaningrum et al., 2003). É importante lembrar que ar e ambiente “trocam” seus contaminantes, uma vez que quaisquer superfícies nas quais os microrganismos estejam depositados podem agir como fontes de contaminação para o ar, quando ocorrerem condições apropriadas para a formação de aerossóis (Heldman, 1967, apud Salustiano, 2002).

4.1.2. – Contagens de *Bacillus cereus* em superfície de bancadas

Semelhantemente ao que ocorreu com relação às cepas isoladas do meio MYP a partir do ar, a grande maioria dos isolados das bancadas foi identificada como *B. cereus* (91,20% do total de isolados, chegando a 97,62% no restaurante 1), ocorrendo, também, a identificação de *B. mycooides* e *B. thuringiensis* e de cepas atípicas, presumivelmente membros do grupo, em função das reações observadas no meio seletivo usado (Quadro 4.7).

Quadro 4.7. - Identificação de 125 cepas típicas em meio de ágar MYP, obtidas de superfície de bancadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Local	Total de isolados	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus mycooides</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>		Outros	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Restaurante 1	42	41	97,62	0	0	0	0	1	2,38
Restaurante 2	31	29	93,55	0	0	1	3,23	1	3,23
Restaurante 3	23	18	78,26	1	4,35	2	8,70	2	8,70
Restaurante 4	15	13	86,67	0	0	0	0	2	13,33
Restaurante 5	14	13	92,86	0	0	0	0	1	7,14
Total	125	114	91,20	1	0,80	3	2,40	7	5,60

Vale mencionar que em algumas amostras de bancadas a contaminação das placas era tão grande que a identificação e o isolamento de colônias típicas de *B. cereus* ficaram altamente prejudicados. Colônias resistentes à polimixina-B, algumas capazes de utilizar manitol – corando o meio de amarelo – tornaram o

isolamento das colônias manitol-negativas bastante difícil. Por isso, foi necessário, nesses casos, reisolar os microrganismos, por meio de procedimentos de estriagens consecutivas em meio MYP, até obter colônias puras. Foi mais uma evidência da grande necessidade de treinamento da mão-de-obra para ações de higiene.

Deve-se ressaltar, também, a dificuldade em definir com exatidão as áreas de trabalho e o estabelecimento de equivalência funcional, entre os pontos ambientais analisados, nos diversos restaurantes. Por exemplo, nos restaurantes 2, 3 e 5, os pontos onde foram coletadas as amostras ocupavam um único recinto, onde eram realizadas as operações de higienização, pré-preparo, cocção e distribuição. Nos restaurantes 1 e 4 essas operações eram realizadas em recintos separados, facilitando a separação de áreas e de atividades. Além disso, era comum observar que a função definida para uma bancada era compartilhada por outras operações: é o caso de situações em que uma bancada destinada ao pré-preparo de vegetais servia para apoio às atividades de cocção ou, mesmo, para montagem de pratos destinados à distribuição.

No Quadro 4.8 estão expressas as porcentagens de bancadas contaminadas por *B. cereus*, nas diferentes coletas. O microrganismo foi detectado em bancadas de todos os restaurantes nos quais o estudo se desenvolveu. Entre 72 amostras de bancadas analisadas, o microrganismo foi detectado em 38 (53%).

Quadro 4.8. – Contaminação de superfícies de bancadas por *Bacillus cereus*, em cinco restaurantes da cidade de Viçosa, MG.

Coletas	Restaurante				
	1*	2*	3*	4*	5**
	% contaminação				
Primeira	80	60	60	60	75
Segunda	20	40	40	40	25
Terceira	80	80	60	20	50
Média	60	60	53	40	50

* Cinco pontos examinados a cada coleta

** Quatro pontos examinados a cada coleta

Os resultados observados confirmam, mais uma vez, a presença comum de *B. cereus* em ambientes de cozinhas, em superfícies a partir das quais podem se transferir para os alimentos. Considerando as observações anteriores, relativas ao compartilhamento de áreas para executar várias tarefas, ficam evidentes os altos riscos de contaminação cruzada, com destaque para sua ocorrência em alimentos prontos para o consumo.

Resultados encontrados por Mosso et al. (1996) demonstraram a presença comum do microrganismo em várias superfícies examinadas em amostras recolhidas de 12 cozinhas institucionais, na Itália, com o objetivo de avaliar a contaminação ambiental por *B. cereus*, fato que os autores apontaram como capaz de propiciar inúmeras possibilidades de contaminação de alimentos. Mendes et al. (2004) encontraram *B. cereus* em 27% do total de amostras de bancadas analisadas em restaurante institucional no Estado de Minas Gerais.

Cesare et al. (2003) identificaram a contaminação cruzada entre alimentos crus e alimentos cozidos, via superfície de contato e manipuladores, como um significativo fator de risco de intoxicações alimentares. Ryan et al. (1996) relataram que, de 101 surtos de doenças de origem alimentar ocorridos na Inglaterra e no País de Gales, entre 1992 e 1994, 28 tiveram como causa a contaminação cruzada. A propósito de *B. cereus*, Carlin et al. (2000) demonstraram que é um dos principais microrganismos contaminantes de vegetais. É de se supor, portanto, que os próprios alimentos constituam uma fonte de contaminação para as superfícies de bancadas e, daí, para outros alimentos, alguns dos quais representando um excelente substrato de crescimento, como pratos à base de carnes e preparações com leite.

Os Quadros apresentados a seguir contêm informações relativas aos níveis de contaminação por *B. cereus* nas bancadas, apresentadas sob o ponto de vista de variações entre coletas (Quadro 4.9) e variações entre pontos do ambiente (Quadro 4.10).

