

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTIMATIVA DE RISCOS RELACIONADOS À
CONTAMINAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE ARROZ POR
Bacillus cereus

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por RACHEL MONTEIRO CORDEIRO DE AZEVEDO aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de fevereiro de 1998.

Raquel Monteiro Cordeiro de Azere

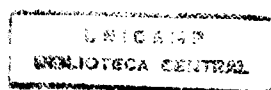
Campinas, 18 de fevereiro de 1998.

Prof. Dr. ANTONIO DE MELLO
SERRANO
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. António de Melo Serrano

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,
para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP
1998



UNIDADE	BC
N.º CH	
T.º	Unicamp
V.º	Az 24e
T.º	33550
PROJ.	395/98
C	
P.º	11,00
DATA	17/04/98
N.º CPD	

CM-00109806-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

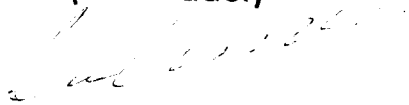
AZ24e
de
Azeredo, Raquel Monteiro Cordeiro de
Estimativa de riscos relacionados à contaminação
preparações de arroz por *Bacillus cereus* / Raquel
Monteiro Cordeiro de Azeredo. – Campinas, SP:
[s.n.], 1998.

Orientador: Antônio de Mello Serrano
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Bacillus cereus. 2.Arroz. 3.Nutrição - serviços.
4.Higiene Alimentar. I.Serrano, Antônio de Mello.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

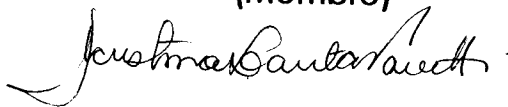
Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano
(Orientador)



Prof. Dr. Frederico José Vieira Passos
(Membro)

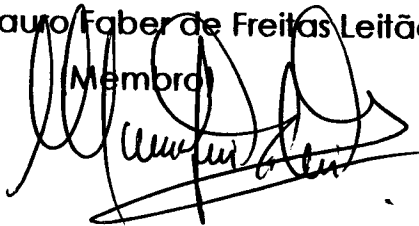


Profª Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Membro)

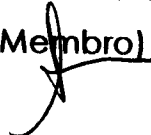


Profª Dra. Maria Lúcia Pereira
(Membro)

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Membro)



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Campinas, de de 1998

Este foi um trabalho feito a muitas mãos. Mãos que me impulsionaram, me ampararam, me mostraram caminhos. Mãos que me ajudaram a lavar milhares de placas e tubos, mãos que acompanharam as minhas em madrugadas de vigília. Mãos que apontaram e corrigiram falhas ou mãos que, simplesmente, se estenderam amigas. Foram mãos de filhos, mãe, marido, irmãos e amigos. Agradeço a Deus por isso. E, sobretudo, agradeço-Lhe porque são sempre as Suas Mãos que me têm guiado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de treinamento que me concedeu, e à CAPES-PICD, pela concessão de bolsa que o tornou viável.

Aos meus colegas professores do Departamento de Nutrição e Saúde, pelo encorajamento, e por assumirem meus encargos durante os períodos de afastamento, mesmo quando essa responsabilidade adicional lhes foi sobremodo pesada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, que ofereceu o suporte financeiro indispensável à realização dos trabalhos de laboratório.

À Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE), nas pessoas de seus diretores e funcionários dos setores de convênio e de compras, pela gestão dos recursos de financiamento. Em especial, ao Prof. Evaldo Vilela, pela orientação que me permitiu obtê-los.

Ao Departamento de Microbiologia da UFV, onde pude desenvolver os experimentos contando com a simpatia e boa vontade de professores, funcionários e companheiros de laboratório.

Aos servidores do Restaurante Universitário da UFV, por toda a colaboração prestada durante toda a fase de monitoração de temperaturas, freqüentemente com o sacrifício de seus horários de trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas formalmente ministradas e decorrentes do convívio com tantos mestres. Em especial, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), representado por professores e funcionários aos quais sou devedora de muita atenção e solidariedade. Aos funcionários da Biblioteca e da Secretaria de Pós-Graduação, pela receptividade e prontidão em me atender, sempre.

Ao meu orientador e especial amigo, professor Antônio de Melo Serrano, pelo incentivo, pela acolhida generosa, pela forma lúcida como me conduziu e, sobretudo, por ter-me impulsionado com sua confiança.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelo incentivo, pela amizade, pelas sugestões e pela participação decisiva em todo o desenvolver dos trabalhos de laboratório.

Ao professor Frederico Passos, pela atenção e pelo auxílio valioso, em forma de ensinamentos que me esclareceram em tantas questões fundamentais.

Aos professores Arnaldo Kuaye, José Luiz Pereira, Maria Lúcia Pereira e Mauro Faber Freitas Leitão, por todo o tempo dedicado às correções e sugestões feitas ao projeto ou à redação da tese e, mais do que tudo, pela calorosa simpatia que me dispensaram.

Ao Prof. Ernesto von Rückert, pela indispensável colaboração quando do uso do software para ajuste do modelo matemático, e à Prof. Nerina Marques, pela correção do texto em inglês.

Às amigas do laboratório de Higiene de Alimentos da FEA, Dirce Kabuki e Raquel Manhani, por tantos momentos agradáveis passados juntos e por tudo que aprendi, ali convivendo. Também à dona Jacinta, cujo abraço de boas vindas sempre me emocionou.

A Lucilene e Wellington, estagiários do Departamento de Microbiologia da UFV, pelos quilômetros literalmente percorridos, comigo, dentro do laboratório. A Ivy e Lincoln, bolsistas do Programa Institucional de Iniciação Científica do CNPq, pelas horas dedicadas em contribuição a este trabalho.

À Sra. Quinita Serrano, que me abriu generosamente as portas de sua casa, e pelo convívio agradável, em tempos de correção da tese.

Ao meu marido, Gino, e aos meus filhos, Henriette, Eveline e Alberto, pelo carinho e pela paciência durante minha prolongada condição de doutoranda "em trânsito". A todos da minha grande família, incluindo os agregados, por estarem sempre do meu lado.

Aos meus muitos e queridos amigos – impossível nomeá-los – porque contribuíram de tal forma para meu sustento, com seu afeto e com sua solidariedade, que só assim eu consegui chegar ao fim e descobrir que 'a esperança que se adia faz adoecer o coração, mas o desejo cumprido é árvore de vida' (Provérbios de Salomão 13:12).

À memória de um homem bom e sábio,
meu grande amigo e maior ensinador: meu pai.

À minha mãe, que, com seu carinho,
sempre tornou mais amena a vida de seus filhos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO	iii
SUMMARY	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. CARACTERIZAÇÃO DE <i>Bacillus cereus</i>	5
2.1.1. Propriedades gerais do microrganismo	5
2.1.2. Características de cepas patogênicas	11
2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA <i>B. cereus</i>	14
2.2.1. Meios de isolamento e enumeração	14
2.2.2. Identificação de <i>B. cereus</i>	19
2.3. INTOXICAÇÕES ALIMENTARES CAUSADAS POR <i>B. cereus</i>	20
2.4. ENTEROTOXINA PRODUZIDA POR <i>B. cereus</i> E SURTOS DE INTOXICAÇÃO DIARREICA	24
2.4.1. Natureza da toxina diarreica	24
2.4.2. Detecção da toxina diarreica	31
2.4.3. Produção e mecanismo de ação da toxina diarreica	34
2.4.4. Surto de intoxicação diarreica por <i>B. cereus</i>	38
2.5. TOXINA TERMOESTÁVEL DE <i>B. cereus</i> E SURTOS DE INTOXICAÇÃO EMÉTICA	40
2.5.1. Natureza do fator emético	40
2.5.2. Detecção da toxina emética	41
2.5.3. Produção e mecanismo de ação da toxina emética	44
2.5.4. Surto de intoxicação emética	45
2.6. OCORRÊNCIA E INCIDÊNCIA DE <i>B. cereus</i> EM ALIMENTOS	47

3.	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1.	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE <i>B. cereus</i> EM ARROZ	52
3.1.1.	Amostras de arroz	52
3.1.2.	Microrganismos	52
3.1.3.	Isolamento, enumeração e confirmação de <i>B. cereus</i>	52
3.1.4.	Biotipagem de exemplares de <i>B. cereus</i> isolados de arroz	55
3.2.	DETERMINAÇÕES DE TEMPERATURA EM PREPARAÇÕES DE ARROZ	56
3.2.1.	Indicador – registrador de temperaturas	56
3.2.2.	Medições de temperaturas	56
3.2.2.1.	Medições de temperatura de arroz, durante cozimento	57
3.2.2.2.	Medições de temperatura de arroz cozido, em recipientes térmicos	58
3.2.2.3.	Medições de temperatura de arroz cozido, durante resfriamento	58
3.3.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COZIMENTO DE ARROZ NA SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE <i>B. cereus</i>	59
3.3.1.	Microrganismos	59
3.3.2.	Preparo das suspensões de esporos	59
3.3.3.	Preparo do meio de arroz	60
3.3.4.	Efeitos do tratamento térmico sobre esporos de <i>B. cereus</i>	61
3.4.	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>B. cereus</i> EM MEIO DE ARROZ	63
3.4.1.	Microrganismos	63
3.4.2.	Preparo das suspensões de esporos e do meio de arroz	63
3.4.3.	Crescimento de <i>B. cereus</i> , em meio de arroz, a diferentes temperaturas	63
3.4.4.	Modelo para estimar o crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz	64
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1.	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE <i>B. cereus</i> EM ARROZ	66
4.1.1.	Isolamento, enumeração e confirmação de <i>B. cereus</i>	66
4.1.2.	Biotipagem de exemplares de <i>B. cereus</i> isolados de arroz	72
4.2.	DETERMINAÇÕES DE TEMPERATURA EM PREPARAÇÕES DE ARROZ	75
4.2.1.	Medições de temperatura de arroz, durante cozimento	75
4.2.2.	Medições de temperatura de arroz cozido, em recipientes térmicos	75
4.2.3.	Medições de temperatura de arroz cozido, durante resfriamento	77

4.3.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COZIMENTO DE ARROZ NA SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE <i>B. cereus</i>	81
4.4.	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>B. cereus</i> EM MEIO DE ARROZ	85
4.4.1.	Cre scimento de <i>B. cereus</i> , em meio de arroz, a diferentes temperaturas	85
4.4.2.	Modelo para estimar o crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz	98
5.	CONCLUSÕES	104
6.	SUGESTÕES	106
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
	ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4.1	Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, mantido em recipiente térmico.	76
FIGURA 4.2	Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, durante resfriamento à temperatura ambiente.	78
FIGURA 4.3	Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, durante armazenamento.	79
FIGURA 4.4	Curvas de destruição térmica de esporos de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 97,5°C.	82
FIGURA 4.5	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 10°C.	86
FIGURA 4.6	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 15°C.	87
FIGURA 4.7	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 22°C.	88
FIGURA 4.8	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 30°C.	89
FIGURA 4.9	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 37°C.	90
FIGURA 4.10	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 43°C.	91
FIGURA 4.11	Crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, a 45°C.	92
FIGURA 4.12	Taxas de crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz, modeladas com a Equação 2 ('Ratkowsky 3').	101
FIGURA 4.13	Curvas preditivas do crescimento de <i>B. cereus</i> em meio de arroz.	102

LISTA DE QUADROS

QUADRO 2.1	Características de <i>B. cereus</i> e espécies correlatas	8
QUADRO 2.2	Principais características das intoxicações por <i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i> e <i>S. aureus</i>	24
QUADRO 3.1	Caracterização de biótipos de <i>B. cereus</i>	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1	Caracterização de isolados de amostras de arroz e das cepas de referência	67
TABELA 4.2	Diferenciação de espécies isoladas de amostras de arroz	68
TABELA 4.3	Enumeração de <i>B. cereus</i> em amostras de arroz polido e de arroz parboilizado	69
TABELA 4.4	Enumeração de <i>B. cereus</i> em amostras de arroz integral	70
TABELA 4.5	Ocorrência e incidência de <i>B. cereus</i> em amostras de arroz	71
TABELA 4.6	Resultados das provas para biotipagem de <i>B. cereus</i>	73
TABELA 4.7	Biótipos de <i>B. cereus</i> isolados de arroz	74
TABELA 4.8	Tempos e respectivas faixas de temperatura, tomados em três pontos de arroz cozido, durante resfriamento	80
TABELA 4.9	Resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> em meio de arroz	83
TABELA 4.10	Taxas de crescimento (K_{max}) de <i>B. cereus</i> , em meio de arroz, a diferentes temperaturas	93
TABELA 4.11	Tempos de geração (min) de <i>B. cereus</i> , em meio de arroz, a diferentes temperaturas	93
TABELA 4.12	Parâmetros a ($^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-1/2}$), b ($^{\circ}\text{C}^{-1}$), T_{min} e T_{max} ($^{\circ}\text{C}$), e respectivos desvios padrões (σ), estimados pelo ajuste do modelo 'Ratkowsky 3' aos valores experimentais de K_{max}	99
TABELA 4.13	Valores preditos para populações finais de <i>B. cereus</i> por grama de arroz cozido, mediante simulação de duas condições de resfriamento. Populações iniciais hipotéticas: 1 microrganismo/g ..	100

RESUMO

Foi investigada a presença de *Bacillus cereus* em 20 amostras de cada um de três tipos de arroz - polido, parboilizado polido e integral - nas quais se observaram, respectivamente, índices de contaminação de 50%, 10% e 100%, correspondentes a valores situados entre $1,00 \times 10^2$ e $1,76 \times 10^3$ UFC/g. Ao todo, 216 amostras de *B. cereus* foram identificadas e, então, classificadas por meio de uma combinação de três provas bioquímicas, as quais permitiram agrupá-las em três biótipos. Apenas quatro (1,85%) dos isolados mostraram-se amilase-negativos, característica que tem sido correlacionada com a capacidade de produção de toxina emética. Foram preparadas cinco diferentes suspensões de esporos, com microrganismos representantes dos três biótipos encontrados e com duas cepas patogênicas de referência. Essas suspensões foram inoculados em meio de arroz, formulado de maneira a reproduzir os ingredientes e proporções usualmente adotados em um restaurante institucional. Após meticulosa monitoração das diferentes operações realizadas na cozinha onde a pesquisa se ambientou, por meio de medições de tempos e temperaturas, foram conduzidos experimentos que simularam métodos de cocção e armazenamento do alimento. Observaram-se reduções nas populações de esporos de, pelo menos, dois ou três ciclos logarítmicos, ao final de 40 min de exposição a 97,5°C. Os ensaios de crescimento permitiram observar o comportamento das diferentes cepas às temperaturas de 10°, 15°, 22°, 30°, 37°, 43° e 45°C e geraram curvas a partir das quais foram calculadas as taxas de crescimento para cada suspensão em particular. A formulação, adicionada de sal e alho em proporções de uso habitual em nosso meio, não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento do microrganismo. Todas as cepas apresentaram crescimento inexpressivo após três dias de incubação a 10°C, mas, a partir de 15°C, os microrganismos multiplicaram-se segundo velocidades crescentes, até 37°C. A partir desta temperatura observou-se declínio nas taxas de crescimento, sendo que a 45°C as taxas apresentaram-se apenas ligeiramente mais altas do que a 22°C. As maiores taxas de crescimento registraram-se entre 30° e 37°C, quando as populações chegaram a aumentar cinco ciclos, em nove horas. Um modelo matemático foi ajustado aos dados experimentais, relacionando taxas de crescimento e temperatura, o que levou a

estimativas do potencial de crescimento dos microrganismos correspondentes a cada suspensão de esporos. A partir dessas estimativas foram traçadas curvas preditivas do crescimento do microrganismo em meio de arroz, quando da exposição a duas condições de resfriamento. No primeiro caso, simulando armazenagem em câmara de refrigeração, o exame das curvas sugeriu aumentos nas populações dos microrganismos da ordem de quatro ciclos logarítmicos, após resfriamento de 45° a 11,5°C durante 14h 20min. No segundo caso, quando foi simulado armazenamento em uma antecâmara e queda de temperatura de 45° a 19°C, durante período idêntico, as curvas preditivas permitiram estimar aumentos populacionais de até sete ciclos logarítmicos. Os resultados observados nas diferentes fases do trabalho permitiram concluir que é pertinente supor que as intoxicações alimentares por *B. cereus*, veiculadas por arroz, sejam subestimadas em nosso meio. Tanto em ambientes domiciliares como em diferentes serviços de alimentação, o processo de resfriamento e as condições de armazenagem do alimento podem permitir crescimento expressivo de diversas cepas, eventualmente alcançando níveis potencialmente determinantes de intoxicações, diarreicas ou eméticas.

SUMMARY

Twenty samples of each polished, parboiled and unpolished raw rice, were collected and examined with regard to the presence of *Bacillus cereus*. Respectively, 50%, 10% and 100% of the samples were found contaminated, reaching levels from $1,00 \times 10^2$ to $1,76 \times 10^3$ CFU/g. When classified by using the combination of three specified biochemical tests, 216 isolates were shown to belong to three different biotypes. Only four isolates were amilase-negatives, property that has some close relationship with the emetic toxin production potential. Testing microorganisms, representing the found biotypes, and two type-strains (emetic and diarrheal) were used to prepare spores suspensions. These suspensions were inoculated in a rice medium, with the purpose to evaluate the effect of rice cooking on spore survival and to investigate the potential for growth in the medium, which was formulated to be identical to the preparation adopted in a foodservice establishment. The experiments were designed to simulate methods of cooking and storage conditions commonly used in the foodservice kitchen. Monitoring procedures were performed with the aim to obtain data needed for describing the entire processes. The results indicated that the rice cooking procedure reduced the *B. cereus* populations at least two or three log cycles, when temperature was kept at 97.5°C during 40 min, while heat-resistant spores would survive. The growth experiments were conducted at 10°, 15°, 22°, 30°, 37°, 43° and 45°C. All the spore suspensions germinated and grew well in the rice medium, when incubated at different temperatures, from 15° to 45°C. The strains showed a minimum growth after three days at 10°C. Growth rates were increased as the temperature shifted from 15° to 37°C and decreased when the temperature arised from 37° to 45°C. The growth rates at 45°C were similar to those observed at 22°C. Optimum growth was found to lie between 30 to 37°C, for all the suspensions. Under these conditions, increases in *B. cereus* counts as big as five log cycles were registered after 9 h incubation. A total of 70 growth curves were generated. Maximum growth rates, for each suspension and temperature, were calculated by linear regression. Estimated growth rates were fitted by using a mathematical model, in order to predict the values along the entire temperature range at which *B. cereus* growth is possible. So, the estimated rates allowed to build curves, to describe the resulting growth of the micorganism at

cooling and storage conditions simulating observations and measurements made in the foodservice kitchen. For the first case, the predictive curves were drawn to show the virtual growth of *B. cereus* present in cooked rice, when it's allowed to cool at walk-in refrigerator, and the temperature of the medium falls from 45° to 11,5°C during a 14h 20min period. The predicted increases in the *B. cereus* populations reached four log cycles, when such cooling conditions were simulated. For the second case, the curves drawn described the predicted growth when cooling rates are slower, in the walk-in refrigerator hall and, during identical period, the temperature falls from 45° to 19°C. In this case, the predicted increases in *B. cereus* populations reached seven log cycles. The results presented confirm the hazard associated with *B. cereus* contamination of cooked rice and show that the standard preparation, with salt and garlic in the proportions tested, may serve as a food poisoning vehicle if temperature-abused. Although outbreaks of foodborne diseases are a common occurrence, *B. cereus* have seldom been incriminated. These findings indicate that the real risks represented by the microorganism might be underestimated in foodservice stablishments as well in the homes where cooked rice provide ideal conditions for its contamination and growth.

1. INTRODUÇÃO

Muitos dos agentes causadores de doenças de origem alimentar determinam o aparecimento de sintomas cuja origem é facilmente identificada com a ingestão de alimentos contaminados. Tal é o caso das intoxicações causadas por *Bacillus cereus*, que se manifestam sob duas formas clínicas, uma diarreica e outra emética. A síndrome diarreica é atribuída a uma enterotoxina e caracteriza-se por diarreia e dores abdominais que surgem 8 a 16 h depois da ingestão de alimento altamente contaminado, enquanto a intoxicação emética é causada por uma toxina distinta, cuja ingestão causa a ocorrência de náuseas e vômitos dentro de um período de incubação muito reduzido, de 1 a 5 h.

Mundialmente, as intoxicações alimentares constituem importante causa de morbidade. As perdas decorrentes de tais doenças são incalculáveis. São horas paradas, que ocasionam interrupção na produção de bens e serviços, é o desprestígio de produtos e são os gastos com medicamentos e dietas. Além dessas perdas, e mais difíceis de contabilizar, há os prejuízos de ordem emocional que acompanham o desconforto físico. Todos esses custos são ainda mais sentidos quando as populações atingidas formam grandes contingentes, como acontece quando os surtos acometem usuários de serviços de alimentação.

A partir da década de 70 multiplicaram-se, no Brasil, as cozinhas de grande porte, em decorrência da criação do Programa de Alimentação do Trabalhador, o PAT, que estimulou empresas ao fornecimento de refeições aos seus empregados, arcando, assim, com parte das despesas decorrentes da reposição dos gastos energéticos com o trabalho. Atualmente, mais de 5 milhões de trabalhadores, diariamente, recebem alimentação preparada em cozinhas projetadas para atender até alguns milhares de pessoas. Além desses restaurantes industriais, e operando de forma semelhante na produção e distribuição de refeições, há os restaurantes institucionais - em universidades, escolas, creches, asilos e presídios - e as cozinhas hospitalares, que atendem clientela sadia e enferma. Tem sido evidente, também, o crescimento do comércio de refeições, especialmente em restaurantes do tipo "self-service", para atender à demanda de pessoas que, por necessidade ou conveniência, se alimentam fora do ambiente doméstico.

A importância dos serviços de alimentação na origem dos surtos de doenças de origem alimentar, por sua vez, parece proporcional às substanciais quantidades de alimentos preparadas e servidas nesses locais. Estudos conduzidos nesses ambientes contribuem para determinar a suscetibilidade dos sistemas de produção de refeições a perigos de origem microbiana (CREMER & CHIPLEY, 1977; AVENS *et al.*, 1978; BRYAN & BARTLESON, 1985). Relatos citados por SNYDER & MATTHEWS (1984) comprovam o envolvimento de tais estabelecimentos em 54% dos surtos confirmados pelo CDC (Center for Disease Control), durante os anos 80. Na Holanda, SIMONE *et al.* (1997) pesquisaram origens de surtos, verificando que mais de 50% do total ocorreram em serviços de alimentação, locais onde se registraram, também, aqueles que envolveram os maiores números de pessoas.

Ainda que, no Brasil, as publicações sejam escassas, os serviços de alimentação estão entre os locais onde melhor se identificam os surtos, cujas causas parecem residir nas dificuldades reconhecidas do setor, entre as quais se incluem a grande variedade de ingredientes e preparações, que proporcionam inúmeras chances de contaminações cruzadas, a mão de obra pouco qualificada, a necessidade de baratear custos para enfrentar concorrências e as plantas físicas inadequadas à produção de refeições. Nesses locais, a preparação de grandes lotes de alimentos, freqüentemente a temperaturas subletais, e as lentas operações de resfriamento contribuem para a magnitude dos riscos a que se expõem seus usuários.

O arroz é componente invariável dos cardápios servidos nos serviços de alimentação, em nosso país, assim como faz parte da dieta brasileira habitual. Dados apresentados no ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL (1992), revelaram consumo diário médio, *per capita*, de 82 g, com valor máximo de 101,5 g observado na região centro-oeste.

O envolvimento de preparações de arroz em surtos de intoxicações por *B. cereus* tem sido amplamente registrado, especialmente em países ou regiões onde esse é o cereal básico da dieta. Suficiente comprovação há, também, de que o arroz cozido é um bom substrato para o crescimento de *B. cereus*, tanto para cepas eméticas como diarreicas, ainda que sejam as formas de intoxicação emética que predominem, associadas ao consumo do alimento. Considerando-se, portanto, o hábito alimentar brasileiro e a insuficiência de dados, em nosso meio,

relativos à importância do consumo de arroz na etiologia de intoxicações por *B. cereus*, faz-se oportuna a avaliação dos riscos a que está exposta a população.

Nos últimos vinte anos intensificou-se a preocupação com a produção higiênica de alimentos e com a proteção do consumidor. Prevalecem, em nosso tempo, a aplicação das BPF (Boas Práticas de Fabricação) e do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Contudo, fica explícito que é inviável a obtenção de alimentos absolutamente isentos de contaminação. Daí o interesse crescente em se quantificar a probabilidade de ocorrência de um perigo de origem alimentar, por meio de sistema que permita estimar riscos envolvidos no consumo de alimentos ("risk assessment"). A operacionalização do que se define como "estimativa de risco" consiste dos seguintes passos: (1) identificação do perigo, (2) estimativa da exposição, (3) estimativa da "dose-resposta" e (4) caracterização do risco.

A partir das conceituações de POTTER (1996) e de NOTERMANS *et al.* (1997), a estimativa de riscos decorrentes da ingestão de *B. cereus* presente em arroz compreende:

- **Identificação do perigo** – reconhecimento, a partir de dados publicados, de que o microrganismo é contaminante freqüente do alimento (GILBERT & PARRY, 1977; VIJAYALAKSHMI *et al.*, 1981; SHAH *et al.* 1996), causa intoxicações (HAUGE, 1955; MELLING *et al.*, 1976) e pode crescer e produzir toxinas no arroz cozido a temperaturas a que habitualmente se expõe o alimento pronto (JOHNSON *et al.*, 1983, 1984).
- **Estimativa de exposição** - quantificação da contaminação (pelo microrganismo ou toxinas) a que os consumidores estariam expostos no momento do consumo do alimento. É feita por meio de testes de armazenamento, acompanhados de inquéritos que permitam conhecer condições dos ambientes onde se processam as etapas, desde o preparo até o consumo.
- **Estimativa da "dose-resposta"** - obtida por observação de surtos e por ensaios (*in vivo* ou *in vitro*), de forma a estabelecer níveis de contaminação que produzam o efeito tóxico.
- **Caracterização do risco** - processo de identificação e quantificação de fatores que levam à exposição a níveis inaceitáveis de *B. cereus*, em arroz cozido.