Quadro 4.9. - Contagens de *B. cereus* em superfícies de bancadas, segundo três coletas realizadas em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Coletas	UFC/250 cm ² de bancadas									
	Restaurantes									
	1		2		3		4		5	
	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação
Primeira	6,0x10²	0 - 1.000	2,2x10²	0 - 1.000	1,9x10²	0 - 700	4,0x10	0 - 100	1,4x10²	0 - 400
Segunda	10	0 - 50	6,0x10	0 - 250	7,0x10	0 - 250	4,0x10²	0 - 1.000	5,0x10²	0 - 2.000
Terceira	4,0x10³	0 - 18.500	1,4x10⁴	0 - 63.500	1,2x10²	0 - 333	10	0 - 50	2,5x10	0 - 50
Médias²	1,6x10³	—	4,8x10³	—	1,3x10²	—	1,5x10²	—	2,2x10²	—

⁽¹⁾ Médias dos pontos do ambiente (cinco pontos nos restaurantes 1 a 4 e quatro pontos no restaurante 5)

⁽²⁾ Médias de três coletas, em duplicatas

Quadro 4.10. - Contagens de *Bacillus cereus* em superfícies de bancadas, em diversos pontos dos ambientes, em cinco restaurantes na cidade de Viçosa, MG

Pontos do ambiente	UFC/250 cm ² de bancadas									
	Restaurantes									
	1		2		3		4		5	
	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação	Média ¹	Variação
A	1,7x10	0 - 50	3,3x10²	0 - 1.000	0,0	0 - 0	3,5x10²	0 - 1.000	1,3x10²	0 - 400
B	6,5x10³	0 - 18.500	3,3x10	0 - 50	3,3x10	0 - 100	0,0	0 - 0	0,0	0 - 0
C	5,7x10²	50 - 1.150	2,1x10⁴	0 - 63.500	8,3x10	0 - 200	3,5x10²	0 - 1.000	7,0x10²	50 - 2.000
D	5,0x10²	0 - 1.000	1,2x10³	0 - 3.500	1,7x10²	50 - 200	1,7 x10	0 - 50	5,0x10	0 - 100
E	1,7x10²	0 - 500	1,1 x10³	0 - 3.000	3,4x10²	0 - 700	3,3 x10	0 - 100	—	—
Médias²	1,6x10³	—	4,8x10³	—	1,3x10²	—	1,5x10²	—	2,2x10²	—

⁽¹⁾ Médias de três coletas, em duplicatas

⁽²⁾ Médias dos pontos do ambiente (cinco pontos nos restaurantes 1 a 4 e quatro pontos no restaurante 5)

A pesquisa de *B. cereus* em superfícies de bancadas, nos cinco restaurantes, também revelou grande variabilidade, tanto entre coletas quanto entre pontos examinados. Pode-se observar, em especial na terceira coleta, variações entre os pontos ambientais que vão desde a não detecção até níveis da ordem de 10^4 UFC/250 cm², nos restaurantes 1 e 2 (Quadro 4.9). Essa variabilidade confirma a hipótese de que os procedimentos de higienização não sejam padronizados e uniformes.

No Quadro 4.9 são evidenciadas contagens médias superiores ao limite de 500 UFC/250 cm² (segundo recomendação do *United States Public Health Service*, de acordo com Sveum et al., 1992) nos restaurantes 1 e 2, ainda que as faixas de variação permitam observar que esses níveis foram observados em todas as unidades estudadas, em determinadas coletas. Entretanto, cabe considerar que esses limites propostos para microrganismos mesófilos aeróbios não refletem a segurança requerida quando se trata de um patógeno como *B. cereus*.

O exame comparativo dos Quadros 4.5 e 4.9 permite observar que as contagens em amostras de ar e em superfícies de bancadas não obedecem a um padrão de correlação, de maneira que não se pode afirmar que o ar seja uma fonte de contaminação para as bancadas ou vice-versa.

O Quadro 4.10 permite observar as variações entre pontos do ambiente de cada restaurante. Considerando o total de pontos onde foram feitas as coletas (24, relativos às diversas unidades) em três pontos não se observou a presença do microrganismo em nenhuma das três coletas. Nos demais casos, em pelo menos uma das coletas os pontos foram encontrados contaminados.

Os resultados apresentados, tomados como médias de três coletas, vários pontos dos restaurantes 1 e 2 e um ponto do restaurante 5 foram encontrados com níveis de contaminação acima de 500 UFC/250cm². Contudo, como mencionado anteriormente, esse limite refere-se ao número de microrganismos aeróbios mesófilos de forma geral, o que leva ao questionamento acerca de sua adequação relativa a níveis de contaminação por um microrganismo em particular, no caso, *B. cereus*. Ressente-se, portanto, da falta de recomendação específica para esse patógeno, lembrando, sempre, de sua freqüência nos ambientes em geral e de seu grande potencial de crescimento em alimentos.

No caso do restaurante 1, a média de contaminação do ponto do ambiente onde eram preparados lanches reveste-se de uma importância especial, já que alimentos prontos para o consumo estariam sendo preparados em locais contaminados por *B. cereus* em níveis considerados inadequados. No ponto C, onde se concentram as atividades de cocção dos alimentos, foram observados níveis de contaminação superiores ao limite proposto pela APHA, de 500 UFC/250cm², nos restaurantes 1, 2, 4 e 5. Uma vez que esse limite não pode ser considerado seguro para níveis de *B. cereus*, tais resultados apontam para a necessidade de medidas corretivas.