Assim, o estudo foi conduzido visando a contribuir para a estimativa de risco de intoxicações por *B. cereus* associadas ao consumo de arroz, por meio de testes direcionados à estimativa de exposição e caracterização do risco. Ainda que ambientada em um serviço de alimentação de grande porte, a pesquisa apresenta possibilidade de aplicação de seus resultados a outras condições, inclusive domiciliares. O trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar o índice de contaminação por *B. cereus*, em amostras de arroz;
- b) classificar os isolados, segundo esquema de biotipagem, de forma a detectar e quantificar cepas possivelmente patogênicas;
- c) observar e avaliar processos de preparo, resfriamento e estocagem do alimento, no ambiente de um serviço de alimentação;
- d) submeter duas cepas patogênicas de referência e outras, isoladas de arroz, a estudos de sobrevivência e de crescimento, de forma a reproduzir e quantificar efeitos dos processos observados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus cereus*

2.1.1. Propriedades gerais do microrganismo

Bacillus cereus figura entre as 34 espécies reconhecidas do gênero *Bacillus*, segundo listagem na nona edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (CLAUS & BERKELEY, 1986) e seu isolamento original é atribuído a FRANKLAND *et al.* (1887), segundo citação de D'AUBERT *et al.* (1980). A designação "cereus" - que significa, em latim, ceroso - descreve bem a aparência de suas colônias em meios de ágar. As bactérias dessa espécie são longos bastonetes Gram positivos, formadoras de esporos, móveis por meio de flagelos peritricos, anaeróbios facultativos e catalase positivos (CLAUS & BERKELEY, 1986). Além dessas características genéricas, *B. cereus* exibe outras de grande importância para sua identificação, como dimensões da célula vegetativa, com diâmetro de 1,0 a 1,2 µm e comprimento de 3,0 a 5,0 µm, esporos centrais ou paracentrais que não distendem o esporângio e, também, certas características fisiológicas evidenciadas em metodologias de detecção do microrganismo, entre as quais se salientam um sistema ativo de produção de lecitinases e incapacidade de fermentar manitol (JOHNSON, 1984; SHINAGAWA, 1990; HARMON *et al.*, 1992).

Até meados deste século, a organização taxonômica do gênero *Bacillus* era caótica, podendo-se considerar que a contribuição de SMITH *et al.* (1946, 1952), citados por GOEPFERT *et al.* (1972) e HARMON *et al.* (1992), foi um marco no processo de classificação das espécies. Partiu daí a proposta de dividir o gênero em três grupos, com base em características morfológicas de esporos e esporângios. O grupo I consiste de organismos cujos esporos não distendem o esporângio; membros dos grupos II e III apresentam distensão do esporângio, e se diferenciam pela forma dos esporos, elipsoidais no grupo II e cilíndricos no grupo III. Posteriormente, o esquema foi endossado por GORDON (1973), e o grupo I foi então subdividido de acordo com as dimensões de suas células vegetativas, de forma que *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* passaram a compor o grupo IA, com células de comprimento maior do que 0,9 µm e

produzindo glóbulos lipídicos. SMITH *et al.* (1946, 1952) consideraram *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* variedades de *B. cereus*, em vez de espécies distintas, segundo citação de GOEPFERT *et al.* (1972) e KRAMER & GILBERT (1989). Estes autores criticaram tal posição, chamando atenção para o fato de que esses microrganismos são todos intimamente relacionados e, para efeitos práticos, cada um difere de *B. cereus* por apenas uma característica que pode, inclusive, ser perdida em culturas repetidas. Assim, a característica diferencial de *B. thuringiensis* é a produção de cristais protéicos, tóxicos para insetos, enquanto *B. mycoides* apresenta crescimento rizóide em meio sólido e *B. anthracis* exibe patogenicidade peculiar para animais. Por isso, tanto agrupá-los em uma só espécie como considerá-los espécies diferentes pareceu questionável.

A distinção entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* - este um biopesticida de ampla utilização - é, com certeza, a que suscita mais dúvidas. Estudos de taxonomia numérica, baseados em variações enzimáticas, desenvolvidos por ZAHNER *et al.* (1989), contribuíram para que sejam considerados uma só espécie; estes autores sugerem a possibilidade de que o gene codificador da delta toxina de *B. thuringiensis* possa ser transmitido a *B. cereus* por conjugação. HONDA *et al.* (1991) constataram grande similaridade biológica, físico-química e imunológica entre hemolisinas produzidas por cepas dos dois microrganismos. DROBNIEWSKI (1993) mencionou a existência de *B. thuringiensis* mutantes, sem cristais, praticamente impossíveis de se distinguirem de *B. cereus*. CARLSON *et al.* (1994), analisando diversidade genética entre 24 cepas de *B. cereus* e 12 de *B. thuringiensis*, obtiveram resultados indicadores de grande homologia, compatível com membros da mesma espécie. Estudos de fagotipagem, desenvolvidos por AHMED *et al.* (1995), apresentaram evidências adicionais da íntima associação entre *B. cereus* e *B. thuringiensis*. A observação de casos de intoxicação alimentar, de recentes descrições, atribuídas a *B. thuringiensis* (JACKSON *et al.*, 1995), e a verificação de produção de enterotoxina por cepas do microrganismo isoladas de alimentos (GRIFFITHS, 1990; JACKSON *et al.*, 1995; DAMGAARD *et al.*, 1996; ASANO *et al.*, 1997), contribuem para reforçar sua semelhança com *B. cereus*. Para DAMGAARD *et al.* (1996), a diferença entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* não é suficiente para classificá-los em espécies distintas e, ainda que a taxonomia corrente o faça, as evidências acumuladas têm indicando indubitável necessidade de revisão.

Exemplares típicos de *B. cereus* exibem as seguintes propriedades:

- crescem em alimentos com atividade de água (a_w) $\geq 0,95$, conforme observações de RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) e BRYAN *et al.* (1981), enquanto JAKOBSEN & MURREL (1977) relataram crescimento em valores a_w a partir de 0,91. RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) relataram redução na taxa de crescimento do microrganismo à medida que as concentrações de cloreto de sódio aumentaram, a partir de 0 %, até que o crescimento cessou quando essa concentração chegou a 10%;
- segundo GILBERT (1979), multiplicam-se a temperaturas entre 10 e 48°C, com faixa ótima situada entre 28 e 35°C. JOHNSON *et al.* (1983) relataram faixa mais ampla, entre 5 e 50°C;
- conforme observado por KIM & GOEPFERT (1971), exibem crescimento na faixa de pH entre 4,35 a 9,3. RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) apontaram 4,9 como o menor valor que permitiu crescimento. Valores máximos de pH 9,3 também foram notados por FLUER & EZEPCCHUK (1970), citados por KRAMER & GILBERT (1989);
- JOHNSON *et al.* (1983) observaram germinação de esporos entre 5 e 50°C e tempos de geração variando entre 26 e 57 min, a temperaturas próximas de 30°C;
- a resistência térmica dos esporos varia entre estirpes e com o substrato em que são aquecidos: RAJKOWSKY & MYKOLAJCIK (1987) encontraram valores $D_{100^\circ\text{C}}$ entre 0,6 e 27 min e DUFRENNE *et al.* (1994) registraram variações de $D_{90^\circ\text{C}}$ entre 4,6 e 200 min.

Cepas de *B. cereus* apresentam antígenos somáticos (O), de esporos e de flagelos (H). Os antígenos somáticos estão localizados na parede celular e no protoplasma, e são, respectivamente, termoestáveis e termolábeis. São antígenos que, freqüentemente, mostram reações cruzadas entre linhagens, enquanto os antígenos de esporos e de flagelos são mais específicos. A maior facilidade de manuseio tem justificado a preferência pelo uso dos antígenos H em estudos sorológicos (KRAMER & GILBERT, 1989; MIKAMI *et al.*, 1990). Atualmente, são conhecidos 42 sorotipos flagelares (sorotipos H), dos quais 23 têm sido associados a cepas patogênicas (DROBNIIEWSKI, 1993).

Um sumário das características mais marcantes de *B. cereus* e outros membros do seu grupo é apresentado no Quadro 2.1, compilado a partir de CLAUS & BERKELEY (1986) e HARMON *et al.* (1992).

QUADRO 2.1 - Características de *B. cereus* e espécies correlatas

Propriedade	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
Reação de Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Lecitinas	±	±	±	+
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-
Utilização anaeróbia de glicose	+	+	+	+
Motilidade	±	-	±	-
Hemólise em sangue de carneiro	+	+	+	-
Crescimento rizóide	-	+	-	-
Produção de cristais tóxicos	-	-	+	-
Redução de nitrato	±	+	+	+
Reação VP	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	+	+	+	+
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Utilização de citrato	+	+	+	+

+ 90 a 100% das cepas são positivas

± 50 a 90% das cepas são positivas

90 a 100% das cepas são negativas

Diversos pesquisadores, como D'AUBERT *et al.* (1980) e HARMON *et al.* (1992), chamaram a atenção para a interpretação dos testes de identificação, uma vez que o microrganismo é, fundamentalmente, variável em suas características bioquímicas, bem como em relação às propriedades sorológicas e de sensibilidade a fagos. De modo geral, estirpes de *B. cereus* utilizam glicose, frutose e trehalose, mas não são capazes de degradar xilose, arabinose, galactose, sorbose, sorbitol, manitol e dulcitol (GOEPFERT *et al.*, 1972). A urease é produzida por algumas cepas, enquanto a grande maioria reduz nitrato a nitrito. Têm sido observadas cepas que apresentam fraca atividade amilolítica, ainda que a regra seja a produção intensa

de amilase (JINBO & KOKUBO, 1982; SHINAGAWA *et al.*, 1979, 1985; SHINAGAWA, 1990). São microrganismos com capacidade de proteólise, efeito que se exerce sobre caseína e gelatina devido a uma metaloproteína produzida pela maioria das cepas, conforme citação de GOEPFERT *et al.* (1972).

Como a maioria das espécies do gênero, *B. cereus* apresenta esporos resistentes ao calor, à desidratação e a outros fatores destrutivos, o que explica sua ocorrência freqüente em grande variedade de alimentos, crus e processados (GOEPFERT *et al.*, 1972; GILBERT, 1979; KRAMER & GILBERT, 1989) e em medicamentos (GARCIA-ARRIBAS *et al.*, 1988; HUSMARK & SIK, 1990). Por causa dessas propriedades e de sua excepcional capacidade de adesão, esporos de *B. cereus* representam problema de grande proporção na indústria de alimentos; seus esporos apresentam a superfície fortemente hidrofóbica, com grande capacidade de aderência a materiais comumente usados em superfícies de equipamentos e bancadas, como aço inox, em indústrias e cozinhas (HUSMARK & SIK, 1990).

O conjunto de propriedades exibidas por *B. cereus* justifica por que tem sido, desde há muito, um dos maiores problemas da indústria de laticínios, onde provoca, por ação de lecitinases, agregação da camada lipídica de leite pasteurizado, fenômeno conhecido como "bitty cream". Atribui-se-lhe, também, a formação de "sweet curdling" - coagulação da caseína sem redução de pH (ANDERSSON *et al.*, 1995).

Membros do gênero *Bacillus* apresentam distribuição ubíqua e, em função de suas células secretarem enzimas capazes de degradar grande variedade de materiais orgânicos, são, basicamente, saprófitas. Dessa forma, *B. cereus* desempenha papel ecológico bem definido e compõe um importante grupo de interesse biotecnológico (KRAMER & GILBERT, 1989; DROBNIEWSKI, 1993).

Ainda que sua função biodegradante, no meio ambiente, seja amplamente reconhecida, as atenções sobre o microrganismo se acentuaram notoriamente após sua identificação como patógeno de origem alimentar, agente etiológico de intoxicações que se manifestam em forma de diarreia ou de vômito, importante causa de surtos relatados mundialmente. O microrganismo contamina alimentos durante o manuseio, processamento, estocagem ou distribuição, podendo crescer e causar decomposição ou, ainda, determinar a ocorrência de intoxicações, em

homens e animais (GOEPFERT *et al.*, 1972; BENNETT *et al.*, 1993; SHINAGAWA, 1993; DUFRENNE *et al.*, 1994). Segundo GRANUM (1994), a bactéria pode ser transferida para os alimentos a partir de diferentes fontes e aí sobreviver, em forma de esporos, a tratamentos térmicos que reduzem a população competitiva, o que lhe proporciona condições ideais de multiplicação. SHAH *et al.* (1996) reuniram dados de diversos levantamentos que permitem identificar arroz e leite como os mais importantes veículos de intoxicações pelo microrganismo. Além da ocorrência em alimentos e ambientes, relata-se uma grande proporção de portadores assintomáticos do microrganismo: cerca de 14% de 711 adultos saudáveis, em um levantamento feito na Inglaterra, e 43% de 120 escolares, na África, segundo citação de DROBNIOWSKI (1993).

São conhecidas sete diferentes toxinas produzidas por *B. cereus*, seis das quais produzidas durante o crescimento vegetativo e secretadas pelas células: duas hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), três fosfolipases-C (fosfatidil-inositol hidrolase, fosfatidil-colina hidrolase e esfingomielinase - esta com atividade também hemolítica) e a enterotoxina, responsável pelo quadro de diarreia. A sétima toxina, emética, provavelmente produzida por ação enzimática, a partir de componentes do meio (DROBNIOWSKI, 1993; GRANUM, 1994, 1997), é um peptídeo cíclico, recentemente purificado por AGATA *et al.* (1994). Além dessas toxinas, NACLERIO *et al.* (1993) identificaram uma proteína com atividade bactericida, que foi denominada cereína, ativa contra outras cepas de *B. cereus*, mas que não apresenta interferência no crescimento de outras bactérias.

Além das intoxicações alimentares, várias infecções, localizadas ou sistêmicas, são atribuídas a *B. cereus*. Estas manifestações são pouco comuns, em comparação com as formas gastroentéricas. A produção de toxinas e a capacidade de invadir tecidos contribuem, inclusive, para doenças oculares extremamente agressivas, que podem causar cegueira em menos de 24 horas. Entre as manifestações sistêmicas, para as quais as fosfolipases e hemolisinas produzidas pelo microrganismo assumem papel patogênico especial, destacam-se quadros de bacteremia e septicemia, endocardite, infecções do sistema nervoso central e do aparelho respiratório, bem como outras infecções oportunistas em pessoas com depressão da imunidade. A produção local de proteases pode, também, ser responsável por reações alérgicas do trato respiratório (GOEPFERT *et al.*, 1972; KRAMER & GILBERT, 1989; DROBNIOWSKI, 1993; FERMANIAN *et al.*, 1996).

Fato que tem contribuído de maneira notável para estimular as atenções sobre *B. cereus*, em anos recentes, tem sido o isolamento freqüente de cepas psicrotróficas, capazes de produzir toxina diarreica, a partir de alimentos mantidos sob refrigeração, especialmente leite (CHRISTIANSSON *et al.*, 1993a, 1993b; DUFRENNE *et al.*, 1995; GRANUM, 1997). Outras características, como resistência a altas concentrações de etanol (BECKERS & VAN ERNE, 1983) e a antibióticos β -lactâmicos, inclusive a cefalosporinas de 3ª geração (DROBNIOWSKI, 1993), também explicam o crescente interesse no patógeno.

2.1.2. Características de cepas patogênicas

Vários estudos têm sido desenvolvidos, para identificar cepas patogênicas e para determinar características diferenciais entre os tipos diarreicos e eméticos, de forma a encontrar associações que sirvam de instrumento epidemiológico. Tais estudos investigam substratos e taxas de crescimento, sensibilidade a antibióticos e a fagos, características bioquímicas e sorológicas (JOHNSON, 1984; SHINAGAWA, 1990; VÄISÄNEN *et al.*, 1991). Em algumas dessas investigações têm sido encontradas evidências da possível existência de cepas produtoras de ambas as toxinas (BENNETT *et al.*, 1993; GRANUM, 1997).

Oito cepas de *B. cereus*, representando quatro tipos diarreicos e quatro eméticos, foram examinadas com relação à resistência térmica e à germinação de esporos (JOHNSON *et al.*, 1982). Não se perceberam diferenças entre esporos das diferentes cepas expostos a tratamentos de 85 e 90°C, mas os esporos de cepas diarreicas apresentaram maior taxa de germinação, após choque térmico de 70°C por 15 min. Segundo os pesquisadores, isto significaria maior potencial de sobrevivência de esporos eméticos. JOHNSON *et al.* (1983), avaliaram a germinação de esporos e o crescimento de cepas pertencentes aos dois tipos patogênicos, em TSB e meio de arroz. Incubando-os a temperaturas entre 5 e 50°C, não perceberam diferenças significativas, a não ser pelo fato de que uma das cepas eméticas era especialmente capaz de crescer em meio de arroz a 45°C. O mesmo grupo avaliou a sobrevivência, germinação e crescimento de duas cepas eméticas e duas diarreicas, constatando grande variação entre tipos e observando que as cepas eméticas exibiam maiores taxas de sobrevivência aos tratamentos

térmicos. O meio de arroz usado no experimento não pareceu favorecer o crescimento de cepas eméticas (JOHNSON *et al.* 1984).

RAJKOWSKI & MIKOLAJCIK (1987) observaram grandes variações nos tempos de destruição térmica, tanto entre cepas como em função de diferentes substratos. Relataram, ainda, grande variabilidade nas taxas de crescimento, calculadas a diversas temperaturas, apresentadas por 17 microrganismos caracterizados no estudo. De maneira geral, porém, não se evidenciaram características que pudessem ser relacionadas à patogenicidade. Já os relatos de SHINAGAWA (1993) associaram esporos de cepas eméticas a maior resistência térmica: não foram destruídos a 100°C por 30 min ou a 105°C por 5 min, enquanto os de cepas diarreicas o foram.

Com relação ao padrão de resistência a antibióticos, KAMAT *et al.* (1989) não observaram distinção entre cepas e destacaram a necessidade de se considerar *B. cereus* um patógeno, sistematicamente, visto que a maioria das estirpes é toxigênica. Também SHAH *et al.* (1996) não observaram diferenças significativas entre 50 isolados de 300 amostras de alimentos

A especificidade dos antígenos H permitiu a identificação de 18 sorotipos flagelares de *B. cereus*, para alguns dos quais se encontraram associações com as duas síndromes (TAYLOR & GILBERT, 1975). Segundo investigação de GILBERT & PARRY (1977), cinco sorotipos foram mais comumente encontrados entre cepas eméticas (1, 3, 4, 5 e 8). Um ou mais destes sorotipos foram encontrados em 56 de 61 surtos eméticos, todos associados ao consumo de arroz, sendo o sorotipo 1 o mais comum, isolado de 69% dos surtos. Os sorotipos 2, 6, 9, 10 e 12 só foram isolados de surtos diarreicos, mas os sorotipos 1 e 8 foram implicados, também, em surtos diarreicos - daí a conclusão dos autores de que a sorotipagem não é suficiente para distinguir os dois tipos patogênicos. Posteriormente, o esquema original de sorotipagem foi ampliado para 23 sorotipos por PARRY & GILBERT (1980). Estes autores divulgaram resultados segundo os quais esporos do sorotipo H-1 eram os mais termorresistentes entre sete tipos testados, concluindo que o procedimento de cocção usado no preparo de arroz parecia seletivo para certos sorotipos. Isso explicaria o fato de ser o tipo H-1 o mais habitualmente implicado em surtos eméticos. MIKAMI *et al.* (1990), afirmaram que mais de 90% dos surtos eméticos são devido a estirpes pertencentes ao sorotipo H-1. Investigações epidemiológicas mais

recentes têm indicado que sorotipagem pode ser, realmente, um instrumento auxiliar no reconhecimento de cepas eméticas: SHINAGAWA (1993) relatou a caracterização de, aproximadamente, 80% de cepas eméticas no sorotipo H-1 e NISHIKAWA *et al.* (1996) identificaram o tipo H-1 em 37 de 38 isolados de surtos eméticos, os quais exibiram respostas positivas em ensaios de avaliação da toxicidade.

O uso de análise cromatográfica de ácidos graxos para identificar *B. cereus* e determinar a origem das cepas foi adotado por RAEVUORI *et al.* (1976), mas as diferenças entre composições de diferentes exemplares eram tão pequenas que não permitiram resultados conclusivos.

A suscetibilidade do microrganismo a bacteriófagos também foi testada com objetivos de diagnóstico e diferenciação entre tipos. MAJOR *et al.* (1969), citados por JOHNSON (1984) não encontraram diferenças na suscetibilidade a fagos nem na sensibilidade a antibióticos, entre cepas diarreicas e eméticas. VÄISÄNEN *et al.* (1991) encontraram muitas reações cruzadas entre *B. cereus* e outras espécies do grupo. Para AHMED *et al.* (1995), a fagotipagem pode ser um valioso auxiliar na identificação da origem dos surtos de intoxicação por *B. cereus*, mas não na discriminação entre tipos patogênicos: usando 12 bacteriófagos, propuseram um esquema que permitiu classificar 97% de 161 isolados de surtos, obtendo ótimas correlações entre os tipos isolados de alimentos e os isolados de fezes dos doentes.

Correlação entre a capacidade de fermentação de salicina e ausência de patogenicidade foi mencionada por D'AUBERT *et al.* (1980). Observação semelhante foi relatada por SHINAGAWA (1990), de que 78% das cepas não patogênicas apresentaram resultados positivos, em testes de fermentação de salicina, contra apenas 31,9% das cepas patogênicas.

SHINAGAWA *et al.* (1979) estudaram 82 exemplares de *B. cereus* isolados de surtos eméticos e observaram que todos eram amilase-negativos. Posteriormente, 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. Entretanto, resultados apresentados por SHINAGAWA *et al.* (1985), levaram à conclusão de que apenas as cepas eméticas são, sistematicamente, negativas ou

fracamente amilolíticas, enquanto cepas diarreicas comumente hidrolisam amido: entre 53 isolados amilase-positivos, verificaram que 41,5% produziam toxina diarreica. O teste de amido foi recomendado por SHINAGAWA (1993), como forma preliminar de selecionar cepas eméticas de *B. cereus*. A associação de cepas amilase-negativos com produção de toxina emética foi confirmada, também, por NISHIKAWA *et al.* (1996), em 38 isolados de surtos. Esses autores citaram resultados semelhantes obtidos por YASUKAWA *et al.* (1981), que submeteram ao teste de amido 40 amostras do microrganismo isoladas de surtos eméticos e relataram 100% de resultados negativos, enquanto apenas 25,9% das isoladas de alimentos exibiram a mesma característica. OMBUI *et al.* (1997) constataram a capacidade amilolítica em 96% das cepas diarreicas pesquisadas.

SHINAGAWA (1990) considerou a biotipagem menos efetiva do que a sorotipagem, na diferenciação de cepas patogênicas, em decorrência da falta de padronização e da subjetividade na interpretação dos testes bioquímicos. Reconheceu, entretanto, que esquemas de biotipagem apresentam grande potencial de uso epidemiológico, especialmente em conjunto com fagotipagem.

2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA *B. cereus*

2.2.1. Meios de isolamento e enumeração

As metodologias para detecção e identificação de *B. cereus* continuam sendo a base para o diagnóstico de suas intoxicações. Dada a ubiquidade do microrganismo, os procedimentos de prevenção requerem a monitoração e controle de produtos, ingredientes e ambientes, o que leva à necessidade de se dispor de meios de isolamento suficientemente seletivos a ponto de impedir o crescimento de outros microrganismos comuns a uma grande variedade de alimentos e locais (VAN NETTEN & KRAMER, 1992).

A verificação da presença de *B. cereus* em alimentos e ambientes é feita, usualmente, por método de contagem padrão em placas. Contudo, é amplamente aceita a recomendação de HARMON (1984) de que, para estimar populações de *B. cereus* em alimentos com populações abaixo de 100 UFC/g, é mais apropriado usar técnica de Número Mais Provável (NMP), empregando caldo

seletivo. As contagens em placas, contudo, apresentam maior consistência de resultados, segundo LANCETTE & HARMON (1980).

Nos primeiros estudos relacionando *B. cereus* a intoxicações alimentares, HAUGE (1950, 1955) adotou método de inoculação direta em superfície de ágar-sangue, o que foi referendado pelo Nordic Committee on Food Analysis (*apud* VAN NETTEN & KRAMER, 1992). Esse sistema apoia-se, tão somente, no reconhecimento de características morfológicas das colônias hemolíticas em meio de ágar, sem nenhum princípio seletivo, e foi aprimorado por KRAMER *et al.* (1982), que propôs o espalhamento de polimixina-B na superfície do meio, conforme citação de VAN NETTEN & KRAMER (1992).

Pelo menos 11 meios de ágar foram desenvolvidos, desde 1946, com o propósito de isolar e enumerar o microrganismo, tendo sido relacionados por VAN NETTEN & KRAMER (1992). Em todos esses meios seletivos para *B. cereus*, o inóculo deve ser espalhado em superfície, o que permite a formação de colônias características, de fácil identificação. A incubação a 30°C é reconhecida pela maioria dos autores como a mais indicada para promover o crescimento do microrganismo. Os agentes seletivos utilizados nos meios de isolamento limitam-se a polimixinas, cloreto de lítio e actidiona. Os efeitos de cloreto de lítio, contudo, podem levar à inibição de *B. cereus*, daí a contra-indicação de seu uso (MOSEL *et al.*, 1967). A polimixina-B apresenta efeito bactericida contra Gram-negativas e interfere na estrutura de membranas citoplásmicas. O espectro antibacteriano da polimixina-E é semelhante ao da polimixina-B, permitindo que bactérias Gram-positivas aeróbias ou facultativas cresçam, inclusive algumas manitol-negativas, capazes de formar colônias nos meios seletivos descritos (VAN NETTEN & KRAMER, 1992).

Os sistemas de diagnóstico utilizados nos meios de isolamento de *B. cereus* exploram características morfológicas de suas colônias, bem como propriedades fisiológicas relacionadas à produção de lecitinases e à incapacidade de fermentar manitol (VARADARAJ, 1993). A reação de precipitação de lecitina envolve hidrólise mediada por fosfolipases C, enzimas dependentes de íons Ca e Zn, ou Mg, caracterizadas pelo sítio de clivagem, nos fosfolipídeos. É um sistema enzimático complexo, que ocasiona a precipitação do substrato e o aparecimento de zona opaca em volta das colônias, em meio sólido, propriedade explorada na

elaboração da maioria dos meios seletivos desenvolvidos para isolamento do microrganismo (TITBALL, 1993), diferente da reação de formação de halo transparente, observada, por exemplo, em colônias de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Proteus vulgaris* (VAN NETTEN & KRAMER, 1992).

O tamanho da zona de precipitação pode dificultar a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Tal problema pode ser contornado pela redução da faixa de contagem para 10 a 100 UFC (HARMON *et al.*, 1992), ou limitar a contagem até 30 UFC, já que a coalescência de colônias, acima desse número, pode dificultá-la (HARMON *et al.*, 1984).

Segundo SHINAGAWA (1990) e VAN NETTEN & KRAMER (1992), os meios mais difundidos, atualmente, incluem o uso de polimixina-B, gema de ovo (fonte de lecitina) e um indicador de pH. Tais meios apresentam seletividade decorrente da resistência de *Bacillus* à polimixina e seu sistema de diagnóstico é baseado em precipitação de lecitina e coloração do meio, conforme descrições que se seguem.

- a) Meio de Mossel (MOSSSEL *et al.*, 1967): conhecido como MYP, sigla de "mannitol - egg yolk - phenol red - polymyxin", detecta *B. cereus* pela forte reação de lecitinase, comum à maioria das cepas, e pela incapacidade de degradar manitol, evidenciada pela alcalinização do meio. O uso de polimixina-B foi sugerido por DONOVAN (1958), citado por MOSSSEL *et al.* (1967), para inibir a maioria das espécies não pertencentes ao gênero *Bacillus*. Assim é que, de acordo com seus autores, colônias planas, sem brilho, de bordas ligeiramente onduladas, com 3 a 6 mm de diâmetro, rodeadas de halo denso e branco de precipitação de lecitina contra fundo róseo arroxeado intenso do meio, são contadas como presumíveis unidades (células ou esporos) de *B. cereus*. Segundo VAN NETTEN & KRAMER (1992), é o meio mais usado nos Estados Unidos e em outros países filiados à ISO (International Standards Organization).
- b) Meio KG (KIM & GOEPFERT, 1971): o meio foi descrito para identificação presumtiva de *B. cereus* e espécies do grupo I do gênero *Bacillus*, com base na formação de zona de turbidez em volta das colônias, resultado da precipitação de lecitina. O uso de vermelho de fenol, no meio KG, serve apenas para acentuar a reação de lecitinase e, como no meio MYP, a polimixina B é o agente

seletivo. É, caracteristicamente, um meio pobre, sem carboidratos, que estimula a formação de esporos livres dentro de poucas horas, o que permite a observação antecipada de cristais protéicos em *B. thuringiensis* e, assim, sua diferenciação. Os autores do meio KG consideram o meio MYP ineficiente em eliminar microrganismos manitol-positivos porque permite o crescimento de grandes números de espécies fermentadoras de manitol, o que torna o meio amarelo, dificultando, ou mesmo impedindo, a visualização de colônias manitol-negativas. Além do meio seletivo KG, seus autores propuseram uma técnica sorológica rápida para confirmação de *B. cereus*, dependente da produção de endosporos livres dentro de 24 h (KIM & GOEPFERT, 1972).

c) Meio PEMBA ("polymyxin - pyruvate - egg yolk - mannitol - bromothymol blue agar"): formulado por HOLBROOK & ANDERSON (1980), é apresentado como meio seletivo e de diagnóstico que permite detectar e identificar com rapidez pequenos números de *B. cereus* em alimentos. A base para o reconhecimento das colônias, como no meio MYP, reside na incapacidade de *B. cereus* em fermentar manitol. A alcalinidade do meio PEMBA é revelada pelo indicador azul de bromotimol e o uso de piruvato tem como objetivos intensificar a reação de lecitinase, facilitar a esporulação e reduzir o espalhamento das colônias de *B. cereus*. A seletividade do meio PEMBA pode ser acentuada pela adição de actidiona, recomendada para alimentos suspeitos de elevada contaminação por fungos. HOLBROOK & ANDERSON (1980) reforçaram a restrição feita ao meio MYP por KIM & GOEPFERT (1971), e fizeram, por outro lado, críticas às fracas reações de lecitinase, observadas no meio KG. O meio PEMBA é de uso muito difundido no Reino Unido (VAN NETTEN & KRAMER, 1992).

Além desses meios de uso mais comum, outros têm sido mencionados e adotados. JINBO *et al.* (1978) desenvolveram um meio para enumeração de *B. cereus* em alimentos de origem animal, baseado no meio KG, adicionado de 0,3% de glicina e 0,4% de cloreto de sódio. Glicina apresenta, nesse meio, atividade inibitória contra *B. subtilis*, sem prejuízo do crescimento de *B. cereus*.

Tem merecido destaque o meio PEMPA ("polymyxin - pyruvate - egg yolk-mannitol - bromocresol purple agar"), desenvolvido por SZABO *et al.* (1984), como proposta de aperfeiçoamento do meio PEMBA. As freqüentes ocorrências de colônias atípicas e inconsistentes reações de lecitinase, observadas no meio de

HOLBROOK & ANDERSON (1980), levaram à substituição do indicador e à redução do tempo de incubação para 18 a 24 h, condições consideradas mais favoráveis ao reconhecimento e contagem das colônias de *B. cereus*.

RABINOVITCH & VASCONCELOS (1987) desenvolveram, no Brasil, um meio que permite o uso de menor concentração de polimixina-B, ou, mesmo, sua substituição por colistina (polimixina-E), com eventual adição de actidiona. O meio recebeu adição de zinco para acentuar a reação de lecitinase e apresenta uma vida útil de até três semanas, bem superior ao MYP, KG e PEMBA, cuja estocagem média, a 4°C, é de quatro dias. Também no Brasil, VASCONCELOS & RABINOVITCH (1995) desenvolveram uma fórmula seletiva mais econômica, que dispensa o uso de antibióticos. O meio, denominado VRM, inclui em sua formulação um indicador de oxidação-redução (resazurina) e gema de ovo, além de componentes que estimulam a reação fosfolipolítica e a esporulação. Com pH alto (8,2) o meio inibe ou retarda crescimento de outros microrganismos, entre os quais *B. megaterium*. A eficiência do meio VRM foi testada em 86 amostras de alimentos contaminados por *B. cereus*, permitindo contagens ligeiramente superiores às obtidas em MYP.

HOOD *et al.* (1990) propuseram um meio para isolamento, enumeração e pronta identificação de *B. cereus* e *Clostridium perfringens*, para uso em alimentos e fezes, em casos suspeitos de intoxicação alimentar. O meio é especialmente indicado para recuperação de células vegetativas injuriadas de *C. perfringens*, porém mostrou-se tão eficiente quanto os meios tradicionais, no isolamento de *B. cereus*.

Vários trabalhos dedicaram-se a comparar a eficiência de diferentes meios no isolamento seletivo de *B. cereus*. HARMON *et al.* (1984) observaram melhor diferenciação das colônias em MYP do que em PEMBA, já que, neste último, o espalhamento das colônias é maior e impede contagens superiores a 30 UFC; segundo estes autores, o meio MYP permite identificar *B. cereus* com menor número de testes adicionais. PETERZ *et al.* (1985) não detectaram diferença entre MYP, PEMBA e ágar-sangue não seletivo, analisando isolados de leite e alimentos desidratados. RUSUL & YAACOB (1995), fizeram sérias restrições ao meio PEMBA, criticando-o pela baixa seletividade no isolamento de 459 colônias presuntivas de *B. cereus*, das quais apenas 42,3% foram confirmadas.

2.2.2. Identificação de *B. cereus*

Os métodos e interpretações desenvolvidos por GORDON *et al.* (1973) e por COWAN & STEEL (1974), *apud* SHINAGAWA (1990), constituem a base para esquemas de identificação adotados por vários pesquisadores.

LANCETTE & HARMON (1980) conduziram um importante trabalho de identificação em amostras de *B. cereus* obtidas de alimentos, isoladas de colônias presuntivas em ágar MYP. Foi um estudo desenvolvido de forma cooperativa por 15 laboratórios patrocinados pelo Food and Drug Association (FDA), adotando metodologia de confirmação baseada nas provas bioquímicas contidas nos seguintes meios: caldo glicose – vermelho de fenol, caldo Voges-Proskauer (VP) modificado para *B. cereus*, ágar-tirosina e caldo lisozima. De 420 exemplares de *B. cereus*, apenas um não foi convenientemente confirmado, o que levou o grupo a recomendar a metodologia, que se tornou clássica na identificação do microrganismo. Posteriormente, nova avaliação, relatada por HARMON (1982), levou o grupo a recomendar metodologia para diferenciar membros do grupo de *B. cereus*: crescimento rizóide, atividade hemolítica em sangue de carneiro, motilidade em meio semi-sólido e produção de cristais paraesporais. Assim é que, segundo o FDA, confirmam-se colônias presuntivas de *B. cereus*, isoladas de meio MYP, pela verificação de produção anaeróbia de ácido a partir de glicose, redução de nitrato a nitrito, produção de acetilmetilcarbinol em caldo VP, decomposição de tirosina e crescimento em presença de 0,001% de lisozima. Ausência de crescimento rizóide e de cristais paraesporais, motilidade e atividade hemolítica são as características diferenciais da espécie (HARMON, 1984; KRAMER & GILBERT, 1989).

MASSON (1983) sugeriu um método de identificação simplificado que, diferente do FDA, utiliza o meio PEMBA para selecionar colônias típicas de *B. cereus* e, então, submetê-las a duas provas: produção de gelatinase e utilização de xilose (*B. cereus* hidrolisa gelatina e não degrada xilose).

SHINAGAWA (1990) adotou metodologia mais elaborada para estudar 82 cepas eméticas, 9 cepas diarreicas e 486 isolados de alimentos não envolvidos em surtos. *Op. cit.*, GORDON *et al.* (1973) e COWAN & STEEL (1974) haviam sugerido a expectativa de grande variabilidade no comportamento bioquímico das cepas.

Entretanto, o estudo conduzido revelou uniformidade nos resultados, especialmente nos testes de motilidade, utilização anaeróbia de glicose, produção de acetilmetilcarbinol e hidrólise de gelatina (100% das cepas, patogênicas ou não, exibiram resultados positivos). Foi observada absoluta predominância de resultados positivos nos testes de utilização de citrato e redução de nitrato.

Objetivando a rápida investigação de surtos, MURAKAMI *et al.* (1991) desenvolveram um método de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") simplificado, para detectar presença de *B. cereus* em alimentos contaminados, usando anticorpos policlonais capazes de reagir com antígenos flagelares de 23 estirpes.

2.3. INTOXICAÇÕES ALIMENTARES CAUSADAS POR *B. cereus*

A idéia de que os microrganismos exerçam seus efeitos patogênicos sobre homens e animais por meio da elaboração de substâncias tóxicas é quase tão antiga quanto a própria teoria de doenças de origem microbiana. ARBUTHNOTT (1978) faz menção a estudos conduzidos, no século passado, quando KLEBS (s.d.) sugeriu que "sepsinas" seriam responsáveis por lesões produzidas por estafilococos e KOCH (s.d.) definiu a cólera como uma "toxicose". Desde então, muito se desenvolveu o conhecimento sobre a capacidade de síntese de compostos tóxicos - prováveis mecanismos de sobrevivência dos microrganismos - causadores de sérios problemas à humanidade (SREENIVASAMURTHY, 1980).

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 e por sua associação epidemiológica com infecções ou intoxicações (TURNBULL *et al.*, 1979; KRAMER & GILBERT, 1989).

Em doenças de origem alimentar causadas por *B. cereus*, dois tipos de sintomatologia são conhecidos, um de natureza diarreica e outro vomitivo. Ambas as formas são atribuídas a toxinas produzidas pelo microrganismo. A toxina diarreica foi testada pela primeira vez na Noruega (HAUGE, 1950, 1955) e o tipo emético de intoxicação foi reconhecido pelo Public Health Laboratory Service, de Londres, em 1972 (RIVAS & RODRICKS, 1979). Desde as primeiras evidências de suas propriedades

enteropatogênicas, o microrganismo vem sendo considerado um dos mais importantes agentes etiológicos de doenças de origem alimentar (GRANUM, 1994, 1997).

Estudos com voluntários humanos, desenvolvidos ao final da década de 40, foram decisivos em associar *B. cereus* à etiologia de intoxicações diarreicas. Até essa época a taxonomia do gênero *Bacillus* era extremamente confusa, o que dificultava o diagnóstico dos surtos. SMITH *et al.* (1946), citados por GOEPFERT *et al.* (1972) e CLAUS & BERKELEY (1986), elaboraram a proposta que contribuiu para ordenar o gênero e caracterizar as espécies, permitindo melhor identificação do grupo de *B. cereus*. Assim, foi possível o reconhecimento do papel patogênico do microrganismo em intoxicações de origem alimentar, mediante meticulosa investigação de quatro surtos ocorridos na Noruega (HAUGE, 1950, 1955). Tais estudos merecem menção especial, não apenas por seu valor histórico como também pela invulgar condução da pesquisa: após observar quatro surtos semelhantes de gastroenterite, ocorridos em três hospitais, que afetaram 600 indivíduos - todos associados ao consumo de sobremesa preparada com antecedência de 24 horas ou mais - o pesquisador suspeitou de que um erro estaria sendo cometido ao confundir o agente causal com *Clostridium welchii* (*C. perfringens*). Como os quatro surtos eram bastante semelhantes, apenas um foi estudado e relatado detalhadamente pelo pesquisador. Exame direto ao microscópio revelou alta contaminação, com grandes bastonetes Gram positivos esporulados, em creme de baunilha, preparação suspeita comum a todos os surtos, e em especial no amido de milho, um de seus constituintes. Isolados em ágar-sangue, os microrganismos cresceram em aerobiose e anaerobiose, produzindo potentes hemolisinas e lecitinases e, com base no esquema proposto por SMITH *et al.* (1946), *op. cit.*, foram identificados como típicos exemplares de *B. cereus*. Microrganismos semelhantes foram encontrados, em pequenos números, nas fezes dos doentes, junto a grandes números de *C. perfringens* (HAUGE, 1950, 1955).

Tais evidências não foram suficientes para convencer a comunidade científica de que *B. cereus* era o microrganismo responsável pelos surtos. Para demonstrar a toxigenicidades dos isolados, HAUGE (1950,1955) inoculou creme de baunilha com 10^4 UFC/g, incubando-o aerobicamente durante 24 h. Após esse tempo o creme foi ingerido pelo pesquisador e, 13 horas mais tarde, os sintomas

começaram a se manifestar: fortes dores abdominais, seguidas de diarreia, perduraram por 8 h e cessaram espontaneamente. Durante a doença isolaram-se números baixos de *B. cereus* das fezes, exatamente como observado nos pacientes durante os surtos, e notou-se que o número de enterobactérias era, também, particularmente reduzido. Segundo JOHNSON (1984), com os poucos isolados obtidos das fezes foram conduzidos experimentos, em voluntários, os quais levaram a resultados semelhantes e eliminaram a possibilidade de doença psicossomática, associando definitivamente *B. cereus* à intoxicação diarreica.

A forma diarreica de intoxicação atribuída a *B. cereus* apresenta sintomas que se assemelham àqueles provocados pela intoxicação por *C. perfringens*. Quadro de diarreia e cólicas abdominais ocorre 8 a 16 h após consumo de alimento contaminado por grandes números de *B. cereus* (frequentemente mais de 10^5 células ou esporos/g). Náuseas podem acompanhar a diarreia, mas quase nunca ocorre vômito. Os sintomas persistem por, no máximo, 24 h, na maioria dos casos (GOEPFERT *et al.*, 1972; KRAMER & GILBERT, 1989).

GARCIA-ARRIBAS & KRAMER (1990) chamaram atenção para o fato de que aproximadamente 75% dos surtos diarreicos têm envolvido alimentos contendo ingredientes amiláceos. Entretanto, segundo LANGEVELD *et al.* (1996), a síndrome diarreica é mais comumente relacionada à ingestão de proteináceos. Na verdade, os alimentos envolvidos nesse tipo de surtos são muito variados, incluindo, além de carnes e produtos cárneos, vegetais, leite, molhos e sobremesas diversas, conforme atestam os relatos de diversos pesquisadores (GOEPFERT *et al.*, 1972; JOHNSON, 1984; KRAMER & GILBERT, 1989).

A forma emética de intoxicação por *B. cereus* foi reconhecida a partir de 1971, quando vários incidentes em diversos países - Austrália, Canadá, Inglaterra e Holanda - foram descritos, em associação ao consumo de arroz preparado à moda chinesa (KRAMER & GILBERT, 1989). A predominância de episódios envolvendo restaurantes chineses foi atribuída à prática de deixar o arroz cozido à temperatura ambiente por longos períodos de tempo - algumas horas, ou de um dia para o outro, ou por até três dias (MELLING *et al.*, 1976; TURNBULL, 1976; GILBERT, 1979). Na maioria dos incidentes eméticos tem sido observada alta contaminação nos alimentos, em níveis superiores a 10^6 UFC/g. Frequentemente, o microrganismo pode

ser isolado das fezes (RIVAS & RODRICKS, 1979; KRAMER & GILBERT, 1989; DROBNIIEWSKY, 1993).

A síndrome emética é descrita como um quadro em que os sintomas predominantes são náuseas e vômito, caracterizado por um curto período de incubação (1 a 5 h) e duração quase sempre inferior a 24 h. Em uma pequena porcentagem de episódios o período de incubação é excepcionalmente pequeno (15 a 30 min) ou maior do que 6 h (até 12 h). Dores abdominais são sintomas relativamente comuns, enquanto diarreia se manifesta em aproximadamente 30% dos casos. O padrão da doença mimetiza com precisão a intoxicação devida a *S. aureus* (GRANUM, 1994; 1997).

Comparada com a enterotoxina de *B. cereus*, muito há que se descobrir a respeito da toxina emética, uma vez que, até recentemente, a única forma de testar sua atividade era pela administração oral a macacos, em ensaios caros e de difícil execução, pelo fato de se tratar, basicamente, de toxina específica para primatas (SHINAGAWA, 1990; GRANUM, 1994).

RAJKOWSKY & MYKOLAJCIK (1987) mencionaram a possibilidade de que a importância de *B. cereus* como agente etiológico de surtos de intoxicações alimentares seja subestimada, em decorrência de dois fatores. Em primeiro lugar, porque os laboratórios não o procuram de forma rotineira. Em segundo lugar, a semelhança de sintomas com intoxicações produzidas por outros microrganismos pode levar, também, a diagnósticos equivocados, que mascaram a realidade. GRANUM (1997) atribuiu à curta duração das doenças e ao acometimento de pequenos números de pessoas, em ambientes domésticos, as deficiências nos registros de surtos, tanto na literatura como em estatísticas oficiais.

O Quadro 2.2, extraído de KRAMER & GILBERT (1989), resume dados clínicos e epidemiológicos comparativos entre intoxicações devidas a *B. cereus*, *C. perfringens* e *S. aureus*. Pela evidente semelhança entre as síndromes podem-se deduzir as dificuldades no reconhecimento do agente etiológico.

QUADRO 2.2 - Principais características das intoxicações por *B. cereus*, *C. perfringens* e *S. aureus*

Características	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>
		Síndrome diarreica	Síndrome emética	
Período de incubação (h)	8-22	8-16	1-5	2-6
Duração da doença (h)	12-24	12-14	6-24	6-24
Diarréia e cólicas abdominais	Predominantes	Predominantes	Relativamente comuns	Comuns
Náusea e vômitos	Raros	Ocasionais	Predominantes	Predominantes
Patogênese	Toxina ^a	Toxina ^b	Toxina ^c	Toxina ^c
Principais fontes alimentares	Carnes cozidas	Carnes, vegetais e sobremesas	Arroz e outros amiláceos	Carnes e produtos lácteos

a - toxina associada à esporulação, liberada no intestino delgado

b - toxina pré-formada no alimento ou produzida no intestino delgado

c - toxina pré-formada no alimento

2.4. ENTEROTOXINA PRODUZIDA POR *B. cereus* E SURTOS DE INTOXICAÇÃO DIARREICA

2.4.1. Natureza da toxina diarreica

Trabalhos de NIKODEMUSZ (1965, 1966, 1967) foram pioneiros em estabelecer a patogenicidade de *B. cereus* para cães e gatos, os quais desenvolveram diarréia severa e desidratação após a ingestão de alimentos contaminados com mais de 10^5 microrganismos/g (*apud* KRAMER & GILBERT, 1989). Resultados semelhantes foram observados por MELLING *et al.* (1976), que usaram concentrados de culturas em administração oral a macacos, provocando diarréia.

Em seguida às descobertas de HAUGE (1950, 1955), a enterotoxigenicidade de *B. cereus* foi atribuída a ação de lecitinasas, e só na década de 60 se admitiu a existência de outra entidade tóxica, responsável pelos quadros diarreicos (GORINA

et al., 1975). No início da década de 70, SPIRA & GOEPFERT (1972) confirmaram a existência da enterotoxina com base em ensaios com animais, injetando culturas do microrganismo em alças intestinais de coelho (LRIL – "ligated rabbit ileal loop"). O uso do teste já era consagrado para determinar patogenicidade de *V. cholerae*, *C. perfringens* e *E. coli*. Respostas positivas, associadas ao acúmulo de fluidos nas alças, foram observadas em 19 de 22 culturas de *B. cereus* e em quatro de seis culturas de *B. thuringiensis*. Posteriormente, os mesmos pesquisadores (SPIRA & GOEPFERT, 1975) incluíram ensaios de permeabilidade vascular (VPR – "vascular permeability reaction") e teste de injeção letal em camundongos (ML – "mouse lethality") efetuando um estudo que comprovou distinção entre enterotoxinas, fosfolipases e hemolisinas. Constatação semelhante já havia sido feita por JOHNSON & BONVENTRE (1967), ao observar que a atividade de fosfolipases de *B. cereus* não foi afetada após duas horas de exposição à tripsina. No estudo de SPIRA & GOEPFERT (1975) ficou evidente a instabilidade do fator tóxico a valores de pH fora da faixa entre 5 e 10 e a demonstração de que não era necessária a lise celular para liberação da enterotoxina.

TURNBULL (1976) apresentou evidências da existência de três entidades tóxicas em filtrados de culturas de *B. cereus*, a partir de cepas obtidas de alimentos e de uma cepa isolada de abscesso cerebral. Segundo o autor, identificaram-se duas enterotoxinas e uma toxina piogênica: a primeira toxina estimulava o sistema adenilatociclase-AMP cíclico, em células epiteliais do intestino de coelhos; a segunda era identificada como fator que causava acúmulo de fluidos em ensaios LRIL, sem ativar, aparentemente, o sistema adenilatociclase; a terceira toxina causava dano tissular à mucosa do íleo e foi produzida apenas pelo único isolado de abscesso cerebral.

Resultados obtidos por TURNBULL *et al.* (1979), levaram à descrição da toxina diarreica - ou fator de permeabilidade vascular (VPF) ou fator de acúmulo de fluido - como proteína simples, relativamente instável, de peso molecular aproximado de 50 kDa e ponto isoelétrico 4,9. Essa toxina, diferente de fosfolipases e hemolisinas, era produzida por quase todas as cepas de *B. cereus*, e possivelmente letal para camundongos quando em injeção endovenosa. Foram confirmadas conclusões anteriores de GLATZ *et al.* (1974), *op. cit.*, de que a atividade evidenciada pela VPR se correlacionava de forma notável com a acumulação de fluido em LRIL, o que

permitiu identificar o fator que produzia tais reações como a própria toxina diarreica. O efeito letal sobre camundongos, contudo, não foi observado com a mesma consistência de resultados. A natureza protéica da toxina foi sugerida a partir de observações de sua suscetibilidade a enzimas proteolíticas, labilidade térmica e instabilidade a pH em valores 2, 4 e 11.

JOHNSON (1984) relacionou diversas propriedades da toxina, reunindo resultados de diversos pesquisadores: é produzida durante a fase de crescimento exponencial, quando a faixa de pH se situa entre 6,0 e 8,5 (com produção ótima entre 7,0 e 7,5), é instável a tratamento térmico de 56°C/5 min, estável a 45°C/30 min e é sensível a tripsina e pronase.

SPIRA & GOEPFERT (1975) e TURNBULL (1976) haviam sugerido que a atividade de permeabilidade vascular (atividade VP), a toxicidade letal para camundongos e a enterotoxigenicidade poderiam ser propriedades de uma única toxina. Objetivando estabelecer a relação entre a atividade diarreica e outras atividades biológicas de *B. cereus*, SHINAGAWA *et al.* (1985) submeteram filtrados de culturas a ensaios com animais: LRIL, LMIL, VPR e ML. Todas as cepas provenientes de surtos diarreicos determinaram fortes reações de permeabilidade vascular em pele de coelho e causaram acúmulo de fluidos em alças intestinais, enquanto as cepas isoladas de episódios eméticos exibiram resultados evidentes de menor atividade. Somente nas cepas diarreicas foi observada significativa correlação entre atividade VP intensa e alta taxa de letalidade em camundongos, enquanto os filtrados de culturas de cepas eméticas apresentaram, geralmente, atividade VP fraca contraposta a alta atividade letal. Tal observação permitiu deduzir que toxinas com efeito letal para camundongos podem ser distintas entre cepas, e admitir a possibilidade de que cereolisinas (hemolisinas de *B. cereus*) seriam responsáveis pela morte dos animais. Essa dedução foi confirmada, em seguida, por KAMAT *et al.* (1987), ao separar duas toxinas presentes em filtrados que causaram morte a camundongos: uma hemolisina e uma glicoproteína não hemolítica. GARCIA-ARRIBAS *et al.* (1988) encontraram baixa correlação entre VPR e produção de hemolisinas.

A adequação de modelos animais para detectar a toxina diarreica foi estudada por TING & BANWART (1985), que compararam o uso de ratos e de coelhos, concluindo pela maior sensibilidade do teste LRIL. O uso de ratos não foi

descartado pelos autores, com a recomendação de que apenas animais com dez semanas, pelo menos, deveriam ser escolhidos para os ensaios. SHINAGAWA *et al.* (1991a) observaram que as alças intestinais de camundongos foram histologicamente afetadas pela indução do acúmulo de fluido, apresentando danos variáveis com as doses de toxina - desde edema até necrose epitelial, o que indicava efeito citotóxico e necrótico da enterotoxina. Estes autores recomendaram o ensaio de LMIL para detecção do VPF, considerando a ocorrência de acúmulo de líquido em 55 a 67% dos testes após 6 a 8 h da inoculação. Para exibir resultados semelhantes, o ensaio em coelhos demandava mais tempo e mais quantidade de toxina.