Um estudo desenvolvido em restaurante universitário de Minas Gerais revelou que as bancadas do setor de pré-preparo de frutas e hortaliças eram os locais de maior risco, como fonte de contaminação (Nascimento, 1992), constatação coerente com níveis de ocorrência e com a alta frequência de *B. cereus* em alimentos de origem vegetal (Azeredo, 1998). Mendes et al. (2004) também encontraram níveis máximos de *B. cereus* em bancada de pré-preparo de vegetais ($1,5 \times 10^3$ UFC/250cm²). No presente trabalho, entretanto, a contaminação mais alta se registrou no setor de cocção do restaurante 2, equivalente a $6,4 \times 10^4$ UFC/250cm². No caso das contaminações encontradas nos locais destinados a operações de cocção, a ocorrência do microrganismo nos níveis registrados pode ser considerada um fator de alerta, já que alimentos prontos eram freqüentemente acondicionados nesses locais e aí permaneciam à espera do momento da distribuição.

Outro fato a ser destacado refere-se ao tipo de distribuição adotado pelos restaurantes. Algumas das unidades estudadas serviam as refeições pelo sistema “*self-service*”, de forma que as preparações prontas, eventualmente contaminadas, passavam por longos períodos de espera, antes de serem consumidas, sob temperaturas que, segundo Collins (1997), estão situadas na faixa que permite multiplicação do patógeno.

Com relação ao acabamento das bancadas, vale considerar que as características dos materiais utilizados na superfície de bancadas pode influir na capacidade de adesão de *B. cereus* (Peng et al., 2001). No Brasil, a Portaria nº 368 do MAA contra-indica o uso de madeira e outros materiais que não se possam limpar e desinfetar adequadamente (BRASIL, 1997). No caso dos

restaurantes estudados, as bancadas eram de materiais diversos, não se observando uso de madeira: restaurante 1, aço inoxidável; restaurantes 2 e 3, mármore branco; restaurantes 4 e 5, granito. As bancadas de mármore estavam visivelmente ásperas, evidenciando que este material apresenta características de desgaste que tornam difícil a correta higienização das superfícies.

O aço inoxidável é o material preferencialmente escolhido para superfícies de trabalho em ambientes de processamento de alimentos, desde há décadas passadas, devido a diversas propriedades, como força mecânica, resistência à corrosão, durabilidade e facilidade de fabricação (Holah & Thorpe, apud Kusumaningrum et al., 2003). Vários estudos ainda têm prosseguido, para avaliar a adesão de bactérias a esse material. De acordo com Peng et al. (2001), esporos de *B. cereus* aderem mais facilmente a superfícies de aço inoxidável do que células vegetativas. Jullien et al. (2002) chegaram a relatar até perto de 1.000 esporos de *B. cereus* por cm², aderidos a aço inoxidável, após completo procedimento de limpeza em equipamentos de laticínios. O controle da bactéria é, portanto, um desafio para administradores de UAN, que precisam dirigir esforços em dois sentidos: o de aperfeiçoar seus procedimentos de limpeza, pelo uso de processos e produtos eficientes em frequência conveniente e, de maneira muito especial, no sentido de monitorar condições de estocagem de alimentos prontos, para evitar perigos associados ao crescimento do patógeno nas preparações.

4.1.3. – Teste de Hidrólise de Amido

A Figura 4.2 reproduz os resultados da prova bioquímica de hidrólise de amido a que foram submetidos os 214 isolados identificados como espécimes de *B. cereus*, obtidos do ar e de superfície de bancada nos cinco restaurantes avaliados. Como descrito na metodologia, foram considerados amilase negativos ou fracamente amilolíticos todos os isolados que exibiam o halo de hidrólise restrito aos limites das colônias, em contraposição àqueles que produziam hidrólise intensa, evidenciada por zona de transparência sob e ao redor das colônias.

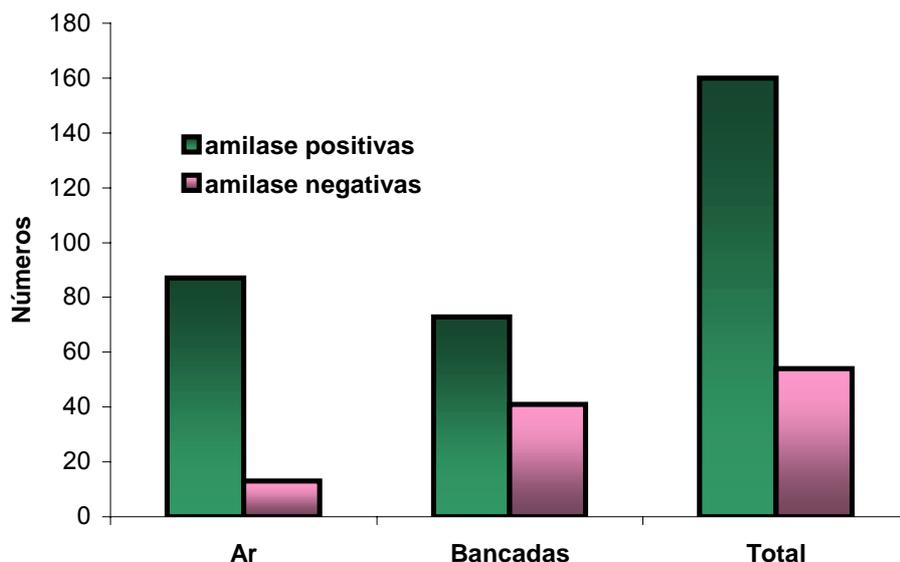


Figura 4.2. – Capacidade amilolítica de cepas de *Bacillus cereus* isoladas de amostras de ar e de superfícies de bancadas, em cinco restaurantes de Viçosa, MG.

Dos 214 isolados, 54 foram tidos como não-amilolíticos ou com reação de hidrólise fraca, o que equivale a, aproximadamente, 25% do total. Dos 100 microrganismos isolados do ar, 13% eram fracamente amilolíticos, enquanto, entre as 114 amostras de microrganismos provenientes de superfícies de bancadas, aproximadamente 36% foram observados com reações fracas de hidrólise. Foi constatada, pois, a grande predominância de cepas amilolíticas.