Considerando observações de vários pesquisadores, os quais demonstraram correlação entre citotoxicidade e positividade aos testes de permeabilidade vascular e LRIL, CHRISTIANSSON *et al.* (1989), por meio de ensaios em células HeLa ("human carcinoma, cervix"), VERO ("African green monkey kidney") e HEL ("human embryonic lung"), avaliaram a produção de toxinas por 136 isolados de leite. A maioria das cepas produziu reações de toxicidade para células HEL, simultaneamente à alteração da permeabilidade vascular em coelho. Com base nesses resultados, os autores propuseram que tanto a citotoxicidade como a alteração de permeabilidade podem ser indicativos da capacidade de produção de toxinas, por cepas de *B. cereus*. Segundo BUCHANAN & SCHULTZ (1992), diversos ensaios conduzidos em culturas celulares evidenciaram respostas citotônicas e citotóxicas da enterotoxina de *B. cereus*, similares às das toxinas de *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Para caracterizar a estabilidade de atividades biológicas e antigênicas do fator de permeabilidade vascular de *B. cereus*, SHINAGAWA *et al.* (1991c) purificaram parcialmente o fator produzido a partir de uma cepa isolada de surto diarreico. Tanto a atividade VP como a antigenicidade mantiveram-se estáveis na faixa de pH entre 6 e 8 e foram afetadas por digestão com tripsina e pepsina. Ambas foram diminuídas em mais de 50% quando o material foi tratada a 50°C por 5 minutos e foram destruídas a 56°C pelo mesmo tempo. Estocagem a 4°C reduziu a atividade VP após duas semanas, porém manteve-se praticamente inalterada após oito semanas a -20°C. Tais resultados levaram os autores a sugerir que a

antigenicidade do VPF viesse a ser aproveitada para testes rápidos de sua detecção.

Vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de isolar e caracterizar com precisão a enterotoxina, contudo ainda permanecem controvérsias a respeito da estrutura, tamanho e número de componentes do fator enterotóxico (LUND & GRANUM, 1996). Pelo menos duas diferentes enterotoxinas foram caracterizadas: uma é a toxina com três componentes, com atividade hemolítica e necrótica purificada por THOMPSON *et al.* (1984) e designada HBL por BEECHER *et al.* (1995), e a outra é a enterotoxina simples, estudada por SHINAGAWA *et al.* (1991b), cujo gene codificador foi detectado por AGATA *et al.* (1995a). Os diferentes resultados levaram à identificação da enterotoxina por meio de várias designações: fator de acúmulo de fluidos, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrotica, toxina letal para camundongos e fator citotóxico - são alguns desses nomes (BENNETT *et al.*, 1993).

Entre os primeiros estudos conduzidos com o objetivo de caracterizar a enterotoxina, estão os de THOMPSON *et al.* (1984), que isolaram material tóxico a partir de uma cepa obtida de um surto diarreico e submeteram-no a técnicas cromatográficas de separação. Três frações foram obtidas, de massas moleculares estimadas em 38, 39,5 e 43 kDa, respectivamente, das quais pelo menos duas se identificavam com atividades enterotóxicas. Uma das frações apresentou reações positivas em LRIL e VPR, toxicidade em células VERO e efeito letal em camundongos; as outras duas frações não provocaram morte em camundongos quando administradas isoladamente mas o fizeram quando combinadas, além de exibirem todos os efeitos tóxicos da primeira fração. Os autores relataram reações imunológicas cruzadas entre as três frações, o que foi posteriormente atribuído a contaminações entre frações, por GRANUM *et al.* (1993a).

BEECHER & MacMILLAN (1991) descreveram uma toxina que parecia idêntica à enterotoxina multicomposta descrita por THOMPSON *et al.* (1984), a que chamaram hemolisina BL (HBL). A toxina tripartida foi caracterizada, exibindo uma variedade de atividades biológicas compatíveis com efeitos hemolíticos, dermonecroticos e citotóxicos já observados em extratos de culturas de *B. cereus*. Os três componentes protéicos, designados B, L₁ e L₂, eram bastante semelhantes, apresentando massas moleculares de 37,5, 38,2 e 43,5 kDa, respectivamente.

Nenhum dos componentes exibiu, individualmente, atividade tóxica, mas a combinação dos três elementos estimulou reações positivas em cultivos celulares. A atividade enterotóxica da HBL foi estudada por BEECHER *et al.* (1995), com resultados que evidenciaram rápido acúmulo de fluido em LRIL, sendo as três proteínas necessárias para sua atividade máxima, o que confirmava, segundo estes autores, a especulação anterior de que a hemolisina BL seria o "complexo enterotóxico" descrito por THOMPSON *et al.* (1984), responsável pela diarreia causada por *B. cereus*.

Estudos desenvolvidos por SHINAGAWA *et al.* (1991b) objetivaram purificar e caracterizar o fator de permeabilidade vascular produzido por *B. cereus*, questionando a hipótese de enterotoxina composta de três partes. De acordo com os resultados obtidos, o VPF é uma entidade simples, de PM 45.000, que altera a permeabilidade vascular, exerce efeito tóxico letal em camundongos e causa acúmulo de fluidos em alças intestinais ligadas de coelhos e camundongos, sem apresentar atividade hemolítica nem fosfolipolítica. Assim, o VPF foi identificado como a enterotoxina responsável pela diarreia atribuída a *B. cereus*. Para reagir com essa enterotoxina, SHINAGAWA *et al.* (1991d) desenvolveram e testaram anticorpos monoclonais, estimulando, assim, o uso de métodos imunológicos na detecção e purificação do fator tóxico. Posteriormente, SHINAGAWA *et al.* (1992b) purificaram a enterotoxina por cromatografia de imunoafinidade, usando aqueles anticorpos. A toxina purificada mostrou atividade VP e ML, causando, também, acúmulo de fluidos em LMIL, mas não apresentou efeito hemolítico, o que levou à conclusão de que pelo menos algumas cepas produzem a toxina simples.

Contribuindo para a hipótese de que apenas um dos elementos, entre os que compõem o "complexo enterotóxico", é responsável pela diarreia atribuída a *B. cereus*, os estudos de BENNETT *et al.* (1993) dedicaram-se a caracterizar e identificar sorologicamente os três antígenos, designados por THOMPSON *et al.* (1984) como 575, 577 e 580. Preparações sem o antígeno 577 foram ministradas a macacos, por meio de sonda nasogástrica, e os animais não apresentaram diarreia, mesmo estando presentes os outros antígenos. Por outro lado, os macacos que receberam apenas o antígeno 577 manifestaram diarreia em, aproximadamente, 80 a 90% dos casos, o que levou à conclusão de que é esse antígeno a proteína simples que causa diarreia. Resultados semelhantes foram relatados por GRANUM &

NISSEN (1993), que purificaram três componentes protéicos de massas estimadas em 34, 40 e 48 kDa: o elemento de 34 kDa era hemolítico e praticamente idêntico à esfingomielinase, enquanto as outras duas proteínas não apresentaram atividade hemolítica. Apenas o elemento de 40 kDa era tóxico para células VERO, não se evidenciando qualquer atividade biológica para o componente de 48 kDa.

Mais recentemente tem sido sugerida a possibilidade de que *B. cereus* produza duas ou mais enterotoxinas. Estudos de GRANUM *et al.* (1996), desenvolvidos com 321 cepas isoladas de diversas fontes alimentares, provenientes de quatro países europeus, evidenciaram que 239 (74%) produziram citotoxinas em células VERO. Das 239, 53% apresentaram resultados positivos para o gene codificador de hemolisina BL, em PCR ("polymerase chain reaction"). Quando submetidas à detecção da enterotoxina, por meio do método imunoeletroforético de "western blots", 83% das cepas citotóxicas produziram antígenos que reagiram positivamente ao anticorpo usado. Foram examinadas, de forma mais acurada, sete cepas envolvidas em surtos diarreicos, com relação à presença de componentes da HBL, o que levou à conclusão de que cepas de *B. cereus* podem produzir até três enterotoxinas: um complexo com três componentes, com atividade necrótica e hemolítica (a HBL, descrita por BEECHER & MacMILLAN, 1991), uma enterotoxina simples (SHINAGAWA *et al.*, 1992b; AGATA *et al.*, 1995b) e um outro complexo enterotóxico, evidenciado nos resultados obtidos por "immunoblotting". Este complexo, desprovido de atividade hemolítica, foi caracterizado por LUND & GRANUM (1996), a partir de uma cepa envolvida em um grande surto ocorrido na Noruega em 1995. Neste estudo, foi necessário o conjunto das três proteínas, de massa molecular de 39, 45 e 105 kDa, para que se observasse a máxima toxicidade em células VERO, ainda que combinações binárias também apresentassem efeitos tóxicos. Segundo estes autores, os componentes B e L₂ não são essenciais à enterotoxigenicidade, ainda que o sejam à atividade hemolítica.

OMBUI *et al.* (1997) encontraram evidências de que o gene *BceT*, cuja sequência de nucleotídeos codifica uma enterotoxina de *B. cereus* (AGATA *et al.* 1995a), não é comum a todas as cepas enterotoxigênicas. Tal descoberta os levou a sugerir que pelo menos duas, talvez três enterotoxinas seriam responsáveis pela toxigênese diarreica de *B. cereus*.

2.4.2. Detecção da toxina diarreica

Para detecção da toxina diarreica, em alimentos ou em culturas do microrganismo, dispõe-se, atualmente, de dois kits comerciais, baseados em princípios de antigenicidade.

O primeiro é o BCET-RPLA (OXOID - TD 950), que utiliza técnica de aglutinação passiva reversa em látex e detecta, segundo seus fabricantes, 1ng/mL (BEECHER & WONG, 1994). O outro kit é o "*Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin – Visual Immunoassay" (BDE - VIA) da TECRA™ (Bioenterprises Pty. Ltd., Roseville, NSW, Australia), que utiliza o método de ELISA e foi desenvolvido por BURREL *et al.* (1991) para uso direto em amostras de alimentos, após simplificado procedimento de extração. O kit da TECRA detecta o antígeno 577, previamente descrito por THOMPSON *et al.* (1984), com limite mínimo de detecção entre 2 e 5 ng/mL.

O uso do BCET-RPLA vem sendo adotado desde o início da década de 90, como atestam os relatos de GRIFFITHS (1990) e VAN NETTEN *et al.* (1990), que registraram resultados positivos de produção de toxinas por cepas psicrotróficas isoladas de leite. Segundo BAKER & GRIFFITHS (1995), são necessárias altas contagens de *B. cereus* ($>10^7$ /mL) para que sejam sintetizados níveis de toxina detectáveis pelo kit.

BUCHANAN & SCHULTZ (1992) fizeram avaliação da eficiência do BCET-RPLA em relação a respostas biológicas obtidas em ensaios com células CHO ("chinese hamster ovary") e HEp-2 ("human epidermoid carcinoma, larynx"), sendo que a linha de células CHO, em que se observaram efeitos citotônicos, apresentou maior sensibilidade. Os resultados obtidos com o imunoensaio evidenciaram frequência de falso-negativos incompatível com a sensibilidade requerida para o método; por outro lado, registraram-se muitos resultados falso-positivos nos ensaios com culturas de células. Tais considerações justificaram a recomendação de confirmar resultados obtidos em imunoensaios, por meio de testes diretos de atividades biológicas. O estudo desenvolvido levantou questões acerca da especificidade do anticorpo usado no imunoensaio, que poderia estar reagindo, não com a enterotoxina, mas com um produto extracelular a ela associado.

Os muitos resultados falso-negativos observados por BUCHANAN & SCHULTZ (1992) poderiam ser explicados pela falta de especificidade dos ensaios em cultura de células, os quais reconheceriam, por sua vez, muitos falso-positivos, segundo SUTHERLAND (1993). Este autor recomendou o uso do RPLA, enquanto propôs estudos para correlacionar títulos, conforme obtidos no ensaio, com doses de toxina requeridas para induzir sintomas diarreicos.

Estudos para determinar a especificidade do kit RPLA foram desenvolvidos por GRANUM *et al.* (1993a), comparando seus resultados com avaliação paralela em método de "Western- immunoblot". A pesquisa foi conduzida em 85 isolados de produtos de laticínios, 59% dos quais se mostraram enterotoxigênicos. Outros 25 isolados de surtos foram também testados, com os quais se conduziu, também, ensaio de VPR. Os autores verificaram que 104, do total de 110 isolados testados, exibiram essencialmente os mesmos resultados nos métodos imunológicos. Entre os 25 isolados do segundo grupo, 84% eram, simultaneamente, positivos no RPLA e na técnica de "immunoblotting", e esses resultados correlacionaram-se bem com as reações de permeabilidade vascular. A contribuição dos estudos desse grupo foi além, ao testar a proteína de referência e o anticorpo nos quais o kit se baseia, trazendo esclarecimento e corroborando as suposições levantadas por THOMPSON *et al.* (1984). A técnica de "immunoblotting" revelou três bandas, correspondentes a três proteínas com cerca de 58, 50 e 40 kDa, produzidas por uma das cepas enterotoxigênicas utilizadas no estudo; o componente de 58 kDa era idêntico à proteína de referência (antígeno) do kit RPLA e o único a reagir com o anticorpo. Tais achados, aparentemente, confirmaram o que THOMPSON *et al.* (1984) haviam sugerido: a existência do complexo, em que apenas o componente de 50 kDa seria tóxico, enquanto a proteína de 58 kDa seria resistente à proteólise e a de 40 kDa não seria produzida em anaerobiose. No estudo de GRANUM *et al.* (1993a), entretanto, apareceu um quarto elemento, a que denominaram "top protein", de aproximadamente 100 kDa, que reagiu tanto com o anticorpo do RPLA como com o do "immunoblot". É uma proteína sem toxicidade para células VERO mas que, segundo os autores, não produz reações falso - positivas no RPLA, uma vez que só é produzida maciçamente por linhagens patogênicas.

FERMANIAN *et al.* (1996) também compararam resultados no RPLA com testes de citotoxicidade em células CHO, observando correlação entre os dois métodos

na detecção da enterotoxina. Não se registraram reações falsas, conforme salientaram os autores em defesa do método imunológico. Constataram-se as maiores atividades de toxina quando as culturas se encontravam na fase exponencial, o que comprova coincidência dessa fase com sua máxima produção.

O outro kit de imunoensaio disponível, o TECRA™ BDE-VIA, foi considerado superior ao RPLA, na detecção da enterotoxina, por NOTERMANS & TATINI (1993). Foi aprovado, também, por DUFRENNE *et al.* (1994), para detectar produção de enterotoxina por cepas psicotróficas, observando-se positividade em todas as cinco culturas de microrganismos que cresciam a 7°C.

Comparando os kits, CHRISTIANSSON (1993) percebeu que não detectam o mesmo antígeno e relatou limite de detecção da toxina, pelo kit TECRA, em 1 ng/mL. DAY *et al.* (1994) desenvolveram estudos simultâneos com os dois kits e um método de imunodifusão em gel. Os resultados obtidos deixaram claro que os dois kits não detectam o mesmo antígeno. Apenas culturas que exibiram vários antígenos no ensaio de imunodifusão mostraram coincidência de resultados, em RPLA e BDE. Por outro lado, as culturas negativas no RPLA e positivas no kit TECRA apresentaram um único antígeno, que formava linha de identidade com o antígeno padrão (a enterotoxina) na imunodifusão. Os autores reputaram o BDE mais confiável do que o RPLA e atribuíram o atraso na obtenção de antígenos altamente purificados à falta de progressos na produção e estudos das toxinas.

BEECHER & WONG (1994) dedicaram-se a identificar os antígenos detectados pelos dois kits. Segundo sua análise, o RPLA detectou o antígeno L₂ do complexo HBL, com a sensibilidade declarada pelos fabricantes (1 ng/mL), e o sistema TECRA reconheceu duas proteínas de massas 40 e 41 kDa, não tóxicas. Resultados obtidos no estudo evidenciaram que a confiabilidade dos kits depende de sua validação rigorosa.

BAKER & GRIFFITHS (1995) usaram o BDE-VIA para avaliar a estabilidade térmica da enterotoxina, já que estudos anteriores de BUCHANAN & SCHULTZ (1992), usando o BCET-RPLA, haviam detectado sua presença em material tratado a 80°C por 5 min e cuja atividade citotóxica já havia sido destruída. Isto significava que o epitopo detectado poderia ser mais resistente do que a própria toxina biologicamente ativa. BAKER & GRIFFITHS (1995) justificaram a escolha do kit TECRA

com a alegação de que seu anticorpo é uma antitoxina diarreica. Os resultados obtidos levaram à suposição de que sistemas complexos - como são os alimentos - podem estar associados a aumento de termoestabilidade da enterotoxina. A eficiência do kit TECRA não foi questionada pelos pesquisadores.

RUSUL & YAACOB (1995) compararam os dois kits, TECRA e RPLA, para verificar produção de toxina em 194 exemplares de *B. cereus* isolados de alimentos, observando 91,8% e 84,5% de respostas positivas, respectivamente. Ao todo, 155 cepas isoladas apresentaram resultados simultaneamente positivos, segundo os dois testes. Os pesquisadores confirmaram conclusões anteriores de GRANUM *et al.* (1993a), concluindo que o método de RPLA permite resultados confiáveis na detecção de enterotoxina de *B. cereus*, seja em alimentos ou em meios de cultura.

2.4.3. Produção e mecanismo de ação da toxina diarreica

A maioria dos surtos e casos de intoxicação diarreica por *B. cereus* tem sido relatada em associação com alimentos que apresentam contaminação em níveis de 10^5 a 10^8 microrganismos/g, segundo citações de KRAMER & GILBERT (1989) e SHINAGAWA (1990). Há, também, relatos que evidenciaram ou levantaram suspeitas de que alimentos com números sensivelmente menores tenham sido veículos em surtos desta forma de intoxicação (BECKER *et al.*, 1994).

O microrganismo cresce e produz toxinas em uma grande variedade de alimentos. Sua multiplicação foi observada em carne, feijões e purê de bananas, porém a maior produção da enterotoxina, avaliada em ensaio de ML, foi associada à carne (IVERS & POTTER, 1977). Condições que afetam a síntese foram estudadas por SPIRA & SILVERMAN (1979) e por SINGH & NARAYAN (1994). Tais estudos evidenciaram que a glicose é um nutriente essencial para que o microrganismo sintetize a enterotoxina, o que ocorre, preferencialmente, em valores de pH entre 7 e 7,5; baixos níveis de tensão de O_2 , também, favorecem a produção da toxina, que se apresenta maior no interior do alimento.

A produção da toxina é máxima quando o pH do meio se situa entre 8 e 8,5, mas é inibida por 1,5% de NaCl ou 1000 ppm de $NaNO_3$ (SHARMA & DOGRA, 1983). FERMANIAN *et al.* (1996) desenvolveram estudos usando RPLA e mostraram que a toxina é secretada essencialmente durante a fase de crescimento exponencial,

embora algumas cepas tenham apresentado maior produção tardiamente, no início da fase estacionária.

GARCIA-ARRIBAS & KRAMER (1990) relataram acentuada produção de toxina em meio suplementado com amido ou glicose. SUTHERLAND & LIMOND (1993) observaram que altas concentrações de glicose (≥ 50 g/L) reduziram ou eliminaram a produção da toxina, enquanto a adição de amido (até 50 g/L) a estimulou. ROWAN & ANDERSON (1997) observaram o efeito estimulatório de maltodextrina tanto sobre o crescimento do microrganismo como produção de enterotoxina, chamando atenção para a suplementação de fórmulas lácteas infantis, cuja contaminação por *B. cereus* pode levar a intoxicações diarreicas. Estes pesquisadores atribuíram a baixa incidência de intoxicações diarreicas, decorrentes do consumo de leite, à falta de glicose e aminoácidos livres em sua composição, o que inibiria a produção da enterotoxina.

HASSAN & NABBUT (1996) isolaram *B. cereus* de amostras de sangue, feridas e fezes de indivíduos com e sem diarreia, bem como de arroz, leite e solo. Os isolados de fezes das pessoas que apresentavam diarreia eram notoriamente mais toxigênicos, conforme comprovado em ensaios com animais. A enterotoxigenicidade, de maneira geral, tem sido observada na maioria das cepas pesquisadas em diversos estudos (BACHHIL & JAISWAL, 1988; SHINAGAWA, 1993; GRANUM *et al.*, 1996; OMBUI *et al.*, 1997). Observações de BUCHANAN & SCHULTZ (1992), levaram à suposição de que a capacidade de produzir a enterotoxina pode ser perdida em culturas sucessivas, representando um elemento genético instável.

Ainda que os registros de surtos sejam associados, em sua maioria, a alimentos contaminados com populações superiores a 10^6 UFC/g, não há menções à quantidade de alimento cuja ingestão causaria os sintomas de diarreia (RAEVUORI & GENIGEORGIS, 1975). A doença foi induzida, em camundongos, com suspensões contendo, pelo menos, 10^6 UFC/g, mas a quantidade de inóculo não foi precisada por HASSAN & NABBUT (1996). Para NOTERMANS *et al.* (1997), a dose de toxina (ou o número de microrganismos) presente em um alimento, capaz de produzir intoxicação, precisa ser melhor definida, já que as evidências epidemiológicas não são proporcionais aos altos níveis de contaminação observados em alimentos, em particular leite.

Têm sido levantadas dúvidas com respeito à forma como se desenvolve a intoxicação diarreica - se por ingestão de toxina formada no alimento ou por ingestão do microrganismo, sendo a toxina formada no próprio organismo. SINGH *et al.* (1984) relataram um caso excepcional, a partir do qual tais dúvidas se manifestaram. Estes autores relataram a presença de *B. cereus* em amostras de leite humano, coletado assepticamente de mulher cujo filho apresentava diarreia. A contagem era alta (5×10^4 UFC/g) e a natureza toxigênica dos isolados foi confirmada em ensaios com animais. Tendo-se descartado qualquer possibilidade de que a diarreia tivesse causa alérgica, concluiu-se que o leite teria sido contaminado por *B. cereus* a partir de uma infecção sistêmica da mãe - talvez mastite. Assim sendo, a criança não teria ingerido a toxina, porém grandes quantidades do microrganismo, por ocasião da amamentação. Isto conduziu à hipótese de que o microrganismo pode crescer e produzir enterotoxina no intestino.

O fato de ser difícil detectar a enterotoxina antes que a concentração de células alcance 10^{10} UFC/g, levou GRANUM *et al.* (1993b) ao mesmo questionamento: se a forma de intoxicação diarreica não seria causada pela ingestão de esporos e células, em vez de toxina pré-formada no alimento. Contribuiu para alimentar tais dúvidas o reconhecimento da sensibilidade da enterotoxina, que pode perder atividade em meio ácido e sob ação de enzimas proteolíticas. Tais observações levantaram dúvidas de que a enterotoxina resistisse ao pH do estômago e à ação do suco pancreático. O trabalho desenvolvido pelos pesquisadores apresentou evidência favorável à hipótese de produção de enterotoxina no íleo, pela verificação de que, em condições anaeróbias, o microrganismo cresceu e produziu toxina de forma comparável às condições aeróbias. Uma vez constatada expressiva variação entre concentrações de toxina produzidas por diferentes cepas, os autores sugeriram que apenas as grandes produtoras seriam capazes de causar intoxicações alimentares. Entretanto, algumas cepas observadas eram, ao mesmo tempo, grandes produtoras de toxinas e psicrotróficas, capazes de crescer entre 6 e 37°C, o que lhes permitia crescer no alimento e multiplicar-se no intestino delgado, aí produzindo toxina suficiente para causar a intoxicação.

SHINAGAWA (1993) relatou perda de atividade da enterotoxina em condições que se assemelham às do estômago e duodeno; assim, segundo o autor,

sua ingestão resulta em destruição por pH baixo e enzimas, confirmando a pequena probabilidade de que a toxina pré-formada induza à intoxicação diarreica. Entretanto, como todos os estudos de estabilidade da toxina têm sido feitos em sistemas diferentes de alimentos, existe a possibilidade de que, sob a proteção do veículo alimentar, a resistência da toxina seja acentuada. BAKER & GRIFFITHS (1995) apresentaram evidências de que a estabilidade é favorecida em leite.

Relatos recentes foram feitos, na Noruega, de surtos de diarreia com características excepcionalmente graves, atribuídos a *B. cereus* (GRANUM, 1994). Em um deles, várias pessoas foram afetadas após o consumo de preparação à base de carne e vegetais cozidos. A dose infectante foi estimada em, aproximadamente, 10^4 microrganismos/g de alimento. O incidente levou à hospitalização de três pessoas - uma das quais esteve internada por três semanas. Nesse surto, o período de incubação foi muito grande, superior a 24 h, de forma incompatível com o que ocorre quando a toxina é pré-formada. Foram observados indícios de que pelo menos algumas cepas podem colonizar o intestino e produzir toxina *in situ*.

Segundo conclusões de GRANUM *et al.* (1993b), é preciso considerar que, devido à possível diversidade de fatores enterotóxicos, as intoxicações diarreicas atribuídas a *B. cereus* podem ocorrer sob duas formas: no primeiro caso, o microrganismo seria responsável por uma intoxicação típica, determinada pela ingestão de toxina produzida no alimento; no outro caso, a ingestão de esporos ou de células, presentes no alimento, levaria à colonização do intestino, seguida de produção da enterotoxina, o que provocaria o quadro clínico.

Mais recentemente, GRANUM (1997) apresentou os seguintes argumentos contra a hipótese de intoxicação a partir da toxina pré-formada: o período de incubação é muito longo; estudos em modelos animais (não publicados) revelaram que a enterotoxina é degradada no trato gastrointestinal; os níveis de contaminação necessários à produção de grandes quantidades de toxina determinam a deterioração e, em consequência, o descarte dos alimentos.

Para ROWAN & ANDERSON (1997) não há ainda evidências suficientes para se estabelecer de forma conclusiva como ocorre a intoxicação diarreica.

As dúvidas persistem, acerca da patogenia das intoxicações diarreicas por *B. cereus*, uma vez que a natureza do fator tóxico não está totalmente elucidada.

Sabe-se muito pouco sobre o mecanismo de ação da toxina. KRAMER & GILBERT (1989) relacionaram os seguintes efeitos da toxina diarreica no intestino: reverte a absorção de fluidos e íons (Na^+ e Cl^-), dificulta a absorção de glicose e aminoácidos, além de causar necrose e danos à mucosa. Segundo SEARS & KAPER (1996), os dados que relacionam a enterotoxina à estimulação do sistema adenilatociclase-AMP-cíclico são passíveis de questionamento, razão porque consideram mais convenientemente denominá-la "citotoxina secretória" em vez de enterotoxina, em vista da resposta necrótica observada no intestino de animais. Segundo GRANUM (1997), é uma toxina pelo menos 100 vezes mais potente que a de *C. perfringens*, não depende de Ca^{2+} e determina sintomas mais severos em jovens, com menos de 19 anos, ou em pessoas com mais de 60 anos.