Essa predominância de cepas capazes de hidrolisar intensamente o amido é compatível com resultados de diversos autores. Azeredo (1998) encontrou apenas 2% de cepas fracamente amilolíticas entre microrganismos isolados de arroz cru. Resultados semelhantes ao da presente pesquisa foram relatados por Jinbo & Kokubo (1982), que encontraram 18% entre amostras de carnes e peixes, e Shinagawa et al. (1979), que identificaram 17% de cepas negativas para hidrólise de amido, a partir de isolados de arroz. Com relação a *B. cereus* provenientes de fontes ambientais, um estudo realizado por Ueda et al. (1992), no Japão, demonstrou que 93% das cepas isoladas de plantas de beneficiamento de arroz exibiam habilidade de hidrolisar fortemente amido.

A associação da característica de não hidrolisar amido - ou fazê-lo fracamente - à produção de toxina emética tem sido constatada por diversos autores. Dados compilados por Pirttijärvi et al. (2000) revelaram que onze cepas de *B. cereus* isoladas de acidentes eméticos eram todas amilase-negativas, enquanto apenas quatro, entre outras onze cepas não-eméticas, foram assim caracterizadas. Em contraposição, Ombui et al. (1997) constataram a capacidade amilolítica em 96% de cepas diarréicas pesquisadas. A associação foi confirmada por Nishikawa et al. (1996), em 38 isolados de surtos eméticos. Esses autores citaram, ainda, resultados obtidos por Yasukawa et al. (1981), que submeteram ao teste de amido 40 amostras de microrganismos isoladas de surtos eméticos e relataram 100% de resultados negativos para hidrólise de amido, enquanto apenas 25,9% dos isolados de alimentos em geral exibiram a mesma característica. O teste de amido tem sido recomendado há mais de dez anos, como forma de selecionar cepas eméticas de *B. cereus* (Shinagawa, 1993).

Os resultados do presente estudo sugerem que uma significativa parte dos isolados de *B. cereus*, principalmente os provenientes de superfícies de bancadas, são cepas possivelmente capazes de produzir toxina emética, isto é, são suspeitos de um potencial toxigênico cujo impacto em nosso meio é desconhecido.

Esta constatação, junto com o conjunto de resultados ora apresentados, dão suporte à recomendação de investir em treinamento de mão-de-obra para aperfeiçoar procedimentos que levem ao controle do patógeno e, ainda, de insistir em estudos que permitam propor limites seguros para sua incidência em ambientes de indústrias e serviços do setor de alimentação.

5. – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- Como resultado das coletas feitas em amostras de ar e de superfícies de bancadas em cinco Unidades de Alimentação e Nutrição na cidade de Viçosa, MG, 249 (duzentos e quarenta e nove) microrganismos foram isolados, a partir de colônias típicas em meio de ágar MYP. Destes, 214 (duzentos e quatorze) foram identificados como *Bacillus cereus*, correspondendo a 86% do total. Dezesseis isolados (6%) foram caracterizados como *Bacillus mycoides*, sete (3%) como *Bacillus thuringiensis* e doze (5%) não foram identificados, podendo representar cepas atípicas do grupo de *B. cereus*.
- O microrganismo foi detectado em amostras de ar e de superfícies de bancadas, em todos os restaurantes nos quais o estudo se desenvolveu, evidenciando o potencial dessas fontes para a contaminação de alimentos, utensílios e equipamentos usados no preparo e distribuição de refeições.
- Os níveis de contaminação por *B. cereus* encontrados em superfícies de bancadas (até $6,35 \times 10^4$ UFC/250 cm²) e em amostras de ar (até 50 UFC/m³) sugerem a necessidade de medidas para seu controle, tanto pelas propriedades de resistência e rápida multiplicação do microrganismo em substratos alimentares quanto por seu potencial patogênico. A identificação de 25% de cepas não-amilolíticas, característica bioquímica que as relaciona a exemplares toxigênicos, dá suporte a essa sugestão.
- A grande variabilidade entre as contagens de *B. cereus* a partir de amostras do ar e de bancadas evidenciam a falta de padronização e uniformidade em procedimentos de limpeza e sanitização.

- Considerando a falta de recomendações específicas para contaminação do ar e de superfícies por *B. cereus*, sugerem-se os seguintes limites: 10 UFC/m³ de ar e 100 UFC/250 cm² de bancadas, com base no fato de que são níveis supostamente seguros, relatados em outros trabalhos, associados a ambientes de UAN. Tais limites deverão ser, oportunamente, avaliados em sua viabilidade e adequação.
- Considerando que a real dimensão dos problemas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por *B. cereus* não seja convenientemente avaliada e, também, que sua presença pode denunciar condições de higiene carentes de melhorias, os resultados observados sugerem que medidas de controle da contaminação e do crescimento desse e de outros patógenos devem ser priorizadas, em Unidades de Alimentação e Nutrição. Assim, procedimentos simples de higiene, como cobrir os alimentos e mantê-los sob temperaturas que inibam o crescimento microbiano, devem ser adotados rotineiramente, como forma de prevenir ou reduzir a ocorrência de doenças de origem alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERC - Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. **Manual ABERC de Práticas de Elaboração e Serviço de Refeições para Coletividades**, 2 ed., 109p, 1995.

ABERC: História, objetivos e Mercado. Disponível em: <http://www.aberc.com.br> Acesso em 04 fev. 2004.

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

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

ALMEIDA, C.R. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, p. 12-20, Jan./Fev., 1998.

ALMEIDA, R.C.C et al. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v.29, n.4, ago.,1995.

ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 76, p.471-484, 1958.

ANDERSSON, A.; GRANUM, P.E; RÖNNER, U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be additional virulence mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 93-99, 1998.

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

ANDRADE, N.J.; MOREIRA, R.M.; SILVA, K.C. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência Agrotecnologia, Lavras**, v.27, n.3, p.590-596, mai/jun., 2003. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/revista/27_3/art14.pdf. Acesso em: 06/02/2004.

ANGELILLO, I.F.; FORESTA, M.R.; SCOZZAFAVA, C.; PAVIA, M. Consumers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. **Internacional Journal of Food Microbiology**, n. 64, p. 161-166, 2001.

ANKLAM, E.; BATTAGLIA, R. Food analysis and consumer protection. Trends in Food Science & Technology, v. 12, n. 5/6, p. 197-202, May/June, 2001

ARRIBAS, M. L. G.; PLAZA, C. J.; DE LA ROSA, M. C.; MOSSO, M. A. Characterization of *B. cereus* strains isolated from drugs and evaluation of their toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 64, p. 257-264, 1988.

AVENS, J.S.; PODUSKA, P.J.; SCHMIDT, F.P.; JANSEN, G.R.; HARPER, J.M. Food safety hazard associated with school food service delivery system. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p. 453, 1978.

AYÇIÇEK, H.; SARIMEHMETOGLU, B.; ÇAKIROGLU, S. Assessment of the microbiological quality of meals samples at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. **Food Control**, p. 1-6, 2003.

AZEREDO, R.M.C.; COELHO, A.I.M.; SOARES, M.P.; FERNANDES, G.R. Avaliação dos níveis de conhecimento e percepção de riscos de doenças de origem alimentar: um estudo envolvendo manipuladores e usuários, em unidade de alimentação e nutrição institucional. **Revista Higiene Alimentar**, n.17; p.17-18, jan/fev-2003.

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, Universidade Estadual de Campinas, 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 de Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p. 111-14, set., 2002.

AZEREDO, R.M.C.; SERRANO, A.M. Cereulídeo – A toxina emética de *Bacillus cereus*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.1, p. 22-26, jan.-jun. 1999.

AZEREDO, R.M.C; SOARES, C.M.; KUAYE, A.Y.; LEITÃO, M.F.F. Detecção e avaliação da incidência de *Bacillus cereus* em amostras de ar, coletadas em Unidades de Alimentação e Nutrição. **Revista de Higiene Alimentar**, v.15, n.80-81, p. 143-144, 2001.

BEATTIE, S.H.; WILLIAMS, A.G. Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* in vitro in controlled fermentations and *in situ* in food products and a model food system. **Food Microbiology**, v. 19, p. 329-340, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento. Portaria n.º368, de 04 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n.º101, de 11 de setembro de 1993a. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.º-156, 17 ago. 1993. Seção 1. Pag.11947 – 11948.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1428, de 26 de novembro de 1993b. Aprova Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, estabelecimentos de padrões de identidade e qualidade na área de alimentos e serviços e regulamento técnico de Boas Práticas de Produção e Prestação de Serviços na área de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 dez. 1993.

BREWER, M.S.; SPROULS, G.K.; RUSSON, C. Consumer attitudes toward safety issues. **Journal of Food Safety**, v.14; p.63-76, 1994.

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

BRYAN, F.L.; BARTLESON, C.A. Mexican-style foodservice operations: hazard analyses, critical control points and monitoring. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 48, n.6, p. 509-524, jun. 1985.

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

CAMPOS, M.R.H.; ALEXANDRE, V.P.; BARNABÉ, D.N.; BORGES,R.M.; CORRÊA,M.H.S.; HONÓRIO, R.F.; MOREIRA, P.C.; CUNHA, I.C.; SANTANA, G.S.; Avaliação do Controle de Pontos Críticos Através do Perfil Microbiológico das Refeições Oferecidas aos Participantes da VII, VIII e IX Caminhada Ecológica/Goiânia – Aruanã, **Revista de Higiene Alimentar**, v.15, n.80/81 jan/fev2001.

CARDOSO, A.L.M.P. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado.** 2000. 95 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARLIN, F.; GIRARDIN, H.; PECK, M.W.; STRINGER, S.C.; BARKER, G.C.; MARTINEZ, A.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, P. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteris in cooked chilled foods vegetables: a FAIR collaborative project. **Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 117-135, 2000.

CASWELL, J. Economics of food safety. 2. Ed. New York : **Elsevier Science**, 1991. 356p.

CAVALLI, S.B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**, v.14;p.41-46, 2001.

CEL - Centro de Excelência em Laticínios. APPCC, 2002. Disponível em: <www.cel.org.br/appcc.asp> Acesso em 20/07/2003.

CESARE, A.; SHELDON B.W.; SMITH, K.S.; JAYKUS, L.A. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1587-1594, 2003.

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.

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, 1997.

CONAMA — Conselho Nacional Meio Ambiente. Resolução nº 3 de 18 jun 1990. Padrões de qualidade do ar. **Diário Oficial da União**, n. 22, ago 1990.

DOYLE, M. P. Reducing Foodborne Disease: What are the priorities? **Nutrition**, v. 16, n.7/8, 2000.

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

EVANS, J.A.; RUSSEL, S.L.; JAMES C; CORRY, J.E.L. Microbial contamination of food refrigeration equipment. **Journal of Food Engineering**, v.62, p. 225-232, 2004.

FEIN, S.B.; LIN, J.T.; LEVY, A.S. Foodborne illness: perceptions, experience, and preventive behaviors in the United States. **Journal of Food Protection**, n.58; p.1405-1411, 1995.

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

FREWER, L.J.; SHEPHERD, R.; SPARKS, P. The interrelationship between perceived knowledge, control and risk associated with a range of food-related hazards targeted at the individual, other people and society. **Journal of Food Safety**, Trumbull, n. 14, p.19-40, 1994.

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.

GONTIJO FILHO, P.P.; SILVA, C.R.M.; KRITSKI, A.L. Ambientes climatizados, portaria 3.523 de 28/8/98 do Ministério da Saúde e padrões de qualidade do ar de interiores do Brasil. **Jornal de Pneumologia**, v.26, n. 5, 2000.