2.4.4. Surto de intoxicação diarreica por *B. cereus*

A literatura européia do início deste século registra vários relatos de intoxicações alimentares causadas por microrganismos que se enquadram na descrição de *B. cereus*. Um dos primeiros episódios, observado por LUBENAU (1906), envolveu 300 pacientes e funcionários de um hospital, com sintomas de gastroenterite aguda após consumo de almôndegas com alta contaminação por bactérias aeróbias esporuladas, conforme citação de KRAMER & GILBERT (1989). Em obras citadas por esses mesmos autores, SEITZ (1913) relatou o isolamento, em contagens expressivas, de microrganismos semelhantes a *B. cereus*, a partir das fezes de um adulto com diarreia, e BREKENFELD (1926, 1929) atribuiu a um "bacilo esporogênico aeróbio" a causa de dois episódios de diarreia, ocorridos após consumo de creme de baunilha e prato de carne. Um estudo do Stockholm Board of Health, de 1943, atribuiu a *Bacillus* spp. 117 de 367 casos de gastroenterites ocorridos entre os anos de 1936 e 1943, na Suécia (KRAMER & GILBERT, 1989).

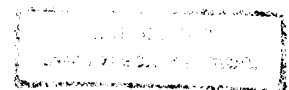
SHINAGAWA (1990) assinalou a ocorrência de, pelo menos, 230 surtos diarreicos, no mundo, entre 1950 e 1976. Os alimentos envolvidos nesses surtos muitas vezes permaneceram indefinidos, ainda que carnes e lanches pré-elaborados tenham sido mais freqüentemente suspeitos.

Nos Estados Unidos o primeiro surto diarreico bem documentado ocorreu em 1969 (MIDURA *et al.*, 1970). Entre 1966 e 1975, sete surtos diarreicos atribuídos a *B. cereus* foram comunicados ao Center for Disease Control (CDC), os quais afetaram um total de 98 pessoas (TERRANOVA & BLAKE, 1978). Em 1977, um surto envolvendo 28 pacientes de um hospital de doenças crônicas, bem caracterizado por GIANELLA & BRASILE (1979), foi associado ao consumo de carne de peru contaminada com $1,2 \times 10^3$ *B. cereus*/g, contrastando com números bem maiores, entre 10^6 e 10^8 , encontrados na maioria dos surtos até então descritos (GILBERT & PARRY, 1977). Em 1978, um episódio envolvendo 209 pessoas aconteceu em Carolina do Norte e outro, em Nova York, resultou em 118 casos. Apesar desses grandes surtos, intoxicações por *B. cereus*, nos Estados Unidos, são relativamente infreqüentes ou despercebidas: entre 1972 e 1982, *B. cereus* foi responsável por apenas 2,9% do total de surtos de doenças de origem alimentar nesse país, enquanto no Canadá e na Holanda, mais ou menos à mesma época, o microrganismo foi incriminado em 7,3% e 22,4% dos surtos notificados, respectivamente (KRAMER e GILBERT, 1989).

Durante as décadas de 50 e 60 vários surtos diarreicos foram relatados, a maioria no norte e leste europeu: Dinamarca, Itália, Suécia, Hungria, Polônia, Rússia, Alemanha, Noruega e Holanda. Na Hungria, durante os anos 60, foi a 3ª causa mais comum de intoxicações alimentares, sendo salsichas e carnes em geral os alimentos mais incriminados, provavelmente devido a condimentos contaminados (GILBERT, 1979).

Em países da Europa que mantêm ativos sistemas de vigilância sanitária e que incluem testes de identificação de *B. cereus* ao diagnosticar agentes de surtos, o microrganismo representa uma das principais causas de doenças de origem alimentar. Entre 1985 e 1989, os surtos na Holanda eram, em 18% dos casos, devidos a *B. cereus* (BECKER *et al.*, 1994). Segundo relato de SIMONE *et al.* (1997), foi o microrganismo responsável pelo maior número de incidentes de etiologia conhecida, naquele país, entre 1991 e 1994.

Os dados relativos a intoxicações alimentares atribuídas a *B. cereus*, no Brasil, são escassos, porém permitem deduzir sua importância epidemiológica. SALZBERG *et al.* (1982) suspeitaram do microrganismo na etiologia de um surto de diarreia registrada em dois restaurantes institucionais na cidade de Campinas.



Levantamento publicado por MARTINS-VIEIRA *et al.* (1995), referentes ao período de 1992 a 1994, revelaram dificuldades encontradas em identificar o agente causal de 68 surtos notificados no estado de Minas Gerais, fato que pode esclarecer porque apenas 2,5% dos episódios foram atribuídos a *B. cereus*. PASSOS & KUAYE (1996) apresentaram resultados de investigação da Vigilância Sanitária Municipal de Campinas, segundo a qual, de 19 surtos comprovados, entre 1987 e 1993, *B. cereus* foi incriminado em 68,4%.

2.5. TOXINA TERMOESTÁVEL DE *B. cereus* E SURTOS DE INTOXICAÇÃO EMÉTICA

2.5.1. Natureza do fator emético

Entre as primeiras pesquisas para estudar a patogenia da forma emética de intoxicação estão as que foram desenvolvidas sob os auspícios do Central Public Health Laboratory, de Londres. MELLING *et al.* (1976) observaram que filtrados de cultura de uma cepa isolada de surto emético não causava acúmulo de fluido em LRIL. Era a primeira evidência de que uma toxina diferente da diarreica estava envolvida na doença emética causada por *B. cereus*. Resultados obtidos por TURNBULL (1976) evidenciaram que os ensaios em LRIL e VPR não se aplicavam ao novo fator.

A quase absoluta associação da intoxicação a preparações de arroz levou MELLING *et al.* (1976) a estudar a especificidade do alimento como meio de crescimento e produção de toxinas por cepas eméticas. Tal fato foi demonstrado quando concentrados, provenientes de culturas em arroz e em outros meios, eram usados para administração oral a macacos: o vômito era induzido apenas quando os animais recebiam concentrados das culturas em arroz, o que sugeria a produção de toxina dependente de algum fator do meio.

MELLING & CAPEL (1978) relataram resistência da toxina à autoclavagem a 121°C por 90 min, a extremos de pH 2 e 11 e à exposição a tripsina e pepsina. Perceberam, também, que macacos submetidos aos testes - até 16 vezes durante oito meses - não desenvolveram resistência à toxina, o que sugeriu sua baixa antigenicidade. TURNBULL *et al.* (1979) distinguiram a toxina emética com base em sua grande estabilidade em relação a altas temperaturas, a enzimas proteolíticas e a variações de pH. O fator tóxico não foi retido em filtros de membrana, o que

permitiu avaliar seu baixo peso molecular, menor do que 5000. Estes autores propuseram uma descrição do fator que causava vômito em macacos como 'toxina termorresistente, de baixo peso molecular, provavelmente não protéica, elaborada durante o crescimento de algumas cepas de *B. cereus* em arroz'.

Dadas as óbvias restrições ao uso de macacos para estudos da toxina emética, sua natureza permaneceu incógnita até muito recentemente. Foram os estudos de HUGHES *et al.* (1988) e de SZABO *et al.* (1991), desenvolvidos para demonstrar a forma como células são afetadas pela toxina emética, que levaram AGATA *et al.* (1994) a purificar e analisar estruturalmente o fator suspeito, a partir de uma cepa originalmente isolada de um indivíduo acometido de intoxicação. Métodos de espectroscopia de massa, de ressonância magnética nuclear e de degradação química revelaram um dodecadepsipeptídeo, a que denominaram "cereulídeo", de fórmula molecular $C_{57}H_{96}O_{18}N_6$. Sua estrutura assemelha-se à da valomicina, um antibiótico com propriedades de se ligar a íons K^+ e Rb^+ e que atua, biologicamente, como carreador de potássio. Resultados de MIKAMI *et al.* (1994) caracterizaram o fator estudado como toxina de efeito citostático, não hemolítica, de massa estimada menor do que 5000 Da e resistente à autoclavagem a $121^{\circ}C$ por 20 min, em absoluta concordância com propriedades já conhecidas da toxina emética. Posteriormente, SUWAN *et al.* (1995) confirmaram o cereulídeo como a própria toxina emética, descrevendo-o como um depsipeptídeo com 36 aminoácidos ou oxiácidos.

SHINAGAWA *et al.* (1995) estudaram a correlação entre o cereulídeo e o fator citostático parcialmente purificado, caracterizando-os paralelamente e testando sua atividade emética pela administração oral a macacos. Os resultados indicaram absoluta correlação entre o cereulídeo e o fator tóxico para células, bem como identidade com propriedades exibidas, em estudos anteriores, pela toxina bruta (MELLING *et al.*, 1976).

2.5.2. Detecção da toxina emética

As limitações representadas pelos ensaios conduzidos em macacos - baixas sensibilidade, reprodutibilidade e viabilidade - levaram à busca de métodos alternativos para detectar a toxina emética, independentemente, mesmo, do

conhecimento de sua natureza. As culturas de tecidos tornaram-se a opção mais promissora, uma vez que a baixa antigenicidade exibida pela toxina reduzia a expectativa em relação a imunoensaios. HUGHES *et al.* (1988) apresentaram o primeiro relato do uso de células, descrevendo os efeitos de filtrados de culturas sobre células HEp-2. Foram testados 26 exemplares de *B. cereus*, dos quais 15 provinham de surtos eméticos, e cinco outros exemplares de *Bacillus* spp. Das cepas eméticas, 87% exibiram resultados positivos, expressos pela capacidade de formar vacúolos nas células HEp-2, contra apenas 45% das 11 cepas não envolvidas em surtos. Nenhuma das cinco outras cepas de *Bacillus* respondeu positivamente ao teste. O teste mostrou-se eficaz, também, para detectar o fator emético em amostras de alimentos envolvidos em surtos.

SZABO *et al.* (1991) ampliaram os estudos de HUGHES *et al.* (1988), testando uma coleção de 67 isolados, oito dos quais implicados em episódios eméticos. Foram usadas sete diferentes linhas de células. As que apresentaram maior sensibilidade foram Int 407 ("embryonic intestine"), CHO e HEp-2, salientando-se que a primeira exibia melhor formação de vacúolos nas diluições mais altas. A toxina emética afetou as células provocando efeito citostático e várias outras alterações, além da formação de vacúolos: granulação, arredondamento e produção de ácido. A alta correlação entre formação de vacúolos e a indução de vômito em macacos levou à recomendação dos ensaios em culturas de células para detectar toxinas em alimentos e avaliar o potencial toxigênico de microrganismos. Segundo observações feitas no decorrer do estudo, a produção de toxina parecia começar ao final da fase de crescimento exponencial. Em culturas aeradas, detectou-se essa produção até a 15°C. O PM da toxina foi avaliado, por cromatografia, em 14.000, porém os autores admitiram que esse valor fora superestimado.

SHINAGAWA *et al.* (1992a) avaliaram um total de 124 cepas de *B. cereus* isoladas de 48 surtos ocorridos entre 1973 e 1989, das quais 110 provinham de 34 surtos eméticos. O grupo optou pela linha de células HEp-2 para estudar a produção do fator de formação de vacúolos (VF) em vários substratos, bem como verificar possível correlação entre a atividade VF e a atividade emética, em filtrados de culturas do microrganismo. A produção do fator tóxico foi maior em meio de arroz, parecendo a forma líquida do meio mais adequada do que a sólida. Culturas em outros substratos não apresentaram resposta VF. Entre as cepas provenientes de

surtos eméticos observaram-se 61,8% positivas no ensaio citológico, enquanto a resposta VF das cepas isoladas de surtos diarreicos foi sempre negativa. Foram levantadas sérias dúvidas acerca de ser o VF responsável pelo efeito emético, em vista do grande número de resultados negativos (38,2%) entre cepas associadas a surtos deste tipo. A estabilidade do VF permaneceu inalterada após tratamento térmico a 121°C/10min, estocagem a 4°C por 2 meses, exposição a pH 2 e 11 e digestão com tripsina e pepsina (2 mg/mL). O sorotipo H-1 era predominante entre as cepas eméticas (76 em 110), 73,7% das quais produziram atividade VF, contra 46,7% das cepas H-8, a segunda mais comum. Resultados observados nas culturas em meio de arroz permitiram sugerir que a produção de toxina ocorresse após a formação de esporos: a resposta VF era produzida após incubação durante 10 a 60 h, alcançando seu valor máximo após 30 h.

MIKAMI *et al.* (1994) propuseram um método colorimétrico de detecção da toxina, cujo efeito citostático fora observado por SZABO *et al.* (1991), aplicável a amostras de alimentos. A produção de ácidos, induzida pela toxina em células HEp-2, mudava a cor do meio e podia ser avaliada por medida de absorbância a 545 nm. Foram examinados 310 isolados, 16 dos quais mostraram-se produtores do fator citostático (todos pertencentes ao sorotipo H-1), cuja atividade não foi afetada a 121°C por 20 minutos nem por pH 2 ou 11 nem por exposição a enzimas proteolíticas. Tais constatações permitiram supor que a toxina citostática era, de fato, a toxina emética. Não se observou, por outro lado, atividade hemolítica nos filtrados. Nesse estudo ficou bem evidenciada a predominância numérica de cepas diarreicas sobre eméticas: 73,5% dos isolados produziram enterotoxina, enquanto apenas 5,2% produziram a toxina citostática.

Um novo modelo animal, apropriado a estudos de drogas e toxinas com efeito emético, foi usado por AGATA *et al.* (1995b) - *Suncus murinus*, um insetívoro que apresenta alguma semelhança com o camundongo. O vômito foi induzido, nos animais, decorrente da administração do cereulídeo isolado por AGATA *et al.* (1994), tanto por via oral como intraperitoneal, sem que nenhum dos 43 animais testados morresse. Assim, com o novo animal, os pesquisadores da toxina emética passaram a dispor de uma alternativa econômica e de fácil manejo, que deve ampliar as oportunidades de investigação.

2.5.3. Produção e mecanismo de ação da toxina emética

As pesquisas, durante quase toda a década de 70, limitaram-se, quase exclusivamente, a observações da produção da toxina emética em meio de arroz. Relatos posteriores permitiram concluir que essa produção não se fazia exclusivamente nesse alimento, ainda que fosse o predominante nos surtos (HOLMES *et al.*, 1981; JOHNSON, 1984). Uma vez que o nível de contaminação necessário à produção de toxina suficiente para produzir vômito causa deterioração perceptível das preparações de arroz (KRAMER & GILBERT, 1989), o descarte do alimento previne grande parte dos surtos, já que, neste caso, só a toxina pré-formada determina a ocorrência da intoxicação.

Condição satisfatória para a produção da toxina emética em arroz, observada por SZABO *et al.* (1991), foi a manutenção do substrato na faixa de 25 a 30°C, por 18 h. A temperaturas maiores o crescimento vegetativo ocorre, mas a produção de toxina é reduzida (MELLING & CAPEL, 1978). Segundo SEARS & KAPER (1996), as condições para a produção da toxina emética ainda são pouco conhecidas, o que deverá se modificar a partir das descobertas feitas recentemente.

GRANUM *et al.* (1995) apresentaram descrição da toxina emética, baseada em diversos estudos que detectaram sua produção, no alimento, ao final da fase de crescimento exponencial do microrganismo e início da fase estacionária. Sugeriram a possibilidade de que o microrganismo libere a toxina emética como forma de degradar produtos do meio em que cresce. Na mesma obra os autores propuseram um sistema para classificação de toxinas associadas a doenças de origem alimentar, situando a toxina emética de *B. cereus* como 'neurotoxina sem sítio de ação conhecido'. Segundo SEARS & KAPER (1996), as neurotoxinas atuam em neurotransmissores, nesse caso ocasionando a resposta emética.

Progressos no estudo do mecanismo de ação da toxina emética foram apresentados por AGATA *et al.* (1995b). A partir do conhecimento de que vários antagonistas dos receptores de serotonina (5-HT₃) têm sido usados para inibir vômito provocado por agentes quimioterápicos de tratamento ao câncer, deduziram que o mecanismo emético observado pudesse ser mediado, também, por tais receptores. Quando a vagotomia e a inibição dos receptores, na pesquisa,

aboliram o efeito emético, os autores concluíram que o cereulídeo causa vômito por meio de estímulo dos receptores 5-HT₃ e de estimulação do nervo vago aferente. O cereulídeo causou alterações em mitocôndrias de células HEP-2, confirmando sua ação citotóxica. A dose capaz de causar vômito em 50% dos animais testados (ED₅₀) foi definida como 12,9 µg/kg de massa corporal. Para que a valinomicina, estruturalmente semelhante ao cereulídeo, exercesse o mesmo efeito, foram requeridas doses muito maiores (50 vezes ou mais), o que foi atribuído a diferenças entre afinidades com os receptores, na superfície celular.

2.5.4. Surto de intoxicação emética

Os primeiros casos de intoxicação emética foram registrados pelo Public Health Laboratory Services, no Reino Unido, quando em cinco ocasiões - entre agosto e novembro de 1971 - 13 pessoas adoeceram com sintomas de intoxicação caracterizada por náusea e vômitos, duas a cinco horas depois de terem comido arroz preparado em restaurante chinês. Amostras dos alimentos incriminados apresentaram grande contaminação por *B. cereus*, considerado agente causador daqueles surtos de sintomatologia atípica (MORTIMER & McCANN, 1974). Após aqueles episódios sucedeu-se uma série de outros 192, entre 1972 e 1984, envolvendo mais de 1.000 pessoas, quase sempre no verão; aproximadamente 95% dos casos eram associados a preparações de arroz à moda chinesa (KRAMER & GILBERT, 1989). A forma emética de intoxicação tem sido predominante, no Reino Unido, sempre em associação a arroz, cozido ou frito (SHINAGAWA, 1993). O arroz frito foi descrito por GILBERT *et al.* (1974) como uma preparação à base de arroz cozido, deixado a secar por 12 h ou mais à temperatura ambiente, e em seguida refogado rapidamente, em mistura com ovos, vegetais e condimentos.

RAEVUORI *et al.* (1976) estudaram um surto, na Finlândia, em que 18 pessoas adoeceram com sintomas predominantes de náusea e vômito, encontrando alta contaminação por *B. cereus* em amostras de arroz e de carne consumidos. VAN NETTEN *et al.* (1990), relataram um surto na Espanha e dois na Holanda, devidos a estirpes psicotróficas, envolvendo consumo de bacalhau, torta de vegetais e leite, respectivamente.

Os primeiros surtos de intoxicações eméticas, nos Estados Unidos, foram notificados ao CDC entre 1974 e 1975, envolvendo um total de 35 pessoas, sendo

dois associados a consumo de arroz e outro a consumo de carne ou vegetais (TERRANOVA & BLAKE, 1978). Outro surto foi registrado por HOLMES *et al.* (1981), ocasionado por ingestão de prato elaborado com macarrão e queijo. SNYDER & POLAND (1991) citaram estimativas da ordem de 84.000 casos anuais de intoxicações por *B. cereus*, nos Estados Unidos, abrangendo formas diarreicas e eméticas.

No Canadá o primeiro surto emético foi relatado por LEBFREVE *et al.* (citados por KRAMER & GILBERT, 1989), em 1973, após o que a síndrome passou a ser mencionada em publicações periódicas do Foodborne Disease Reporting Centre. Entre 1975 e 1984, 107 incidentes foram atribuídos a *B. cereus*, um dos quatro principais agentes etiológicos de doenças de origem alimentar no país; a maioria dos surtos esteve associada a preparações de arroz (TODD, 1992), o que permite inferir a predominância da forma emética de intoxicação.

Na Austrália, levantamento de dados epidemiológicos publicado por DAVEY (1985) revelou que 23% dos surtos se associavam ao consumo de arroz em restaurantes asiáticos e à forma emética de intoxicação por *B. cereus*. O autor sugere que a forma emética seria mais relatada às autoridades em virtude da rapidez de aparecimento e do desconforto dos sintomas. Outros autores, entretanto, consideram esta forma subestimada justamente em decorrência dos curtos períodos de incubação e de duração da doença (TERRANOVA & BLAKE, 1978; KRAMER & GILBERT, 1989).

Segundo SHINAGAWA (1990), de 73 surtos de intoxicação por *B. cereus* ocorridos no Japão entre 1982 e 1986, aproximadamente 95% foram do tipo emético; a maior incidência aconteceu nos meses de verão, sendo 73% devidos ao consumo de arroz, 16% a macarrão e 11% a outros alimentos. Levantamentos recentes indicaram a ocorrência anual de 6 a 18 surtos de intoxicações por *B. cereus*, até 1991, ano em que se registrou um dos maiores números de casos (2.364), a maioria de tipo emético; alguns desses surtos têm sido atribuídos a leite pasteurizado (SHINAGAWA, 1993).

2.6. OCORRÊNCIA E INCIDÊNCIA DE *B. cereus* EM ALIMENTOS

Tanto esporos como células vegetativas de *B. cereus* são habitantes freqüentes de uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, sedimentos, poeira, água, plantas e muitos tipos de alimentos, notoriamente cereais e derivados, leite e laticínios, condimentos, carnes e vegetais (GOEPFERT *et al.*, 1972; GILBERT, 1979; JOHNSON, 1984). Como consequência dessa distribuição ubíqua e devido à sua rápida capacidade de esporulação, *B. cereus* sobrevive bem nos ambiente e na passagem pelo intestino (NOTERMANS *et al.*, 1997).

A verificação da presença do microrganismos em alimentos tem sido conduzida por diversos autores, a exemplo de NYGREN (1962), citado por KRAMER & GILBERT (1989), cuja pesquisa em 3.888 amostras revelou a contaminação de 51,6% de ingredientes, 43,8% de sobremesas e 52,2% de produtos de carne e vegetais.

O levantamento conduzido por CANTONI & BRESCIANI (1987), em 614 amostras, evidenciou incidência baixa (≤ 500 UFC/g), com freqüências máximas encontradas em queijo e condimentos (10% das amostras) e hortaliças (14% das amostras examinadas). Os autores chamaram a atenção, contudo, para a dificuldade em detectar números baixos por métodos de contagem em placas, o que pode justificar a baixa freqüência observada. IACONA *et al.* (1987) pesquisaram a ocorrência de *B. cereus* em 250 amostras pertencentes a cinco classes de alimentos, encontrando o microrganismo em todas as classes, em contagens de até 10^5 UFC/g. VAN NETTEN *et al.* (1990) pesquisaram 1.700 amostras pertencentes a 16 classes de alimentos, encontrando *B. cereus* em 15 classes, com freqüência variável entre 1 e 42%, e incidência, em geral baixa, entre 10^1 e 10^2 UFC/g.

Na Holanda, GIFFEL *et al.* (1996) examinaram 229 amostras, incluindo leite e laticínios, farinha de trigo, comida chinesa, carnes e condimentos, relatando contaminação em 48% das amostras, que continham entre 10^2 e 10^6 UFC/g.

Entre os levantamentos feitos no Brasil destaca-se o de RABINOVITCH *et al.* (1985), que isolaram *B. cereus* de alimentos provenientes de 18 grupos, industrializados ou não, crus ou cozidos, em contagens entre 10^2 e 6×10^3 UFC/g. Entre esses alimentos citam-se carnes, vegetais, leite pasteurizado tipo B, leite em

pó, leite fermentado, pós para preparo de sopas e de refrescos, temperos, molhos, salgadinhos e chocolate em pó.

Em leite e produtos lácteos a presença do microrganismo tem sido observada rotineiramente, sendo considerada um dos grandes problemas da indústria de laticínios (ANDERSSON *et al.*, 1995). Segundo HOLMES *et al.* (1981), leite em pó foi a fonte de *B. cereus* para um surto emético descrito nos Estados Unidos. AHMED *et al.* (1983) relataram, em Taiwan, a contaminação de 48% de amostras de sorvete. Também na China, WONG *et al.* (1988a) examinaram 293 produtos de laticínios, observando que 52% das amostras de sorvete e 29% de leite em pó apresentavam contaminação por *B. cereus*, com populações médias entre 15 e 280 UFC/g. KAMAT *et al.* (1989) encontraram *B. cereus* em todas as amostras de leite pasteurizado, leite em pó e produtos lácteos, e em 87% das amostras de sorvete. Nesses produtos, adquiridos em mercados de Bombaim, as contagens variaram entre 10^3 e 10^5 UFC/g. PILLAI *et al.* (1993) encontraram *B. cereus* em 9 de 75 amostras de "lassi", um tipo de coalhada doce, comum na Índia. BECKER *et al.* (1994) citaram uma série de relatos, feitos em diversos países entre 1916 e 1988, que tornaram evidente o fato de que *B. cereus* é um contaminante comum de leite e produtos de laticínios, ainda que raros ou obscuros tenham sido os relatos de intoxicações associadas. CRIELLY *et al.* (1994) consideraram *B. cereus* uma das espécies mais comuns em leite, presente em todos os estágios da pasteurização. Para LANGEVELD *et al.* (1996), é o microrganismo mais provável de causar deterioração em leite pasteurizado, guardado em temperatura de refrigeração, porém consideram escassas as evidências de que, em tais situações, seja o microrganismo responsável por surtos de intoxicação, diarreica ou emética. LARSEN & JORGENSEN (1997) verificaram presença de *B. cereus* em 56% de 458 amostras de leite pasteurizado, examinadas na Dinamarca.

BECKER *et al.* (1994) estudaram a presença de *B. cereus* em alimentos infantis, durante o ano de 1992, coletando 261 amostras em 17 países: 54% das amostras estavam contaminadas, alcançando níveis de até 600 UFC/g, ainda que apenas 10% das amostras exibissem contaminação superior a 10 UFC/g. O mesmo autor referiu-se a pesquisa anterior, desenvolvida entre 1982 e 1983, cujos percentuais de contaminação observados eram, pelo menos na Alemanha, sensível e inexplicavelmente inferiores aos do último levantamento. BECKER *et al.* (1994)

salientaram a importância da contaminação por *B. cereus* em concentrados para reconstituição, já que são alimentos consumidos, com frequência, por pessoas altamente suscetíveis - crianças ou pessoas debilitadas. Padrões de exigência de Portugal, Dinamarca e Holanda não permitem contagens iguais ou maiores do que 10 *B. cereus*/g nas fórmulas reconstituídas.

É muito comum a contaminação de alimentos desidratados, especialmente farináceos, por *B. cereus*. Alguns dos levantamentos feitos no Brasil revelaram a freqüente detecção do microrganismo em alimentos dessa classe. UBOLDI-EIROA *et al.* (1975), procedendo à caracterização microbiológica de farinhas e amidos, encontraram a maior freqüência de *B. cereus* em fubá (45% das amostras) e verificaram ser o patógeno com o maior índice de ocorrência no grupo de alimentos pesquisado. DELAZARI *et al.* (1978) analisaram 805 amostras de alimentos desidratados observando que, em média, 20,4% das amostras apresentavam contaminação, sendo observada a maior freqüência (90%) em farinha de milho. LEITÃO *et al.* (1983) verificaram a ocorrência de *B. cereus* em 26,9% das amostras de alimentos desidratadas examinadas. McKNIGHT *et al.* (1990) observaram 58,3% e 87,5% de contaminação em amostras de macarrão com e sem ovos, respectivamente.