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

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

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

GRIFFITH, C.J.; REDMONDE, E.C. Evaluating hygiene behavior in the domestic setting and the impact of hygiene education. **Journal of Infection**, n.43; p. 70-74, 2001.

GRIFFITH, C.; WORSFOLD, D.; MITCHELL, R. Food preparation, risk communication and the consumer. **Food Control**, n.9; p.225-232, 1998.

HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: Strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 185-189, 2001

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

HAZELWOOD, D.; McLEAN, A.D. **Curso de higiene para manipuladores de alimentos**, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, 1991.

JÄÄSKELÄÄINEN, E.L., TEPLOVA, V.; ANDERSSON, M.A.; ANDERSSON, L.C.; TAMMELA, P.; ANDERSSON, M.C.; PIRHONEN, T.I.; SARIS, N.-E.L.; VUORELA, P.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 737-744, 2003.

JENG, H.J.; FANG, T.J. Food safety control system in Taiwan- the example of food service sector. **Food Control**, v.14, p.317-322, 2003.

JINBO, K.; KOKUBO, Y. Biological typing of *Bacillus cereus* isolates and heat tolerance of their spores. **Annual Report of Tokio Metropolitan Research Laboratory of Public Health**, v. 33, p. 161-165, 1982.

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 in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n.1, p. 286-287, jan./feb. 1983.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T., CARPENTIER B; LEBRE, T.V.; FAILLE. C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77-87, 2002.

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

KOTIRANTA, A.; LOUNATMA, A. K.; HAAPASA, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 189-198, 2000.

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P., Ed. **Foodborne Bacterial Pathogens**, p.21-70, 1989.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, India, v.42, p. 9-27, 1998.

KUSUMANINGRUM, H.D.; ROBOLDI, G.; HAZELEGER W.C.; BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p.227-23, 2003.

LUCCA, A.; TORRES, E.A F.S. Condições de higiene de “cachorro-quente” comercializado em via públicas. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3; p.350-2, 2002.

LUND, T.; BUYSER, M.; GRANUM P E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2004.

MAHLER; H. PASI, A.; KRAMER, J.M.; SCHULTE, P.; SCOGING, A.C.; BÄR, W.; KRÄHENBÜHL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 16, p. 1142-1148, 1997.

MALUF, R.S.; MENEZES F.; MARQUEZ S.B. Caderno “Segurança Alimentar”. Disponível em: www.forumsocialmundial.org.br/download/tconferencias_Maluf_Menezes_2000_por_.pdf. Acesso em: 06 jun. 2003.

MANZANO, M.; COLIN L.; CANTON, I C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 249-254, 2003.

MARTHI, B. Food safety challenges in developing countries: the Indian situation. **Food Control**, Kidlington, n. 10, p. 243-245, 1999.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; VERA, A.M. ; MURCIA, M. Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. **Food Control**, Kidlington, n. 11, p. 437-445, 2000.

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

MERCK. Microbial air monitoring- MAS 100 air sampler: technical information. Net. Taiwan, 2001a. Disponível em: <<http://www.merck.com.tw/>>. Acesso em jan/2004.

MOSSO, C.; GUGLIELMINI, N.; LANZETTI, A. Capacità di *B cereus* de crescere e produrre enterotossina ed attività di diversi disinfettante. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.35, n.352, p. 1073-1075, ott. 1996.

NASCIMENTO, D. Análise de Risco e Pontos Críticos de Controle (ARPC) de uma Planta de Processamento de Alimentos (Restaurante Universitário) em Ouro Preto-MG. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 170-185. Jul./dez., 1992.

NISHIKAWA, Y.; KRAMER, J.M.; HANAOKA, M.; YASUKAWA, A. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, n.1-3, p. 149-159, aug. 1996.

OMBUI, J.N.; SCMIEGER, H.; KAGIKO, M.M.; ARIMI, S.M. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.149, n.2, p.245-248, apr. 1997.

PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **Journal of Hospital Infection**, v.46, p.241-256, 2000.

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

PENG, J.S., TSAI, W.-C., CHOU, C.-C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, Taiwan, v.77, p. 11-18, 2002.

PENG, J.S., TSAI, W.-C., CHOU, C.-C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 105-111, 2001.

PIRTTIJÄRVI, T.S.M.; ANDERSSON M.A.; SALKINOJA-SALONEN. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p. 231-239, 2000.

PROENÇA, R.P.C. **Inovação tecnológica na produção de alimentação coletiva**. Florianópolis: 1 ed. Insular. p. 136, 1997.

PRUB, B.M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MARTLBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p 5436-5442, 1999.

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

RAJKOWSKY, K.T.; MYKOLAJCIK, E.M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.50, n.3, p. 199-205, mar.1987.

RÊGO, J.C.; STAMFORD; T.L.M.; PIRES, E.M.F.; SILVA Jr., E.A. Proposta de um programa de boas práticas de manipulação e processamento de alimentos para unidades de alimentação e nutrição. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 22-27, Out., 2001.

REGUERA, U.J.; PEREZ G.R.; TORRE, A.;SANCHEZ C.C.; LLORENTE, C.J.; GONZALEZ, S.Z.; PRATS, P.G.; RODRÍGUEZ, T.A.; DE-LA-TORRE, A.H. Air microbiology in the food preparation rooms of catering establishments. **Alimentaria**, v. 30, n. 246, p.31-34, 1995.

RHODEHAMEL E.F.; HARMON S.M. *Bacillus cereus*. In: FOOD AND DRUG ASSOCIATION (FDA)- **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995, Chap. 14, p. 14.01-14.08.

RIVAS, M.; RODRICKS, J. V. Food hazards of microbial origin. II. Bacterial toxins. **Revista Latino-americana de Microbiologia**, v. 21, p.159– 165, 1979.

RIVERA, A.M.G.; GRANUM, P.E.; PRIEST, F.G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology*, v.190, p. 151-155, 2000.

RODRIGUES, K.R.M.; SALAY, E. Atitudes de granjeiros, atacadistas, varejistas e consumidores em relação à qualidade sanitária do ovo de galinha in natura. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14; p.185-193, set/dez., 2001.

ROPKINS, k.; BECK, A.J. HACCP in the home: a framework for improving awareness of hygiene and safe food handling with respect to chemical risk. **Food Science & Technology**, v.11, p. 105-114, 2000.

RYAN, M.J.; WALL, P.G.; GILBERT, R.J.; GRIFFIN, M.; ROWE, B. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. **Communicable Disease Report**, v. 6, n. 13, p. 179-183, dec., 1996.

SALUSTIANO, V. C. **Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento em uma indústria de laticínios e seu controle por agentes químicos**. 2002. 72 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SALZBERG, S. P.; MASSAGUER, P. R.; SERRANO, A. M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, 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. **Food Microbiology**, Spain, v.19, p. 589-595, 2002.

SCHILLING, M. **Qualidade em nutrição: método de melhorias contínuas ao alcance de indivíduos e coletividades**. São Paulo: 2 ed. Livraria Varela. p. 81, 1998.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**. Geneva – Switzerland, 78: p.3–17, 2002.

SCHULTEN, S.M.; VELD, P.H.; NAGELKERKE, N.J.D.; SOTTER, S.; BUYSER, M.L.; ROLLIER, P.; LAHELLEC, C. Evaluation of the ISSO 7932 standard for enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p. 53-61, 2000.

SHINAGAWA, K. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p. 125-142, 1990.

SHINAGAWA, K.; KUNITA, N.; SASAKI, Y.; OKAMOTO, A. Biochemical characteristics and heat tolerance of strains of *Bacillus cereus* isolated of uncooked and cooked rice after poisoning outbreaks. **Journal of Food Hygiene Society of Japan**, v. 20, p. 431-436, 1979.

SHINAGAWA, K.; MATSUSAKA, N.; KONUMA, H.; KURATA, H. The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in

food-poisoning outbreaks. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 47, n. 4, p. 557-565, 1985.

SHINAGAWA, K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Meppel, v. 47, n. 2, p. 89 – 103, 1993.

SILVA JR., E. A., IARIA, S. T., ANDRADE, C.R., et al. **Fundamentos para o diagnóstico e prevenção das toxinfecções alimentares na cozinha industrial**. São Paulo: Central de Diagnósticos Laboratoriais, 1990.

SIMONE, E.; GOOSEN, M.; NOTERMANS, S.H.W.; BORGDORFF, M.W. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n.4, p.442-446, apr. 1997.

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

SOUSA C.L.; CAMPOS, G.D. Condições higiênico-sanitárias de uma dieta hospitalar. **Revista de Nutrição**, v.16, n.1, p. 127-134,2003.

SOUZA, I.A. **Aplicabilidade de um modelo para estimar o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz-doce, em função da temperatura**. 2003. 57f. Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A ; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment . In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 rd. [S.I.]: APHA,1992. cap. 3 p. 51-74

TANCREDI, R.C.P.; FAJARDO, C.S.; WANDELI, A.M.M.M. Avaliação das condições sanitárias no transporte e na entrega de gêneros perecíveis em uma Unidade de Alimentação e Nutrição. In: VI CONGRESSO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2001, Guarapari. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 105, Jan./Fev., 2001.

TODD, E.C.D. Foodborne disease in Canada – a 10-year summary from 1975 to 1984. **Journal of Food Protection**, Des Moines , v. 55, n. 2, p. 123-132, Feb., 1992.

TURNBULL, P. C. B.; KRAMER, J. M.; JORGENSEN, K.; MELLING, J. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 219-228, 1979.

UEDA, S.; YAMAZAKI, M.; MACHIDA A.; AKAO, A.; KUWABARA Y. Ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing. III. Airborne *B. cereus* in rice mills. **Journal of antibacterial and Antifungal Agents**, v. 16, p. 459-464, 1992.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, United States Department of Health and Human Services, United States Environmental Protection Agency. Food safety from farm to table: a new strategy for the 21st century. Discussion Draft. Washington (DC): United States Department of Agriculture; 1997.

WALKER, E.; PRITCHARD, C.; FORSYTHE, S. Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. **Food Control**, 2002.

World Health Organization – WHO. Food safety and foodborne illness, Revised January 2002. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>. Acesso em 19/1/2004.

APÊNDICE A

Quadro 1A. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/m³) obtidas a partir de duplicatas de amostras de ar no restaurante 1 da cidade de Viçosa, MG

Coleta	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Segunda	4,0	0,0	2,0	4,0	2,0	2,4
Terceira	4,0	4,0	0,0	2,0	2,0	2,4
Média	2,7	1,3	0,7	2,0	1,3	1,6

Quadro 2A. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/m³) obtidas a partir de duplicatas de amostras de ar no restaurante 2 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,4
Segunda	2,0	10,0	8,0	8,0	6,0	6,8
Terceira	4,0	0,0	2,0	4,0	2,0	2,4
Média	2,0	3,3	3,3	4,0	3,3	3,2

Quadro 3A. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/m³) obtidas a partir de duplicatas de amostras de ar no restaurante 3 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	8,0	6,0	8,0	6,0	5,6
Segunda	4,0	10,0	18,0	2,0	4,0	7,6
Terceira	12,0	12,0	14,0	10,0	6,0	10,8
Média	5,3	10,0	12,7	6,7	5,3	8,0