Na Nigéria, YUSUF *et al.* (1992) analisaram farinhas e féculas, observando contaminação por *B. cereus* em 98% das amostras, com incidência variando entre 10^3 UFC/g (28%), 10^4 UFC/g (64,7%) e 10^5 UFC/g (7,3%), tendo sido observadas as maiores contagens em farinhas de mandioca, em níveis que alcançavam até 7×10^6 UFC/g. De 250 cepas isoladas em meio MYP, apenas 8% eram *B. mycoides*, evidenciando a alta prevalência de *B. cereus* nessa classe de alimentos. RUSUL & YAACOB (1995) observaram contaminação por *B. cereus* em 100% de 39 amostras de alimentos desidratados pesquisados na Malásia, os quais apresentaram entre 10^2 e 10^6 UFC/g.

BLAKEY & PRIEST (1980) constataram 56% de contaminação por *B. cereus* em 39 amostras de 12 diferentes leguminosas e cereais (60% nas amostras de arroz). HARMON *et al.* (1987) detectaram *B. cereus* em 57% de 98 amostras de sementes de leguminosas e cereais em kits para germinação doméstica, adquiridas em lojas de produtos naturais, na cidade de Washington. Durante o processo de germinação

para obtenção de brotos, ocorreu propagação de *B. cereus*, especialmente em trigo, cujas populações alcançaram 10^5 UFC/g.

BAXTER & HOLZAPFEL (1982) detectaram presença de *B. cereus* em 14 de 20 amostras de condimentos e aditivos, na África do Sul, entre os quais pimenta do reino, páprica, coentro, manjerição e farinha de soja, observando índices de contaminação entre 10^2 e 10^6 UFC/g. SHINAGAWA *et al.* (1988) analisaram mais de 200 amostras de aditivos para carnes (condimentos, amido e concentrados protéicos), constatando contaminação média de 43%. MALMSTEN *et al.* (1991) encontraram *B. cereus* na maioria de 200 amostras de ervas aromáticas desidratadas, na Finlândia, em níveis de contaminação alcançando 4×10^3 UFC/g, números que não se alteraram significativamente após dois anos de estocagem.

Ocorrência do microrganismo em carnes, produtos cárneos e aditivos foi investigada por KONUMA *et al.* (1988), em 1.963 amostras coletadas em seis cidades, no Japão. Entre os produtos cárneos, os bifes tipo "hamburgers" foram os que apresentaram maior frequência de contaminação (45,5% das amostras), enquanto menos de 10% de amostras de carnes frescas estavam contaminadas, quase sempre em contagens inferiores a 100 UFC/g. Por outro lado, os aditivos (com destaque para amido e concentrados protéicos) apresentaram grande proporção de amostras positivas e níveis de contaminação entre 10^2 e 10^4 UFC/g, confirmando o papel desses ingredientes como fonte comum de *B. cereus* para produtos cárneos. ASPLUND *et al.* (1988) assinalaram a presença do microrganismo em salsichas, com maior incidência observada nos meses de verão, quando foram detectadas populações de até 10^6 UFC/g. KAMAT *et al.* (1989) observaram 40% de contaminação em amostras de peixe, 80% em amostras de produtos cárneos e 30% em condimentos, em estudo feito em Bombaim.

No Brasil, ALMEIDA & SCHNEIDER (1983) pesquisaram a presença do microrganismo em produtos elaborados com carne moída, adquiridos em estabelecimentos comerciais na cidade de Campinas, constatando contaminação em 40% das amostras de croquetes e 90% das amostras de almôndegas, predominantemente em contagens superiores a 10^3 UFC/g.

A presença de *B. cereus* tem sido observada com alta frequência em arroz e suas preparações. A contaminação dos grãos ocorre durante colheita, transporte,

beneficiamento e armazenagem. Devido à atividade de água baixa, essa contaminação se faz, basicamente, por esporos do microrganismo, segundo VIJAYALAKSHMI *et al.* (1981). Os autores desenvolveram estudo, na Índia, e registraram contaminação variando entre 2×10 e 9×10^5 UFC/g em 66% de amostras de arroz cru e em todas as amostras de arroz cozido, coletadas em ambientes domésticos e analisadas dentro de 3 a 4 h após o preparo. CHUNG & SUN (1986) chegaram a considerar *B. cereus* parte da microbiota normal de arroz, após assinalarem sua presença em 11 de 12 amostras de arroz polido cru, na China. KAMAT *et al.* (1989) encontraram contaminadas todas as amostras de arroz cru obtidas no comércio de Bombaim.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Restaurante Universitário e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

3.1. AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *B. cereus* EM ARROZ

3.1.1. Amostras de arroz

Foram analisadas amostras de arroz polido, de arroz polido parboilizado e de arroz integral, coletadas a intervalos de cinco a sete dias, completando um total de 20 amostras de cada um dos tipos de arroz.

Todas as amostras de arroz polido (P) foram obtidas a partir de lotes destinados ao preparo de refeições no Restaurante Universitário. Duas marcas comerciais de arroz polido parboilizado (amostras Pb_A e Pb_B) também foram obtidas de estoques comerciais para venda a varejo e as amostras de arroz integral foram adquiridas em dois estabelecimentos comerciais (amostras Ia e Ib).

3.1.2. Microrganismos

Foram usados como cepas de referência os seguintes microrganismos: *B. cereus* ATCC 14579, NCTC 11143 (tipo emético) e NCTC 11145 (tipo diarreico) e *B. thuringiensis* ATCC 10792, adquiridos por intermédio da Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello, Campinas, SP.

3.1.3. Isolamento, enumeração e confirmação de *B. cereus*

Porções de, aproximadamente, 1 kg de cada um dos tipos de arroz foram coletadas em recipientes esterilizados e transportadas para o laboratório. Adotando metodologia preconizada pelo FDA (HARMON, 1984), 50 g de cada uma das amostras foram homogeneizadas, em liquidificador, com 450 mL de solução salina peptonada. A partir dessa diluição inicial, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo diluente.

Segundo a mesma metodologia, as contagens foram feitas por plaqueamento em superfície, espalhando-se 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo ágar vermelho de fenol - gema de ovo - manitol - polimixina B, conhecido como ágar MYP ou meio de Mossel. As placas foram, então, incubadas a 30°C por 18 a 24 h para contagem presuntiva de *B. cereus*.

As contagens foram feitas, preferencialmente, em placas que apresentassem entre 10 e 100 colônias (segundo proposta de HARMON *et al.*, 1992), rosadas e circundadas por halo de precipitação de lecitina. Em placas onde se observaram menos de 10 UFC na diluição mais baixa (10^{-1}), o procedimento foi repetido em outra alíquota de 50 g da mesma amostra, com o diluente reduzido à metade, de forma a dobrar a concentração de microrganismos.

Em placas com quatro ou mais colônias, pelo menos 1/3 foi submetido aos testes de confirmação. Quando o número de colônias foi inferior a quatro, todas as colônias foram isoladas para confirmação. As colônias foram repicadas para tubos de cultura contendo ágar nutriente inclinado, incubados por 24 h a 30°C. A partir daí, foram preparadas suspensões dos isolados em solução peptonada, para os testes de confirmação que se seguiriam.

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 pelo FDA, descrita por HARMON (1984). Esfregaços corados pelo método de Gram foram examinados ao microscópio. Bastonetes longos, Gram positivos, dispostos em cadeias e apresentando esporos que não distendiam o esporângio, foram submetidos a confirmação com base nas respostas às seguintes provas bioquímicas:

- produção de ácido em anaerobiose, em caldo glicose-vermelho de fenol;
- produção de acetilmetilcarbinol, em caldo VP;
- decomposição de tirosina, em ágar tirosina;
- crescimento em presença de 0,001% de lisozima.

Dessa forma, foram selecionados todos os isolados que apresentaram resultados similares para as quatro provas anteriormente mencionadas, compatíveis

com a caracterização do grupo de *B. cereus*. Tais isolados, então, foram submetidos aos seguintes testes para diferenciação da espécie:

- **Teste de motilidade:** diferentes de *B. mycoides* e de *B. anthracis*, exemplares típicos de *B. cereus* apresentam motilidade, crescendo difusamente ao longo da linha do inóculo em profundidade, em meio semi sólido.
- **Teste de crescimento rizóide:** para este teste teve-se a precaução de tornar bem secas as superfícies de ágar nutriente em placas de Petri. No centro de cada placa se inoculou, com leve toque de alça de platina, cada isolado a ser identificado. Após incubação a 30°C por 48 a 72 h, as colônias foram examinadas para observação de estruturas semelhantes a raízes que se estendiam a partir do ponto de inoculação até vários centímetros em direção às bordas da placa. O crescimento rizóide é característico de *B. mycoides* e o diferencia de *B. cereus*.
- **Teste de atividade hemolítica:** a este teste foram submetidos apenas os isolados que, sendo imóveis, não apresentaram crescimento rizóide, para confirmar possíveis *B. anthracis* (espécie não hemolítica).
- **Coloração de esporos:** os isolados foram cultivados em ágar nutriente durante 4 a 5 dias, à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram preparados esfregaços que, levados ao microscópio, permitiram detectar eventual presença de cristais paraesporais bipiramidais - forma como se apresentam proteínas tóxicas de *B. thuringiensis*.

Uma vez identificados, os isolados caracterizados como *B. cereus* tiveram suas contagens expressas como unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) das amostras de arroz examinadas.

3.1.4. Biotipagem de exemplares de *B. cereus*, isolados de arroz

Foi adotado o esquema proposto por JINBO & KOKUBO (1982) e avaliado por SHINAGAWA (1990), representado no Quadro 3.1.

QUADRO 3 1. – Caracterização de biótipos de *B. cereus*

Biótipos	Respostas a provas bioquímicas		
	Hidrólise de amido	Redução de nitrato	Decomposição de uréia
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	-

Os testes, conforme descrição dos autores, foram assim desenvolvidos:

- **Teste de hidrólise de amido:** os microrganismos foram cultivados em placas de Petri com ágar nutriente contendo 1% de amido solúvel, sendo 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, indicativo de hidrólise do amido; o iodo colore de azul arroxeado escuro as cadeias de amido que se mantêm íntegras, não atacadas por amilases. Segundo SHINAGAWA (1990), o teste pode ser considerado negativo para cepas fracamente amilolíticas, cujas colônias apresentam halo pouco definido e restrito aos limites da colônia. A visualização dos resultados deste teste foi facilitada pela comparação com o comportamento de uma cepa emética, amilase-negativa.
- **Teste de decomposição da uréia:** foi utilizado o meio de Christensen, que inclui em sua composição uréia, cuja transformação em amônia torna o meio alcalino e colorido de rosa. Conforme recomendado pelos autores do sistema de biotipagem, só foram considerados positivos aqueles isolados que, apresentando crescimento, viraram o indicador dentro de 24 h.

- **Teste de redução do nitrato:** observou-se a capacidade dos microrganismos em reduzir nitrato a nitrito, usando-se o mesmo meio incluído na metodologia proposta por HARMON (1984) para confirmação de *B. cereus*.

3.2. DETERMINAÇÕES DE TEMPERATURA, EM PREPARAÇÕES DE ARROZ

Foram monitoradas as temperaturas a que foi exposto o arroz durante operações de cozimento, manutenção de calor e resfriamento, em 3 ocasiões distintas, na cozinha do Restaurante Universitário da UFV.

3.2.1. Indicador-registrador de temperaturas

Foi utilizado equipamento multicanal, que dispõe de três sensores (termopares de tipo T, em cobre constantan).

3.2.2. Medições de temperaturas

As medições de temperaturas foram efetuadas, aleatoriamente, durante período compreendido entre os meses de novembro e maio. Tomou-se a precaução de não interferir nos procedimentos habituais dos funcionários, para que as descrições de processos retratassem a rotina do restaurante e, possivelmente, de outras grandes unidades de alimentação coletiva.

As temperaturas foram tomadas (1) nos equipamentos de cocção, (2) nos recipientes utilizados para distribuição do alimento pronto e (3) nos recipientes onde o alimento era resfriado e mantido até posterior utilização. Os sensores foram localizados em três pontos do alimento contido em cada um dos recipientes, adotando procedimento semelhante ao descrito por BRYAN *et al.* (1981): um dos sensores ficava inserido no centro geométrico; o segundo sensor era colocado na parte superior, a uma distância de aproximadamente 5 cm do topo do alimento; finalmente, o terceiro sensor era localizado diametralmente oposto ao segundo, 5 cm acima da base do recipiente.

As tomadas de temperatura estenderam-se por, aproximadamente, 24 h, a intervalos de 1 min, obedecendo à seguinte ordem, de acordo com o recipiente e a operação envolvida:

- (a) durante o tempo de cozimento, em caldeirões a vapor;
- (b) durante o período em que o alimento foi mantido aquecido, em recipientes térmicos, até distribuição aos comensais;
- (c) durante o período de resfriamento das sobras, em vasilhames destinados a armazená-las até a próxima refeição em que viessem a ser utilizadas.

3.2.2.1. Medições de temperatura de arroz, durante cozimento

O preparo de arroz em grandes quantidades é feito, freqüentemente, em equipamentos de cocção a vapor com capacidades variáveis, de 100 a 500 L. Na cozinha do Restaurante Universitário da UFV o arroz é cozido em equipamentos conhecidos como "panelões americanos", com capacidade de 400 L, nos quais o cozimento é bastante uniforme. As temperaturas máximas alcançadas são aproximadamente as mesmas observadas em processos domésticos de cocção.

Como a altitude da cidade de Viçosa alcança quase 700 m, a temperatura de ebulição da água é de, aproximadamente, 97,5°C. Foi essa a temperatura registrada na água fervente, com o equipamento aberto. Depois que se acrescentavam de 60 a 65 kg de arroz, além de água, óleo, alho e sal nas proporções indicadas, os sensores eram fixados e o equipamento era fechado. As dimensões da batelada eram de, aproximadamente, 210 L, com 0,30 m de altura e 1,00 x 0,70 m de base.

A temperatura se estabilizava em 98°C dentro de 5 min, quando se iniciava a contagem de tempo do processo. Durante meia hora o fornecimento de vapor era mantido e, depois disso, o equipamento permanecia fechado por mais 10 minutos. Os termopares ficavam inseridos no alimento durante os 40 min de duração do processo de cozimento.

3.2.2.2. Medições de temperatura de arroz cozido, em recipiente térmico

Imediatamente após o término do cozimento, o arroz era transferido para carros térmicos, apropriados à manutenção do calor e ao transporte para as áreas de distribuição das refeições. Nesses recipientes os alimentos ocupavam, aproximadamente, 80 L, correspondentes a 0,40 m de altura e 0,50 x 0,40 m de base.

Em todas as três ocasiões em que se mediram as temperaturas, um recipiente foi tomado aleatoriamente e seu monitoramento cessou no momento de sua distribuição. As temperaturas registradas, portanto, compreenderam o tempo desde a retirada do alimento do equipamento de cocção até o momento em que se iniciou sua utilização, no serviço da refeição.

3.2.2.3. Medições de temperatura de arroz cozido, durante resfriamento

Uma nova etapa foi monitorada, a partir do momento em que sobras do alimento, ao final da refeição, eram transferidas para painéis de alumínio e deixadas, inicialmente, à temperatura ambiente, entre 23 e 26°C. Quando a primeira e a segunda medições foram feitas, os recipientes foram levados a câmaras de refrigeração, onde a temperatura registrada oscilava entre 8 e 11°C. Quando da terceira medição, o vasilhame com as sobras foi transferido para uma antecâmara, cuja temperatura situava-se em torno de 16°C. Em tais condições se completava o resfriamento e se armazenavam as sobras de arroz.

As dimensões das painéis de alumínio (0,28 m de altura e diâmetro da base de 0,60 m) permitiam armazenar volumes de até 80 L do alimento pronto.

3.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COZIMENTO DE ARROZ NA SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE *B. cereus*

3.3.1. Microrganismos

Cepas de referência de tipos diarreico (NCTC 11145) e emético (NCTC 11143) e isolados representantes dos biótipos identificados, selecionados aleatoriamente.

3.3.2. Preparo das suspensões de esporos

Os esporos de cada cepa foram cultivados no meio de esporulação proposto por MARTIN & BLACKWOOD (1972), preparado com caldo nutriente suplementado com 0,01% $MnSO_4$, 1% de amido e 2% ágar. Cada isolado foi cultivado previamente em tubo com ágar nutriente inclinado, passando por três repicagens. A cada tubo, então, adicionou-se 1 mL de solução salina esterilizada para remover a massa celular, com auxílio de alça de platina. As suspensões de células assim obtidas foram usadas para inocular, em superfície, meio de esporulação preparado em frascos de Roux.

No caso dos biótipos 1 e 2, optou-se por trabalhar com suspensões de esporos mistas de três isolados, com propósito de estender os estudos de destruição térmica e crescimento em meio de arroz a maior número de microrganismos, adotando procedimento semelhante ao descrito por BENEDICT *et al.* (1993). Os três isolados de biótipo 1 foram sorteados entre 17 semelhantes. Como os isolados de biótipo 2 eram muito numerosos, e considerando a possibilidade de que, em cada amostra de arroz, representassem a mesma estirpe, foi feito sorteio prévio de um isolado por amostra, reduzindo para 31 o total de onde foram, então, sorteados os que compuseram a suspensão. A seleção rigorosamente aleatória teve como objetivo a representação não tendenciosa da população completa.

As suspensões de esporos foram assim compostas e identificadas:

- suspensão A (biótipo 1): mistura de esporos de três isolados (n^{os} 021, 035 e 089);
- suspensão B (biótipo 2): mistura de esporos de três isolados (n^{os} 045, 136 e 188);
- suspensão C (biótipo 6): esporos do isolado n^o 106;
- suspensão D (tipo diarreico): esporos do microrganismo NCTC 11145;
- suspensão E (tipo emético): esporos do microrganismo NCTC 11143.

Cada isolado que compôs as suspensões A e B foi inoculado em dois frascos de Roux e os demais isolados foram inoculados, cada um, em quatro frascos. Os frascos foram incubados a 35°C por quatro a sete dias (KUTIMA & FOEGEDING, 1987), até que, por observação microscópica, pôde-se estimar de 90 a 95% de esporulação. A massa de microrganismos foi removida cuidadosamente, com auxílio de bastão de vidro, mediante adição de 10 mL de solução salina a cada frasco. Os conteúdos de dois frascos contendo o mesmo microrganismo foram transferidos para tubos de centrifuga de 50 mL.

Os esporos cultivados foram centrifugados a 5000 *g* por 20 minutos, a 4°C, adotando procedimento descrito por WESCOTT *et al.* (1995). O processo foi repetido cinco vezes, até que se concentraram suspensões com $\geq 98\%$ de esporos refrateis, as quais foram padronizadas, mediante contagens em placas, para populações aproximadas de 10^9 esporos/mL, em água destilada. As suspensões mistas A e B foram elaboradas pela mistura equilibrada das suspensões individuais correspondentes. Cada suspensão foi distribuída, com pérolas de vidro, em seis porções de 60 a 80 mL, em frascos dotados de tampas rosqueáveis, para convenientes diluições posteriores. A precaução de preparar diversas suspensões de estoque teve como objetivo evitar excesso de manipulação em um mesmo material e assegurar reserva para substituir eventuais suspensões contaminadas. Esses materiais ficaram estocados a $4(\pm 1)^\circ\text{C}$ até sua utilização, o que ocorreu no prazo máximo de oito meses.

3.3.3. Preparo do meio de arroz

O meio foi preparado de forma semelhante às descrições de MELLING *et al.* (1976) e de JOHNSON *et al.* (1984). Foram introduzidas modificações, de forma a reproduzir a formulação adotada no Restaurante Universitário, onde a pesquisa se ambientou. Para tal, as proporções se basearam nos valores *per capita* usuais da preparação: arroz, 80 g; óleo de soja, 7 g; sal, 3 g; alho, 1 g. Em virtude de seu uso mais difundido em serviços de alimentação, o meio foi elaborado com arroz polido. Todos os componentes foram fornecido semanalmente pelo restaurante, provenientes de estoques destinados a consumo imediato.

Misturas assim preparadas foram distribuídas, em porções de 7 g, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm providos de tampas de inox. Em conformidade com JOHNSON *et al.* (1983), a cada tubo se adicionaram 14 g de água, semelhantemente à prática comum de cocção de arroz em cozinhas de grande porte, segundo a qual se utilizam, aproximadamente, duas partes de água para uma parte de arroz. Os tubos foram, então, levados à autoclave a 121°C por 15 min. O processo de autoclavagem tornou o meio uma réplica do alimento pronto para consumo, com pH $6,7 \pm 0,1$. Cada tubo continha, aproximadamente, 20 g do meio esterilizado, com as seguintes proporções: 30,77% de arroz, 1,15% de sal e 0,38% de alho.

3.3.4. Efeitos do tratamento térmico sobre esporos de *B. cereus*

Testes preliminares foram desenvolvidos para orientar a condução do experimento. Mediante observações assim feitas, optou-se por avaliar, em separado, cada uma das suspensões, o que permitiu proceder às contagens imediatamente após cada tratamento térmico. O experimento foi conduzido em duas repetições.

Cada ensaio, portanto, consistiu de uma suspensão em particular e de amostras (tubos em duplicata, contendo meio de arroz) em número suficiente para acompanhar o processo de destruição térmica decorrente da exposição durante 40 min à temperatura de 97,5°C. A definição desse tratamento partiu da observação do processo de cozimento de arroz descrita no item 3.2.2.1.

Assim, cada tubo contendo meio de arroz recebeu 0,5 mL de suspensão de esporos não submetida a choque térmico, tendo-se o cuidado de homogeneizá-la, em "vortex", antes de cada inoculação, de maneira a minimizar flutuações nos números de esporos inoculados. Este procedimento foi recomendado com especial atenção por FERMANIAN *et al.* (1994). Quando necessário, procedeu-se à rediluição da suspensão original, de forma a assegurar populações iniciais de 10^6 a 10^7 esporos/g de meio.

Ao submeter cada suspensão ao tratamento térmico, dez tubos de arroz inoculados (correspondentes a cinco amostras) foram colocados em banho a 97,5°C, bem como um tubo não inoculado onde se introduziu termômetro para

monitorar a temperatura. Quando nesse tubo a temperatura alcançou 97,5°C - o que aconteceu após 5 a 6 min - uma amostra foi retirada, relativa ao tempo zero do experimento. A população verificada na primeira contagem, correspondente a esse momento, foi estabelecida como a população inicial, de forma que o efeito letal relativo ao período de elevação da temperatura foi desconsiderado. A partir daí, a intervalos de 10 min, foram sendo retiradas as demais amostras, todas resfriadas em banho de gelo e assim mantidas até os procedimentos de plaqueamento para contagem dos sobreviventes, que se iniciaram imediatamente quando se completaram 40 min de manutenção a 97,5°C.

O conteúdo de cada tubo foi removido com auxílio de espátula esterilizada e homogeneizado em liquidificador com 180 mL de solução peptonada, após o que se seguiram as diluições em série e o plaqueamento, em duplicata, de três ou quatro diluições sucessivas. O procedimento se assemelhou ao método de contagem anteriormente descrito, pelo espalhamento de 0,1 mL de cada diluição em placas contendo meio MYP. A opção por este meio baseou-se em observações de que *B. cereus* não apresenta sensibilidade aos seus componentes de efeito inibitório, quando em valores de pH entre 6,3 e 7,3 (RAPPAPORT & GOEPFERT, 1978) e teve como objetivo facilitar o reconhecimento de eventuais contaminantes. Contudo, não se acrescentou polimixina-B ao meio, por não ser necessária sua ação seletiva e para evitar possíveis efeitos deletérios sobre esporos injuriados (GOMBAS, 1983). As placas foram incubadas a 30°C e o tempo de incubação estendeu-se por até 48 h. Selecionaram-se, para contagem, placas com 10 a 100 UFC.

Os tempos necessários para redução decimal das populações de esporos (D), foram obtidos a partir das curvas de destruição térmica, construídas mediante contagens dos sobreviventes a cada intervalo de 10 min de exposição a 97,5°C. Para isso, utilizou-se o Microsoft® EXCEL 97, para Windows® 95 (Microsoft Corporation). Os valores $D_{97,5^{\circ}\text{C}}$ foram calculados como inverso negativo dos coeficientes angulares, tomados como médias de duas repetições.

3.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *B. cereus* EM MEIO DE ARROZ

3.4.1. Microrganismos

Foram utilizados os mesmos microrganismos identificados no item 3.3.1.

3.4.2. Preparo das suspensões de esporos e do meio de arroz

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

3.4.3. Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a diferentes temperaturas

O experimento foi desenvolvido a sete temperaturas distintas (10, 15, 22, 30, 37, 43 e 45°C), incluídas na faixa considerada de risco para multiplicação do microrganismo, segundo diversos autores (SHINAGAWA *et al.*, 1979; BRYAN *et al.*, 1981; JOHNSON *et al.*, 1984; GRANUM *et al.*, 1993). Para reduzir variações entre ensaios, todas as suspensões foram avaliadas simultaneamente a cada temperatura. O experimento foi conduzido em duas repetições, sendo o número de amostras (tubos em duplicata) definido por testes preliminares que permitiram avaliar os intervalos de tempo adequados à observação de pelo menos três pontos da curva de crescimento em sua fase exponencial. As suspensões foram previamente ajustadas para que as populações iniciais se situassem entre 10^2 e 10^3 esporos/g.

Tubos contendo 20 g do meio de arroz, equilibrados à temperatura do experimento, foram inoculadas com 0,5 mL de suspensão de esporos submetida a choque térmico por 15 min a 70°C (JOHNSON & BUSTA, 1984). A suspensão assim tratada foi submetida, preliminarmente, à contagem em placas de Petri contendo ágar MYP, para a estimativa da população inicial.

Nesta fase foi tomada a mesma precaução de homogeneizar cuidadosamente cada suspensão, dada a necessidade evidente de garantir populações uniformemente distribuídas em todas as amostras.

O número de amostras, entre seis e oito, permitiu acompanhar a evolução no crescimento das populações e obter dados para posteriores estimativas das taxas máximas de crescimento. A cada ensaio os tubos foram incubados à temperatura correspondente e, a cada intervalo de tempo, foi removida uma amostra

correspondente a cada suspensão e imediatamente resfriada em banho de gelo, para deter o crescimento. O conteúdo de cada tubo foi, então, submetido à rotina de homogeneização, diluições e plaqueamento em meio MYP. Para a contagem, pelo menos três diluições consecutivas foram plaqueadas, em duplicata, de forma semelhante ao procedimento adotado anteriormente. Tomou-se a precaução de incubar as placas a 30°C por período não superior a 20 h, de forma que, mesmo em placas com números de colônias próximos a 100, seu tamanho reduzido facilitou a contagem, por evitar superposição.

Com propósito de avaliar sensorialmente o meio, alguns tubos extras foram reservados e, ao final do tempo de incubação, foram abertos para que se pudessem detectar odores desagradáveis e melhor observar eventuais alterações de cor, decorrentes do crescimento do microrganismo.

As contagens geraram curvas de crescimento, definidas como logaritmos dos números de UFC em função do tempo (h). Tais curvas foram construídas utilizando o Microsoft® EXCEL 97, para Windows® 95 (Microsoft Corporation), e, por regressão linear, foram selecionados os segmentos com os maiores coeficientes angulares, correspondentes às fases de crescimento exponencial, para cada suspensão e temperatura de incubação. Os coeficientes angulares, representando as taxas máximas de crescimento, foram denominados K_{max} e expressaram o aumento populacional em ciclos logarítmicos por hora.

Os tempos de geração (G), necessários para duplicar o número de microrganismos, foram calculados por meio da Equação 1, com base nos valores de K_{max} tomados como médias de duas repetições:

$$G = \frac{\log 2}{K_{max}} \quad \text{Equação 1}$$

3.4.4. Modelo para estimar o crescimento de *B. cereus* em meio de arroz

Para estimar velocidades de crescimento em função da temperatura, adotou-se o modelo matemático proposto por RATKOWSKY *et al.* (1983), baseado em equação desenvolvida por BELEHRÁDEK (1930), conforme citação. O modelo foi

modificado e denominado 'Ratkowsky 3' por ZWIETERING *et al.* (1991). Estes autores apresentaram evidências de que é um modelo extremamente apropriado para descrever variações nas taxas de crescimento de microrganismos, decorrentes de sua exposição a diferentes temperaturas.

Utilizando o programa ORIGIN® – versão 4.0 (Technical Graphics and Data Analysis in Windows® – Microcal Software, Inc.), o modelo foi ajustado aos valores médios de K_{max} , obtidos experimentalmente. Dessa forma, foram estimados valores para as taxas de crescimento, em função da temperatura, relativos às diferentes suspensões de esporos de *B. cereus*. As taxas de crescimento estimadas pela Equação 2 (Ratkowsky 3) foram denominadas $K(T)$, e compreendem todo o intervalo de temperatura que pode comportar crescimento dos microrganismos testados:

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

em que T_{min} e T_{max} (°C) são, respectivamente, a mínima e a máxima temperatura que limitam a faixa de crescimento potencial do microrganismo, e foram determinadas, para cada suspensão, a partir do ajuste da equação aos dados experimentais. As letras a (°C⁻¹h^{-1/2}) e b (°C⁻¹) representam parâmetros também obtidos por meio do ajuste.

A partir dos valores de $K(T)$ foi possível estimar aumentos em populações iniciais hipotéticas e traçar curvas preditivas do crescimento dos microrganismos em arroz cozido, referentes a cada suspensão, simulando sua exposição a duas situações de resfriamento, a partir de 45°C. Foram reproduzidas a primeira e a terceira medições de temperatura realizadas durante armazenamento de arroz cozido, correspondentes, respectivamente, às estocagens do alimento em câmara refrigerada e em antecâmara. Em ambos os casos, foram feitas simulações a partir dos registros de temperatura obtidos no centro geométrico dos recipientes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *B. cereus* EM ARROZ

4.1.1. Isolamento, enumeração e confirmação de *B. cereus*

Segundo metodologia descrita para enumeração de *B. cereus* em amostras de arroz, 240 colônias típicas em ágar MYP foram seletivamente enumeradas e submetidas a isolamento.

A caracterização bioquímica e morfológica complementar, proposta por HARMON (1984) para confirmar e diferenciar membros do grupo, levou ao reconhecimento quase total dos isolados. Os resultados desses testes constam da Tabela 4.1, compreendendo os três diferentes tipos de arroz examinados e respectivos números de isolados submetidos às provas de confirmação.

Com base em tais resultados, propôs-se a confirmação diferencial dos isolados em espécies do grupo de *B. cereus* (Tabela 4.2). A maioria - 216 entre 240 isolados (90%) - apresentou reações típicas, em coincidência de resultados com as cepas de *B. cereus* tomadas como referência, o que permitiu confirmá-los como exemplares da espécie.

A observação de cristais paraesporais diferenciou dez exemplares de *B. thuringiensis* entre os 240 isolados (4,17%), os quais apresentaram similaridade com a cepa de referência dessa espécie. Foram observados 11 isolados sem a característica de motilidade, sete dos quais apresentaram crescimento rizóide, sendo confirmados *B. mycoides* (2,92%). Apenas os quatro microrganismos sem motilidade e que não apresentaram crescimento rizóide foram submetidos à prova de capacidade hemolítica, mas os resultados positivos ao teste descartaram a possibilidade de que fossem exemplares de *B. anthracis*.

Do total de isolados, sete (2,92%) não foram confirmados, permanecendo a possibilidade de serem exemplares atípicos do grupo de *B. cereus*. Três desses microrganismos eram provenientes de placas onde cresceram microrganismos manitol-positivos, o que pode ter dificultado seu isolamento seletivo.

TABELA 4.1 - Caracterização de isolados de amostras de arroz e das cepas de referência

Testes	Nº (%) de resultados positivos			Resultados das cepas de referência			
	Arroz polido (53 isolados)	Arroz parboilizado (5 isolados)	Arroz integral (182 isolados)	ATCC 14579 ^a	NCTC 11143 ^a	NCTC 11145 ^a	ATCC 10792 ^b
Produção de ácido a partir de glicose (em anaerobiose)	53 (100)	4 (80,00)	181 (99,45)	+	+	+	+
Produção de acetilmetilcarbinol (VP)	52 (98,11)	5 (100)	179 (98,35)	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	52 (98,11)	5 (100)	180 (98,90)	+	+	+	+
Resistência à lisozima	53 (100)	5(100)	178 (97,80)	+	+	+	+
Motilidade	49 (92,45)	5 (100)	175 (96,15)	+	+	+	+
Crescimento rizóide	2 (3,77)	0	5 (2,75)	-	-	-	-
Coloração de Gram (+)	53 (100)	5 (100)	178 (97,80)	+	+	+	+
Coloração de esporos	52 (98,11)	5 (100)	179 (98,35)	+	+	+	+
Produção de cristais paraesporais	3 (5,66)	0	7 (3,85)	-	-	-	+

a - ATCC 14579, NCTC 11143 e NCTC 11145 - *B. cereus*
b - ATCC 10792 - *B. thuringiensis*

TABELA 4.2 - Diferenciação de espécies isoladas de amostras de arroz

Material	Nº de isolados submetidos a confirmação	<i>B. cereus</i>		<i>B. thuringiensis</i>		<i>B. mycoides</i>		outras	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Arroz polido	53	46	(86,79)	3	(5,66)	2	(3,77)	2	(3,77)
Arroz parbolizado	5	4	(80,00)	0	0	0	0	1	(20,00)
Arroz integral	182	166	(91,21)	7	(3,85)	5	(2,75)	4	(2,20)
Total	240	216	(90,00)	10	(4,17)	7	(2,92)	7	(2,92)

As Tabelas 4.3 e 4.4 foram compiladas a partir dos resultados das amostras que apresentaram colônias típicas de *B. cereus* em ágar MYP, ou seja, amostras positivas para a presença do microrganismo. Vale mencionar que, via de regra, o uso do meio MYP evitou o isolamento de espécies resistentes à polimixina e cujas colônias se assemelhavam às de *B. cereus*, porém que não apresentavam as reações típicas de produção de lecitinase e incapacidade de fermentar manitol. Assim, de maneira geral, foi possível submeter a confirmação apenas os microrganismos cujas possibilidades de diferenciação restringiram-se, quase exclusivamente, ao grupo de *B. cereus*. Os procedimentos de enumeração e identificação levaram às contagens presuntivas e confirmadas nos materiais examinados. A Tabela 4.5 resume os resultados de ocorrência e incidência de *B. cereus* nas amostras de arroz examinadas.

TABELA 4.3 - Enumeração de *B. cereus* em amostras de arroz polido e de arroz parboilizado

Material	Identificação das amostras	Contagem presuntiva* (x10 ² UFC/g)	Nº de isolados confirmados/testados	<i>B. cereus</i> (x10 ² UFC/g)
Arroz polido	P ₄	1,50	3/3	1,50
	P ₆	1,00	2/2	1,00
	P ₇	2,00	4/4	2,00
	P ₁₀	2,00	3/4	1,50
	P ₁₂	4,50	8/9	4,00
	P ₁₃	1,00	2/2	1,00
	P ₁₆	9,00	8/11	6,54
	P ₁₇	2,50	4/5	2,00
	P ₁₉	2,00	4/4	2,00
	P ₂₀	4,50	8/9	4,00
Arroz Parboilizado	Pb _{A9}	1,00	2/2	1,00
	Pb _{B7}	1,50	2/3	1,00

*Contagem estimada, a partir de placas, em duplicata, com menos de 10 colônias

TABELA 4.4 - Enumeração de *B. cereus* em amostras de arroz integral

Identificação das amostras	Contagem Presuntiva (UFC/g)	Nº de isolados confirmados/testados	<i>B. cereus</i> (UFC/g)
la1	7,50 x 10 ^{2*}	10/10	7,50 x 10 ^{2*}
la2	3,00 x 10 ^{2*}	5/6	2,50 x 10 ^{2*}
la3	7,00 x 10 ^{2*}	8/8	7,00 x 10 ^{2*}
la4	7,00 x 10 ^{2*}	8/9	6,22 x 10 ^{2*}
la5	3,50 x 10 ^{2*}	7/7	3,50 x 10 ^{2*}
la6	6,50 x 10 ^{2*}	8/9	5,77 x 10 ^{2*}
la7	1,45 x 10 ³	10/12	1,12 x 10 ³
la8	1,30 x 10 ³	9/10	1,17 x 10 ³
la9	6,00 x 10 ^{2*}	8/8	6,00 x 10 ^{2*}
la10	8,50 x 10 ^{2*}	7/9	6,61 x 10 ^{2*}
lb1	1,10 x 10 ³	9/10	9,90 x 10 ²
lb2	1,20 x 10 ³	8/9	1,06 x 10 ³
lb3	4,50 x 10 ^{2*}	7/8	3,94 x 10 ^{2*}
lb4	2,05 x 10 ³	12/14	1,76 x 10 ³
lb5	6,00 x 10 ^{2*}	8/8	6,00 x 10 ^{2*}
lb6	3,50 x 10 ^{2*}	7/7	3,50 x 10 ^{2*}
lb7	1,80 x 10 ³	11/13	1,52 x 10 ³
lb8	3,00 x 10 ^{2*}	6/6	3,00 x 10 ^{2*}
lb9	7,50 x 10 ^{2*}	8/9	6,66 x 10 ^{2*}
lb10	1,10 x 10 ³	10/10	1,10 x 10 ³

*Contagem estimada, a partir de placas, em duplicata, com menos de 10 colônias

TABELA 4.5 - Ocorrência e incidência de *B. cereus* em amostras de arroz

Material	Total de amostras	Nº (%) de amostras contendo $\geq 10^2$ /g		Média (UFC/g)	Variação (UFC/g)
		$\geq 10^2 < 10^3$	$\geq 10^3$		
Arroz polido	20	10 (50%)	0	$2,55 \times 10^2$	$1,00$ a $6,54 \times 10^2$
Arroz parboilizado	20	2 (10%)	0	$1,00 \times 10^2$	—
Arroz integral	20	15 (75%)	5 (25%)	$7,77 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$ a $1,76 \times 10^3$

É de se notar a compatibilidade entre os resultados obtidos nesta pesquisa e os relatos de outros levantamentos. Prevalência variável, que alcança até 100%, foi constatada por diversos autores que pesquisaram a presença de *B. cereus* em amostras de arroz: 29% (RAEVUORI *et al.*, 1976), 100% (BRYAN *et al.*, 1981), 46%, (SHAH *et al.*, 1996) e 60%, (HASSAN & NABBUT, 1996). Níveis semelhantes de contaminação, na faixa entre 10^2 e 10^3 UFC/g, foram observados rotineiramente por diversos pesquisadores, entre os quais VIJAYALAKSHMI *et al.* (1981), KAMAT *et al.* (1989), RUSUL & YAACOB (1995) e SHAH *et al.* (1996).

No presente estudo ficou evidente a maior frequência de contaminação no arroz integral (100% das amostras). O sistema de venda observado nos dois empórios de comida natural onde as amostras foram adquiridas pode ter contribuído para esse fato: o cereal ficava exposto em sacos de 50 kg, abertos, e eram embalados apenas no momento da compra. Já as amostras de arroz polido, coletadas imediatamente após a retirada das embalagens plásticas com que permaneciam acondicionadas no Restaurante Universitário, apresentaram contaminação em 50% das amostras, e os níveis foram um pouco inferiores aos exibidos pelas amostras de arroz integral. Além disso, o processo de polimento de arroz, que consiste na retirada da camada externa do grão, pressupõe que parte das impurezas, inclusive esporos bacterianos, também sejam retirados. Isto seria uma outra causa provável da menor frequência de detecção de *B. cereus* nas amostras de arroz polido, comparativamente ao que foi observado nas amostras de arroz integral, nas quais o córtex foi preservado. UEDA & KUWABARA (1993) atestaram da maior contaminação em amostras de arroz sem polimento, após levantamento da ocorrência de cepas toxigênicas em diversas fases de

beneficiamento do grão. Maior frequência de contaminação em arroz integral do que em arroz polido também foi mencionada por CHUNG & SUN (1986), respectivamente 100 e 80% das amostras.

A baixa contaminação das amostras de duas marcas comerciais de arroz parboilizado polido pode ser indicativa do controle higiênico adotado pelas indústrias processadoras. A parboilização pode resultar em redução da contaminação, removida parcialmente pela água aquecida onde os grãos são imersos durante o processo. Assim, a presença de *B. cereus* pode não ser detectável, pela metodologia de plaqueamento, em grande porcentagem de amostras. O arroz usado na Índia é rotineiramente submetido à parboilização, até por meio de processos artesanais, como relata PILLAYAR (1990), nos quais não se tomam os devidos cuidados de higiene. Talvez isto justifique o fato de KAMAT *et al.* (1989) terem encontrado 100% de contaminação tanto em amostras de arroz polido como de arroz parboilizado, observando nível de contaminação de até 4×10^4 UFC/g nas amostras de arroz parboilizado, enquanto entre amostras de arroz polido a contaminação não passou de 6×10^2 UFC/g.

4.1.2. Biotipagem de exemplares de *B. cereus* isolados de arroz

No total, 216 isolados foram submetidos às provas bioquímicas propostos por JINBO & KOKUBO (1982) e as reações dos isolados aos testes de hidrólise de amido, redução de nitrato e decomposição de uréia estão apresentados na Tabela 4.6.

A verificação de que a grande maioria das cepas revelou-se amilase-positiva (98,15%) - e suas reações, via de regra, fortemente amilolíticas - não reproduz resultados observados pelos autores da metodologia, segundo os quais 18% dos isolados de alimentos (naquele caso, carnes e peixes) eram incapazes de hidrolisar amido. SHINAGAWA *et al.* (1979) observaram variação na capacidade amilolítica de isolados de arroz, relatando que 17% apresentavam resultados negativos ou fracamente positivos. Os isolados que, neste trabalho, não foram considerados amilase-positivos, apresentaram reações muito fracas, com o halo transparente indicativo da atividade amilolítica restrito apenas aos

limites da colônia, semelhantemente à reação da cepa emética NCTC 11143. Todas as demais cepas de referência eram amilolíticas.

TABELA 4.6 - Resultados das provas para biotipagem de *B. cereus*

Material (nº de isolados)	Número (%) de resultados positivos, por teste		
	Hidrólise de amido	Redução de nitrato	Decomposição de uréia
Arroz polido (46)	45 (97,83)	46 (100)	6 (13,04)
Arroz parboilizado (4)	4 (100)	4 (100)	0
Arroz integral (166)	163 (98,19)	166 (100)	11 (6,63)
Total	212 (98,15)	216 (100)	17 (7,87)

* Biotipagem segundo JINBO & KOKUBO (1982)

A decomposição de uréia foi observada em apenas 17 dos 216 isolados, correspondentes a 7,87%, resultado próximo aos 11,7% entre 486 isolados de alimentos em geral, mencionados por SHINAGAWA (1990), e 11,9% relatados por CANTONI & BRESCIANI (1987), enquanto JINBO & KOKUBO (1982) observaram 19,2% de cepas positivas entre 370 isolados de carnes e peixes.

A redução de nitrato a nitrito foi observada em todas as 216 cepas de *B. cereus* isoladas de arroz, em semelhança aos resultados obtidos por CANTONI & BRESCIANI (1987) e WONG *et al.* (1988a). Segundo CLAUS & BERKELEY (1986), mais de 90% das cepas da espécie são capazes de reduzir nitrato a nitrito, mas SHINAGAWA (1990) e JINBO & KOKUBO (1982) encontraram 15% e 11,4% de cepas negativas, em seus respectivos estudos.

Os resultados dessas provas bioquímicas permitiu a classificação dos isolados em três biótipos (1, 2 e 6), conforme se observa na Tabela 4.7. A predominância do biótipo 2 (cepas amilase-positivas, redutoras de nitrato e não produtoras de urease) era esperada, dadas serem essas as características típicas da espécie.

As cepas de referência ATCC 14579 e NCTC 11145 apresentaram reações de biótipo 2, enquanto a cepa NCTC 11143, emética, exibiu nítido resultado negativo quando submetida à prova de produção de amilase, tendo sido caracterizada como biótipo 6.

TABELA 4.7 - Biótipos de *B. cereus* isolados de arroz

Material	Total de <i>B. cereus</i> isolados	Nº (%)		
		Biótipo 1	Biótipo 2	Biótipo 6
Arroz polido	46	6 (13,04)	39 (84,78)	1 (2,17)
Arroz parboilizado	4	0	4 (100)	0
Arroz integral	166	11 (6,63)	152 (91,57)	3 (1,81)
Total	216	17 (7,87)	195 (90,28)	4 (1,85)

Quando JINBO & KOKUBO (1982) propuseram a classificação de *B. cereus* em sete biótipos, manifestaram o propósito de estabelecer associações entre características bioquímicas e patogenicidade, a partir de observações que relacionavam aos biótipos 6 e 7 o maior número de exemplares patogênicos. Desde que o esquema foi desenvolvido, vários pesquisadores têm verificado reações negativas à prova de hidrólise de amido apenas entre cepas isoladas de surtos eméticos. A alta correlação observada tem levado a se propor esse teste como forma de identificar, preliminarmente, cepas produtoras do fator emético (SHINAGAWA, 1993; NISHIKAWA *et al.*, 1996). Sendo assim, a baixa frequência de cepas amilase-negativas, observada nas amostras de arroz examinadas neste estudo, parece indicativa de que cepas eméticas são pouco comuns em nosso meio.

4.2. DETERMINAÇÕES DE TEMPERATURA, EM PREPARAÇÕES DE ARROZ

4.2.1. Medições de temperatura de arroz, durante cozimento

Foram observadas temperaturas uniformes, em todos os pontos onde se inseriram os sensores (termopares) e constantes, ao longo do tempo em que se processou a cocção. Tais medidas, feitas em três ocasiões distintas, apresentaram absoluta uniformidade de resultados, permitindo descrever o processo de cozimento do arroz como exposição a 98°C durante 40 minutos.

Vários são os registros, na literatura, de cepas de *B. cereus* que apresentam esporos excepcionalmente resistentes ao calor (JOHNSON *et al.*, 1982; RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK, 1987; DUFREENE *et al.*, 1994). O cozimento, ainda que represente efeito letal sobre grande parte da população, não está isento de permitir a sobrevivência de esporos que exibem particulares características de termorresistência (GILBERT *et al.*, 1974; PARRY & GILBERT, 1980).

4.2.2. Medições de temperatura de arroz cozido, em recipientes térmicos

A Figura 4.1 foi compilada a partir dos registros de temperaturas provenientes dos sensores localizados na borda inferior (base), centro geométrico e borda superior (topo) dos alimentos mantidos nos recipientes para transporte, dotados de isolamento térmico.

O tempo de manutenção do alimento quente, pronto para ser servido, variou entre 2h 30min e 3h 20min. O resfriamento foi lento em todos os pontos monitorados com os termopares, e a temperatura manteve-se, invariavelmente, acima da faixa que permite a germinação de esporos de *B. cereus*, não se observando temperaturas inferiores a 56,5°C.

Tal observação levou a concluir que, mantidas as semelhanças, esse período não deve ser considerado crítico para a multiplicação de *B. cereus* em arroz, a menos que as temperaturas caiam até 50°C ou menos. Segundo observações de JOHNSON *et al.* (1983,1984), a germinação de esporos do microrganismo, em arroz, não ocorre acima desse ponto.

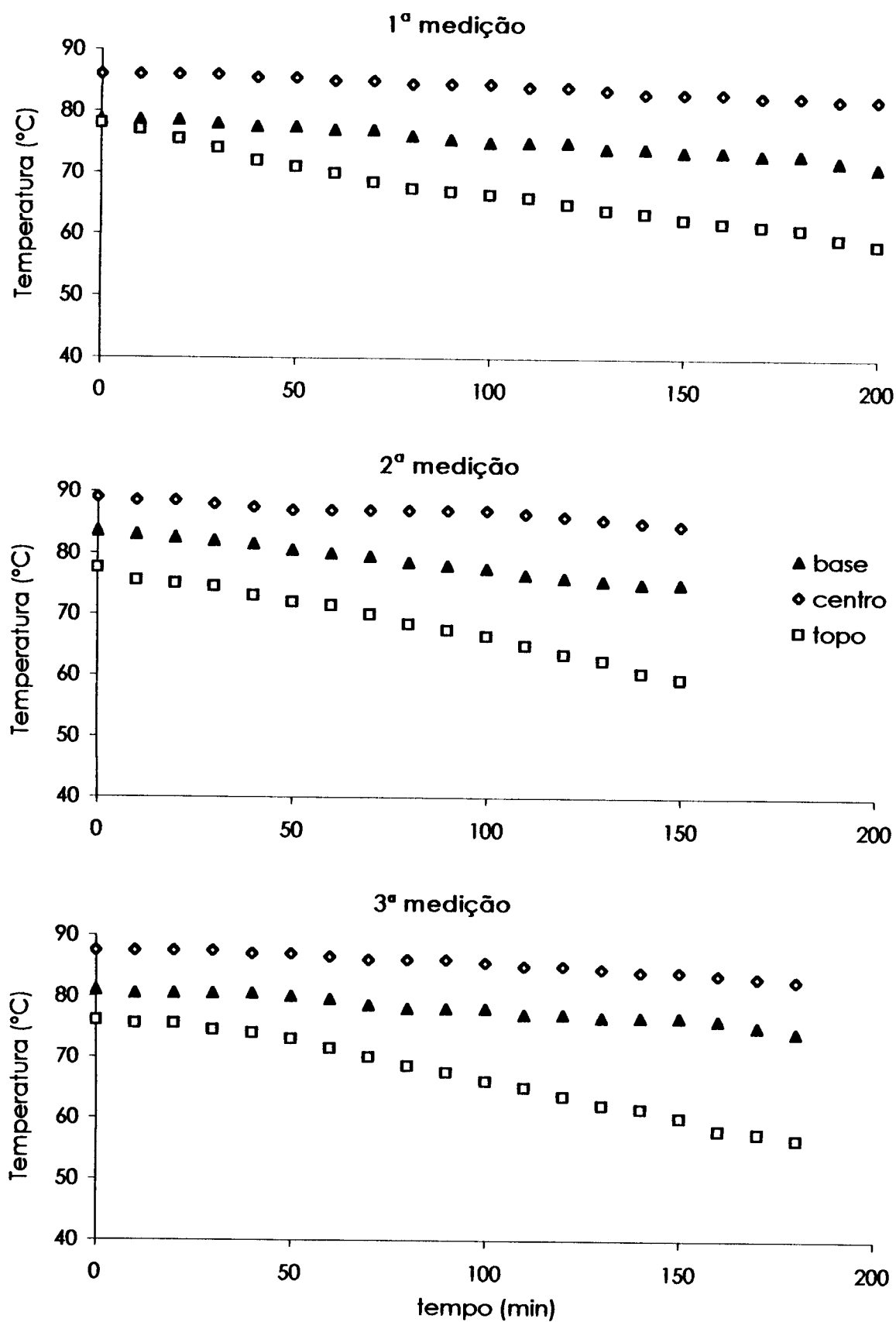


FIGURA 4.1 - Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, mantido em recipiente térmico.

Durante essa fase de manutenção de calor, as temperaturas não foram suficientes para inativar esporos de *B. cereus* que, eventualmente, estivessem presentes no alimento pronto, especialmente em se considerando a existência de cepas resistentes, sobreviventes do processo de cozimento (PARRY & GILBERT, 1980; RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK, 1987; DUFRENE *et al.*, 1994).

4.2.3. Medições de temperatura de arroz cozido, durante resfriamento

As observações durante o período de resfriamento estenderam-se, no total, por 18h 30 min, 16h 30 min e 19h 50 min, respectivamente, nas três ocasiões em que foram conduzidas as medidas de temperatura, desde o final da distribuição até que o alimento retornasse à cozinha para seu aproveitamento.

A primeira etapa do resfriamento, à temperatura ambiente, estendeu-se por 3h 40min, 1h 50min e 3h, respectivamente, na 1ª, 2ª e 3ª tomadas de temperatura (Figura 4.2). Uma vez que todas as medidas foram feitas entre a primavera e o verão, a temperatura do ambiente apresentou-se em níveis que favoreceram a lentidão do resfriamento. Como o alimento já havia se resfriado parcialmente, durante a distribuição e a transferência de vasilhames, as temperaturas apresentaram-se próximas ou dentro das faixas de risco de germinação e multiplicação de *B. cereus*.