Quadro 4A. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/m³) obtidas a partir de duplicatas de amostras de ar no restaurante 4 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	20,0	6,0	6,0	4,0	7,2
Segunda	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,4
Terceira	16,0	8,0	0,0	6,0	4,0	6,8
Média	5,3	9,3	2,7	4,0	2,7	4,8

Quadro 5A. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/m³) obtidas a partir de duplicatas de amostras de ar no restaurante 5 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos				Média
	A	B	C	D	
Primeira	50,0	0,0	8,0	30,0	22,0
Segunda	8,0	8,0	2,0	8,0	6,5
Terceira	4,0	18,0	4,0	6,0	8,0
Média	20,7	8,7	4,7	14,7	12,2

APÊNDICE B

Quadro 1B. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/250 cm²) obtidas a partir de duplicatas de amostras de superfícies de bancadas no restaurante 1 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	1000,0	500,0	1000,0	500,0	600,0
Segunda	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	10,0
Terceira	50,0	18500,0	1150,0	500,0	0,0	4040,0
Média	16,7	6500,0	566,7	500,0	166,7	1550,0

Quadro 2B. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/250 cm²) obtidas a partir de duplicatas de amostras de superfícies de bancadas no restaurante 2 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	1000,0	50,0	0,0	50,0	0,0	220,0
Segunda	0,0	0,0	50,0	0,0	250,0	60,0
Terceira	0,0	50,0	63500,0	3500,0	3000,0	14010,0
Média	333,3	33,3	21183,3	1183,3	1083,3	4763,3

Quadro 3B. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/250 cm²) obtidas a partir de duplicatas de amostras de superfícies de bancadas no restaurante 3 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	0,0	0,0	200,0	50,0	700,0	190,0
Segunda	0,0	100,0	0,0	250,0	0,0	70,0
Terceira	0,0	0,0	50,0	200,0	333,0	116,6
Média	0,0	33,3	83,3	166,7	344,3	125,53

Quadro 4B. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/250 cm²) obtidas a partir de duplicatas de amostras de superfícies de bancadas no restaurante 4 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos					Média
	A	B	C	D	E	
Primeira	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0	40,0
Segunda	1000,0	0,0	1000,0	0,0	0,0	400,0
Terceira	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	10,0
Média	350,0	0,0	350,0	16,7	33,3	150,0

Quadro 5B. - Contagens de *Bacillus cereus* (UFC/250 cm²) obtidas a partir de duplicatas de amostras de superfícies de bancadas no restaurante 5 da cidade de Viçosa, MG

Coletas	Pontos				Média
	A	B	C	D	
Primeira	400,0	0,0	50,0	100,0	137,5
Segunda	0,0	0,0	2000,0	0,0	500,0
Terceira	0,0	0,0	50,0	50,0	25,0
Média	133,3	0,0	700,0	50,0	220,8

APÉNDICE C

Quadro C.1. - Caracterização de isolados de amostras de ar em restaurantes de Viçosa, MG

Teste	Restaurante					Total (126 isolados)
	1 (13 isolados)	2 (17 isolados)	3 (35 isolados)	4 (24 isolados)	5 (37 isolados)	
	Nº (%) de resultados positivos ⁽¹⁾					
Coloração de Gram (+)	13 (100)	17 (100)	35 (100)	23 (95,8)	37 (100)	125 (99,2)
Morfologia	13 (100)	17 (100)	35 (100)	23 (95,8)	36 (97,3)	124 (98,4)
Decomposição de tirosina	13 (100)	17 (100)	35 (100)	23 (95,8)	35 (95,6)	123 (97,6)
Utilização anaeróbia de glicose	13 (100)	17 (100)	35 (100)	23 (95,8)	34 (91,9)	122 (96,8)
Reação de Voges-Proskauer	13 (100)	17 (100)	34 (97,1)	23 (95,8)	32 (86,5)	119 (94,4)
Redução de nitrato	13 (100)	17 (100)	34 (97,1)	22 (95,6)	35 (95,6)	121 (96,0)
Motilidade	11 (84,6)	16 (94,1)	32 (91,4)	20 (83,3)	29 (78,4)	108 (85,7)
Crescimento rizóide	2 (15,4)	0	4 (11,4)	5 (21,7)	4 (10,8)	15 (11,9)
Produção de cristais	0	1 (5,9)	0	1 (4,3)	2 (5,4)	4 (3,2)

⁽¹⁾ Somatório de 3 coletas

Quadro C.2. – Caracterização de isolados de amostras de superfícies de bancadas em restaurantes de Viçosa, MG

Teste	Restaurante					Total (126 isolados)
	1 (42 isolados)	2 (31 isolados)	3 (23 isolados)	4 (14 isolados)	5 (15 isolados)	
	Nº (%) de resultados positivos ⁽¹⁾					
Coloração de Gram (+)	42 (100)	31 (100)	23 (100)	14 (100)	15 (93,7)	125 (99,2)
Morfologia	42 (100)	31 (100)	23 (100)	14 (100)	15 (93,7)	125 (99,2)
Decomposição de tirosina	41 (97,6)	31 (100)	23 (100)	13 (92,9)	14 (93,3)	122 (96,8)
Utilização anaeróbia de glicose	42 (100)	31 (100)	23 (100)	14 (100)	15(100)	125 (99,2)
Reação de Voges-Proskauer	41 (97,6)	30 (96,8)	23 (100)	14 (100)	15(100)	123 (97,6)
Redução de nitrato	42 (100)	31 (100)	21 (91,3)	14 (100)	13 (86,7)	121 (96,0)
Motilidade	39 (92,9)	26 (83,9)	20 (87,0)	14 (100)	15(100)	114 (90,5)
Crescimento rizóide	0	0	1 (4,3)	0	0	1 (0,8)
Produção de cristais	0	1 (3,2)	2 (8,7)	0	0	3 (2,4)

⁽¹⁾ Somatório de 3 coletas