Quando das duas primeiras medições, o processo de resfriamento completou-se, como mencionado anteriormente, em câmaras de refrigeração, nas quais a temperatura se situou entre 8 e 11°C. Na 3ª medição, quando o resfriamento prosseguiu na antecâmara, registrou-se temperatura do ambiente em torno de 16°C. Depois de, aproximadamente, 14 a 15 h de estocagem sob tais condições (Figura 4.3), as preparações retornaram à cozinha para serem aproveitadas.

Na Tabela 4.8 foram resumidos os registros obtidos, em forma de faixas de temperatura e respectivos tempos a que as sobras do alimento estiveram expostas, durante o resfriamento. No centro geométrico dos recipientes foram registradas temperaturas entre 20 e 49,5°C durante 8h10min, 10h40min e 14h50min, na 1ª, 2ª e 3ª medições, respectivamente.

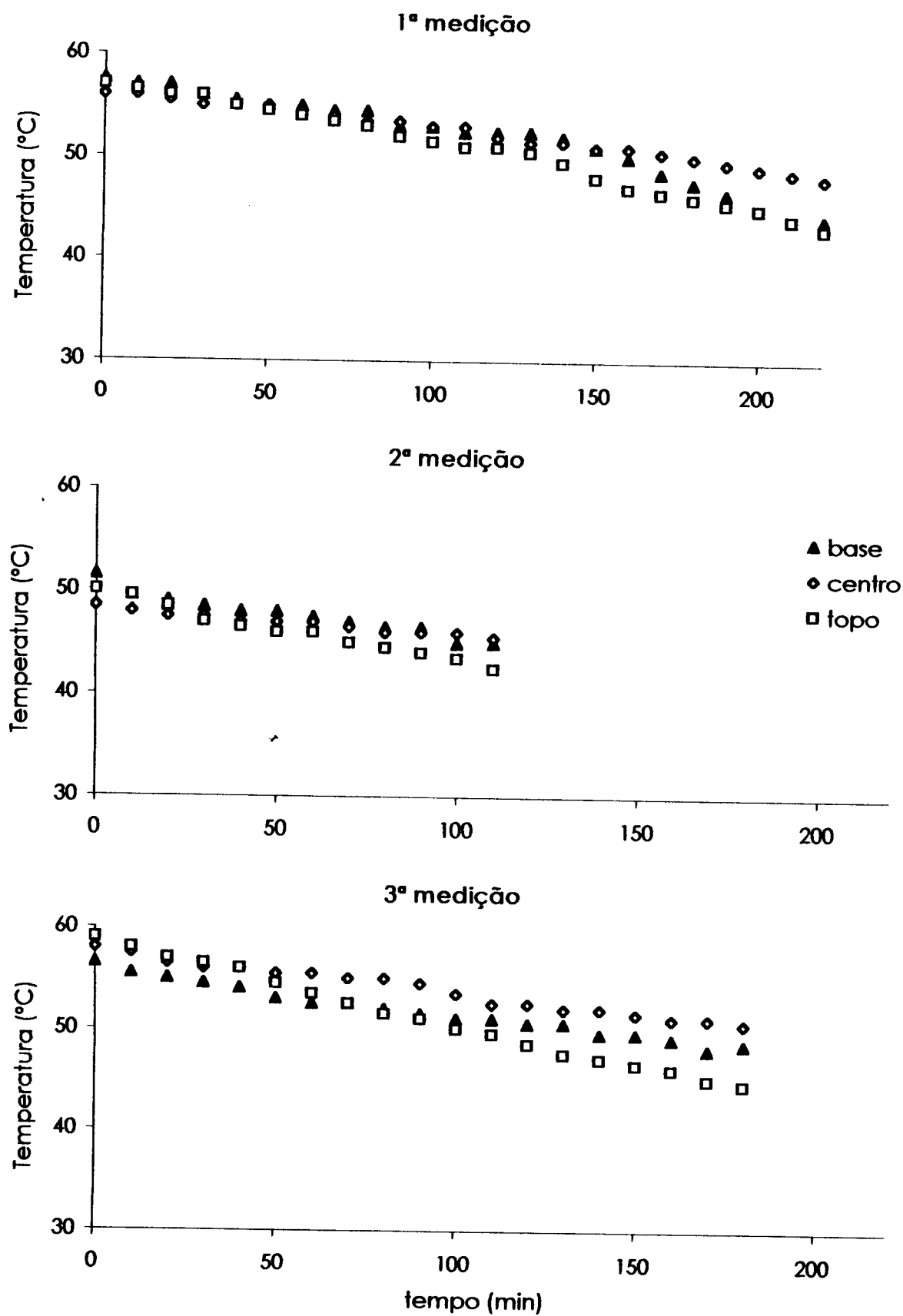


FIGURA 4.2 - Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, durante resfriamento à temperatura ambiente.

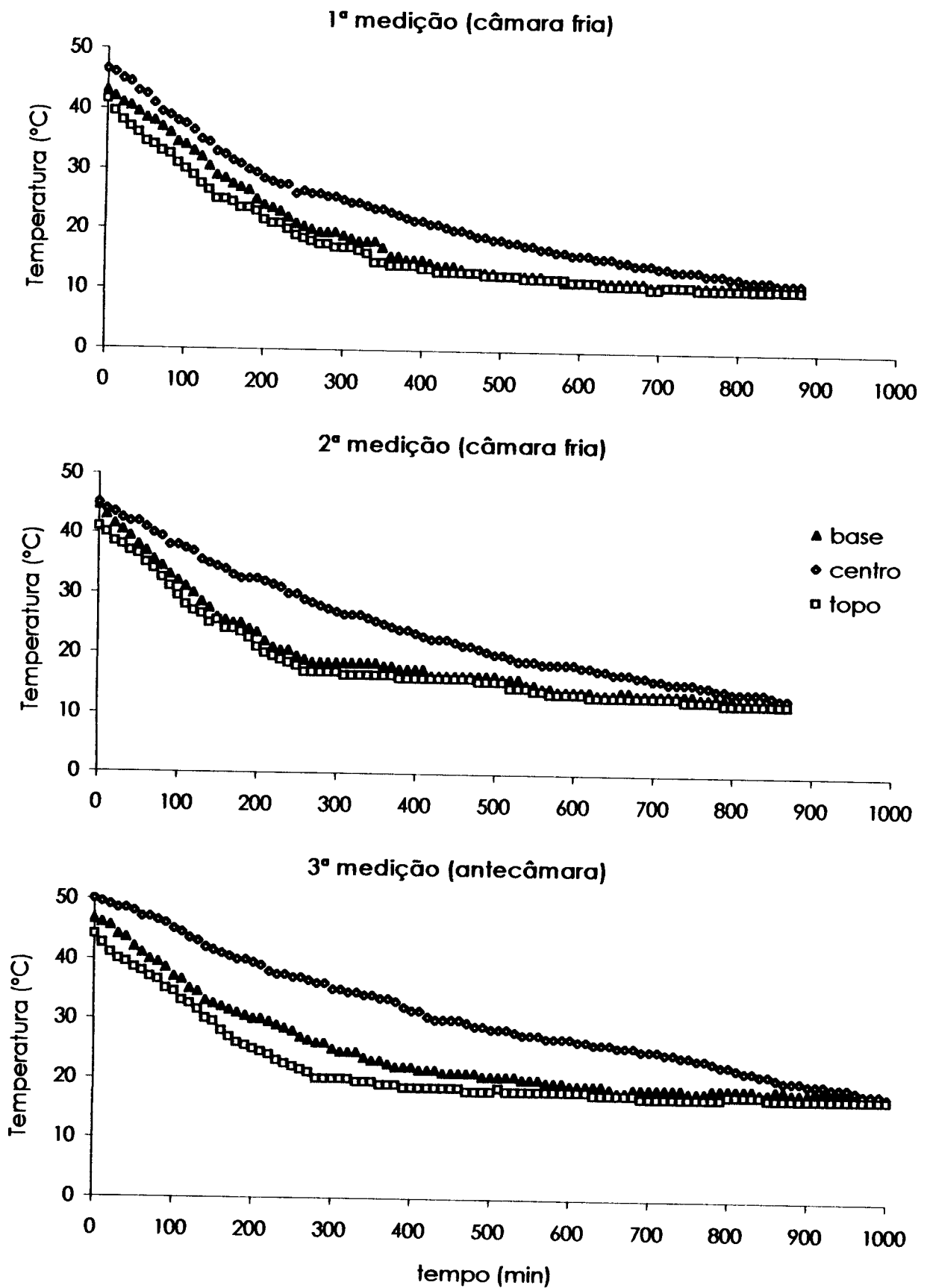


FIGURA 4.3 - Temperaturas tomadas em três pontos de arroz cozido, durante armazenamento.

TABELA 4.8 - Tempos e respectivas faixas de temperatura, tomadas em três pontos de arroz cozido, durante resfriamento

Faixa de temperatura (°C)	Tempo em minutos								
	1ª medição			2ª medição			3ª medição		
	Base	Centro	Topo	Base	Centro	Topo	Base	Centro	Topo
60-79,5	60	0	90	0	0	0	0	30	10
50-59,5	90	190	70	0	0	0	130	160	90
40-49,5	90	100	70	160	200	140	120	190	120
30-39,5	110	120	100	90	180	80	110	270	100
20-29,5	140	270	130	120	260	120	360	430	190
10-19,5	620	430	650	630	360	660	470	110	680

Em qualquer cozinha onde se preparem refeições para números expressivos de comensais, é de se esperar que grandes quantidades de alimentos sobrem e sejam reutilizadas em refeições subseqüentes. No presente caso, aproximadamente 200 kg de arroz cru foram preparados em cada refeição. As sobras do alimento pronto foram, sistematicamente, recolhidas de vários recipientes térmicos, após o término da distribuição, e acondicionadas em grandes quantidades, o que ocasionou seu resfriamento lento. A importância das operações de resfriamento na etiologia de surtos de doenças de origem alimentar foi bem enfatizada por BRYAN (1995). Os fatores contribuintes para a ocorrência de 1.918 surtos, nos Estados Unidos, e outros 1.479, na Inglaterra e País de Gales, foram classificados pelo autor como "vitais", "intermediários" e "triviais". O resfriamento apareceu como o mais importante entre os fatores vitais, contribuindo para 55,1% dos surtos em geral.

É importante observar que as transferências de vasilhames, bem como a própria operação de distribuição, representaram oportunidades de recontaminação do alimento pronto. MOSSO *et al.* (1996) recolheram amostras de 12 cozinhas institucionais, na Itália, procurando avaliar a contaminação ambiental por *B. cereus*, e relataram a presença comum do microrganismo nas

várias superfícies examinadas, propiciando inúmeras possibilidades de contaminação de alimentos preparados. Segundo PFEIFER & KESSLER (1995), *B. cereus* é identificado como um dos maiores problemas em plantas de processamento de alimentos, dada a capacidade de sobrevivência de seus esporos.

A monitoração do armazenamento de sobras de arroz, ilustrativo da rotina de um restaurante institucional, tornou evidentes as chances de recontaminação do alimento pronto, bem como os riscos da multiplicação de *B. cereus*, decorrente de sua exposição a temperaturas abusivas durante longos períodos de tempo.

4.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PROCESSO DE COZIMENTO DE ARROZ NA SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE *B. cereus*

As curvas de destruição térmica (Figura 4.4) permitiram observar efeitos do tratamento térmico a 97,5°C sobre esporos do microrganismo inoculados em meio de arroz. A exposição estendeu-se por até 40 min, de maneira semelhante à operação de cozimento monitorada no Restaurante Universitário. No laboratório, a temperatura máxima alcançada ficou 0,5°C abaixo daquela observada durante o processo de cocção.

De maneira geral, observaram-se reduções nas populações da ordem de dois ou três ciclos logarítmicos, semelhante ao que foi relatado por TURNER *et al.* (1996) descrevendo processo de cozimento de carne de frango a 94°C. Tais resultados permitem admitir que o processo térmico envolvido na preparação de arroz cozido pode resultar em drástica redução da população de *B. cereus*, desde que a incidência se situe em níveis semelhantes aos observados nesta pesquisa (10^2 a 10^3 UFC/g). É de se esperar, portanto, que o alimento possa ser considerado seguro, imediatamente após o processo de cocção, ou se sua conservação, antes de consumo, faz-se em condições tais que a temperatura se mantenha sempre acima de 50°C, limite máximo em que ocorre germinação de *B. cereus* (JOHNSON *et al.*, 1983).

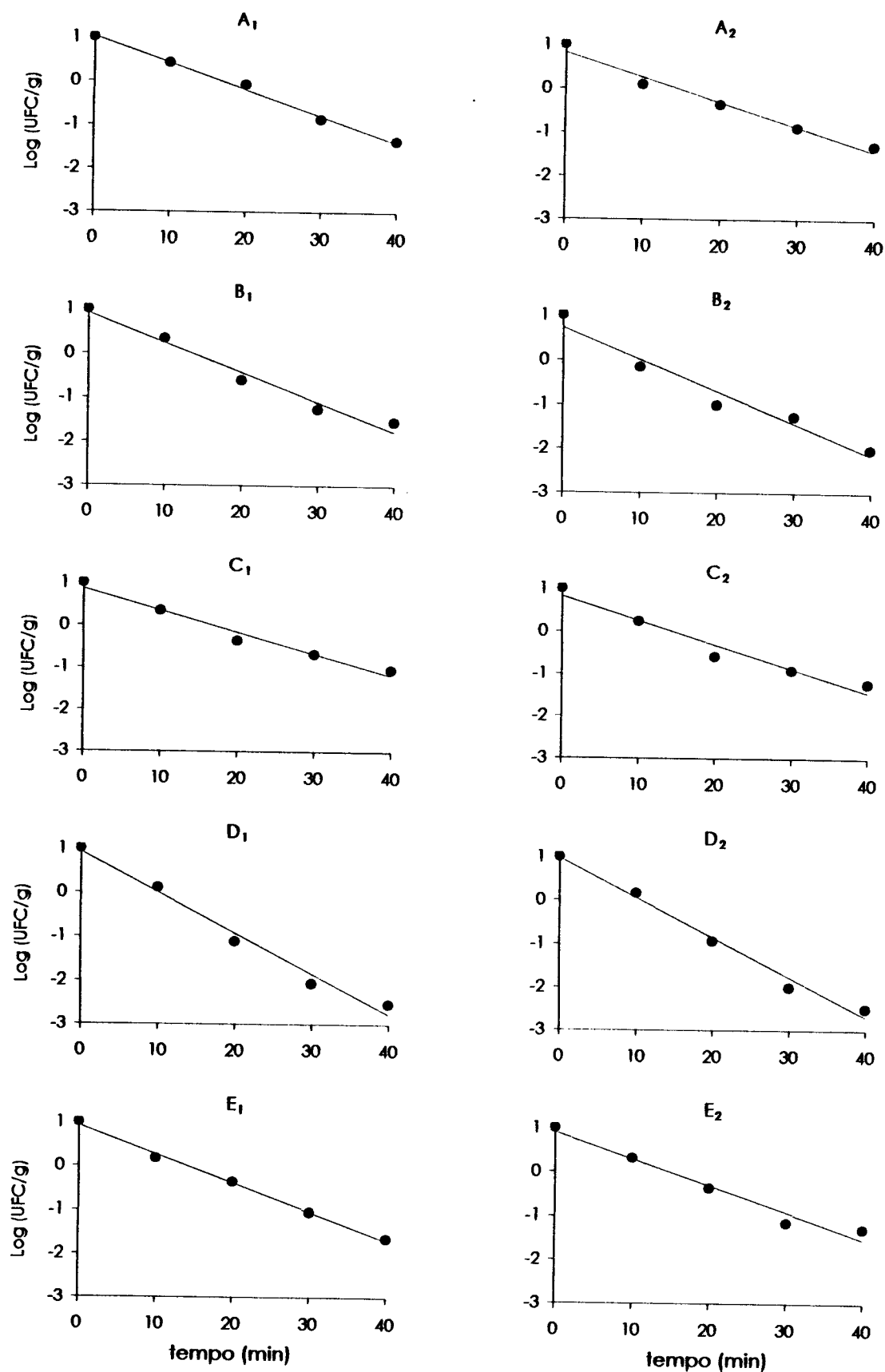


FIGURA 4.4 - Curvas de destruição térmica de esporos de *B. cereus* em meio de arroz, a 97,5 °C: suspensões A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

Os tempos de redução decimal a 97,5°C compõem a Tabela 4.9. Os valores $D_{97,5^\circ\text{C}}$ obtidos para as suspensões A e B retratam o comportamento das populações mistas não refletindo, necessariamente, características individuais dos microrganismos. Como o objetivo primordial desta etapa do estudo foi avaliar os efeitos do processo de cozimento de arroz sobre populações de *B. cereus*, os valores $D_{97,5^\circ\text{C}}$ são ilustrativos da resistência térmica exibida por esporos de diferentes exemplares do microrganismo.

TABELA 4.9 - Resistência térmica de esporos de *B. cereus* em meio de arroz

Suspensões de esporos	$D_{97,5^\circ\text{C}}^*$	r^2
A	17,2	0,9847
B	14,5	0,9639
C	18,6	0,9612
D	10,8	0,9845
E	15,8	0,9820

*Tempos de redução decimal, em minutos a 97,5°C: médias de duas repetições

A resistência térmica da cepa D, de tipo diarreico, foi, notoriamente, inferior às demais. Esta constatação encontra suporte em resultados divulgados por PARRY & GILBERT (1980), que os levaram a concluir pela seletividade do processo de cozimento de arroz para cepas cujos esporos apresentam maior resistência térmica, quase sempre pertencentes ao sorotipo H-1, predominante em surtos eméticos. Maior resistência de cepas eméticas do que diarreicas foi observada por JOHNSON *et al.* (1984). A diversidade entre cepas de *B. cereus*, com relação à resistência térmica, tem sido relatada com freqüência (GILBERT *et al.*, 1974; PARRY & GILBERT, 1980; NOTERMANS & TATINI, 1993; DUFRENNE *et al.*, 1994). Em estudo conduzido por FAILLE *et al.* (1997), foram observados valores $D_{80^\circ\text{C}}$ entre 3 e 209 min, e $D_{90^\circ\text{C}}$ entre 2 e 17 min.

O substrato de aquecimento é outro fator que determina variações na sobrevivência de microrganismos. RAJKOVZKI & MIKOLAJCIK (1987) conduziram estudos em que observaram a ocorrência de uma cepa com variações de $D_{97,5^\circ\text{C}}$ entre 8,2 e 17,6 min, em função do substrato de aquecimento; no mesmo estudo,

a cepa emética NCTC 11143 apresentou variações menos evidentes, exibindo valores $D_{97,5^{\circ}\text{C}}$ entre 8,2 e 9,5 min (respectivamente em solução tampão e água deionizada). DUFRENNE *et al.* (1994), observaram, na mesma cepa de *B. cereus*, variações de $D_{90^{\circ}\text{C}}$ que iam de 25,3 até mais de 200 min.

A resistência térmica de esporos de *B. cereus* em meio de arroz não tem sido alvo de investigações com a mesma frequência com que são feitos estudos em suspensão aquosa ou em meios de cultivo laboratorial. JOHNSON *et al.* (1984) avaliaram a sobrevivência de 4 cepas patogênicas, observando que o meio de arroz beneficiava tanto cepas diarreicas como eméticas, em comparação ao meio de cultivo testado. Esse efeito protetor, contudo, só foi notado quando o arroz foi aquecido a uma taxa de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$, simulando tratamento térmico envolvido na operação de cozimento. CHUNG & SUN (1986) encontraram valores $D_{92^{\circ}\text{C}}$ variando na faixa de 17 a 36 min, estudando a resistência térmica de seis cepas de *B. cereus* em caldo preparado com 20 g de arroz e 1.000 mL de água - meio líquido, que não retratou a composição do meio usado por JOHNSON *et al.* (1983, 1984) nem o que foi adotado no presente trabalho.

O exame das curvas de destruição (Figura 4.4) permite admitir a possibilidade de que esporos particularmente termorresistentes componham as populações sobreviventes. Este fenômeno foi relatado por vários pesquisadores (PARRY & GILBERT, 1980; JOHNSON *et al.*, 1982) e bem evidenciado no estudo conduzido por RAJKOVSKI & MIKOLAJCIK (1987). Estes autores, ao caracterizarem a resistência térmica de esporos de sete cepas de *B. cereus*, observaram ocorrência de caudas ("tails") em quase todas as curvas de destruição, atribuindo-as à variabilidade biológica natural. GONZALEZ *et al.* (1995) também verificaram subpopulações, representando 2% do total, com resistência térmica significativamente maior que o restante da população - ocasionalmente, os tempos de redução decimal da segunda curva chegavam a ser dez vezes maiores que os da primeira porção. A excepcional resistência de populações sobreviventes deve, pois, ser levada em consideração ao se avaliar o efeito letal do processo de cocção. Assim é que, a presença do microrganismo no alimento cozido - seja decorrente da sobrevivência de esporos ou a partir da recontaminação pós-cocção - não deve ser negligenciada.

4.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *B. cereus* EM MEIO DE ARROZ

4.4.1. Crescimento de *B. cereus*, em meio de arroz, a diversas temperaturas

A faixa de temperatura de maior risco para multiplicação de *B. cereus*, observada durante resfriamento de arroz cozido, foi reproduzida ao submeter diferentes exemplares do microrganismo - isolados de arroz e cepas de referência - a estudos do potencial de crescimento, incubando-os a diferentes temperaturas, entre 10 e 45°C.

As curvas de crescimento foram construídas a partir das contagens em placas, segundo tempos específicos de incubação a 10, 15, 22, 30, 37, 43 e 45°C. No total, 70 curvas de crescimento foram geradas e, para facilitar a visualização, seus valores foram normalizados para uma população inicial $N_0 = 10$ UFC/g, de forma que $\text{Log}(N_0) = 1$ (Figuras 4.5 a 4.11).

De maneira geral, as suspensões de esporos inoculadas em meio de arroz, apresentaram respostas semelhantes, tendo sido observadas as maiores variações quando incubadas a 15 e 22°C, fato igualmente notado por RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK (1987). Vale lembrar, também, que os resultados apresentados para as suspensões A e B representam o comportamento das populações mistas de que são compostas.

A Tabela 4.10 contém as taxas máximas do crescimento, correspondentes à fase exponencial ($K_{\max}$), relativas a cada suspensão e temperatura. Os tempos para duplicar as populações (G) foram reunidos na Tabela 4.11, omitindo a observação a 10°C, quando foram observados tempos de geração sempre superiores ao período de incubação, de 72 h.

No ensaio a 10°C o crescimento dos microrganismos de todas as suspensões foi praticamente nulo (Tabela 4.10 e Figura 4.5), o que pode ser atribuído à extensão da fase lag. Esta suposição encontra apoio em observações de RODRIQUEZ & BARRET (1986), que relataram fases lag superiores a 14 dias, a 5°C, em cepas psicrotróficas de *B. cereus*, e de LARSEN & JORGENSEN (1997), que detectaram crescimento de cepas psicrotróficas somente após 8 dias de incubação a 7°C.

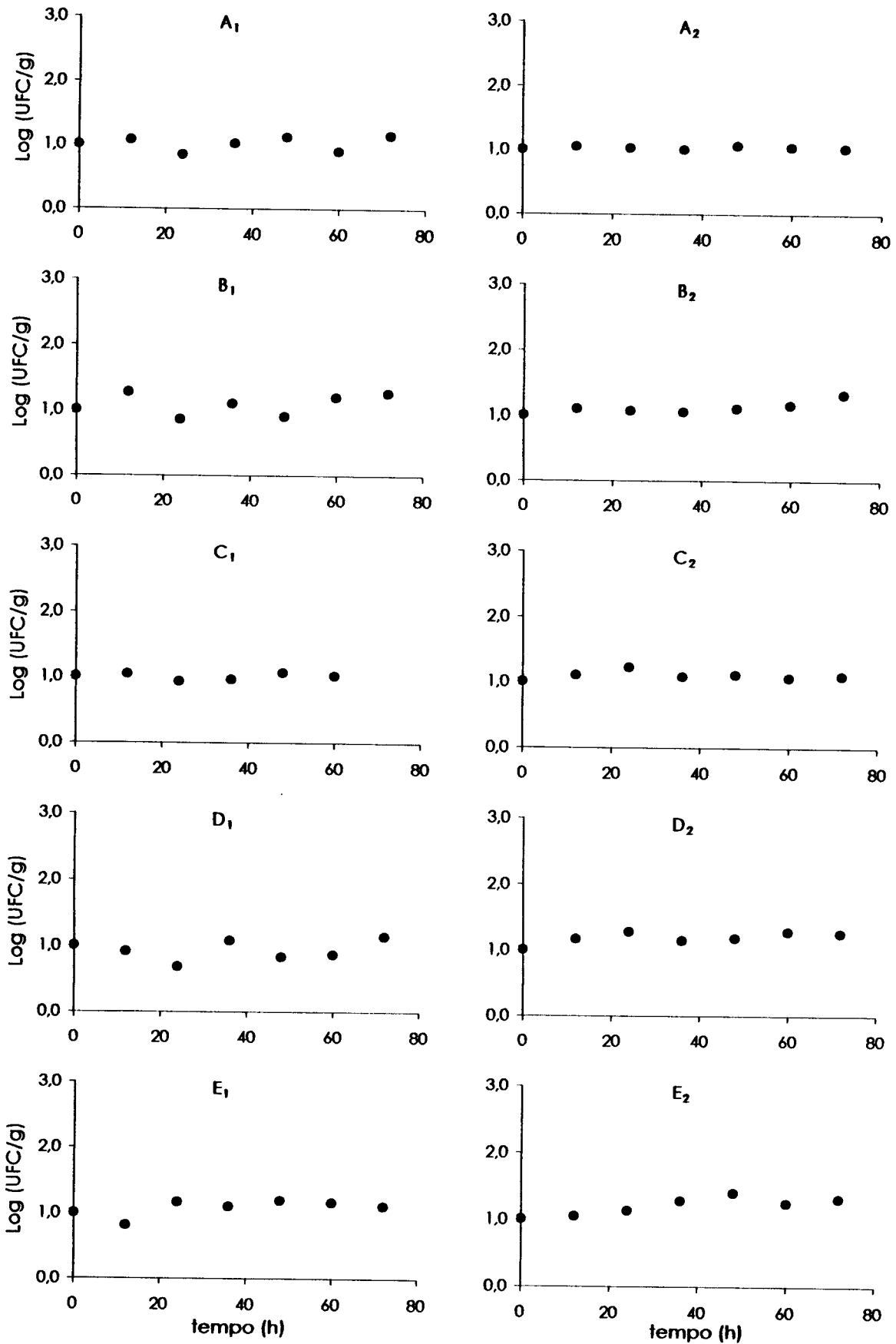


FIGURA 4.5 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 10°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

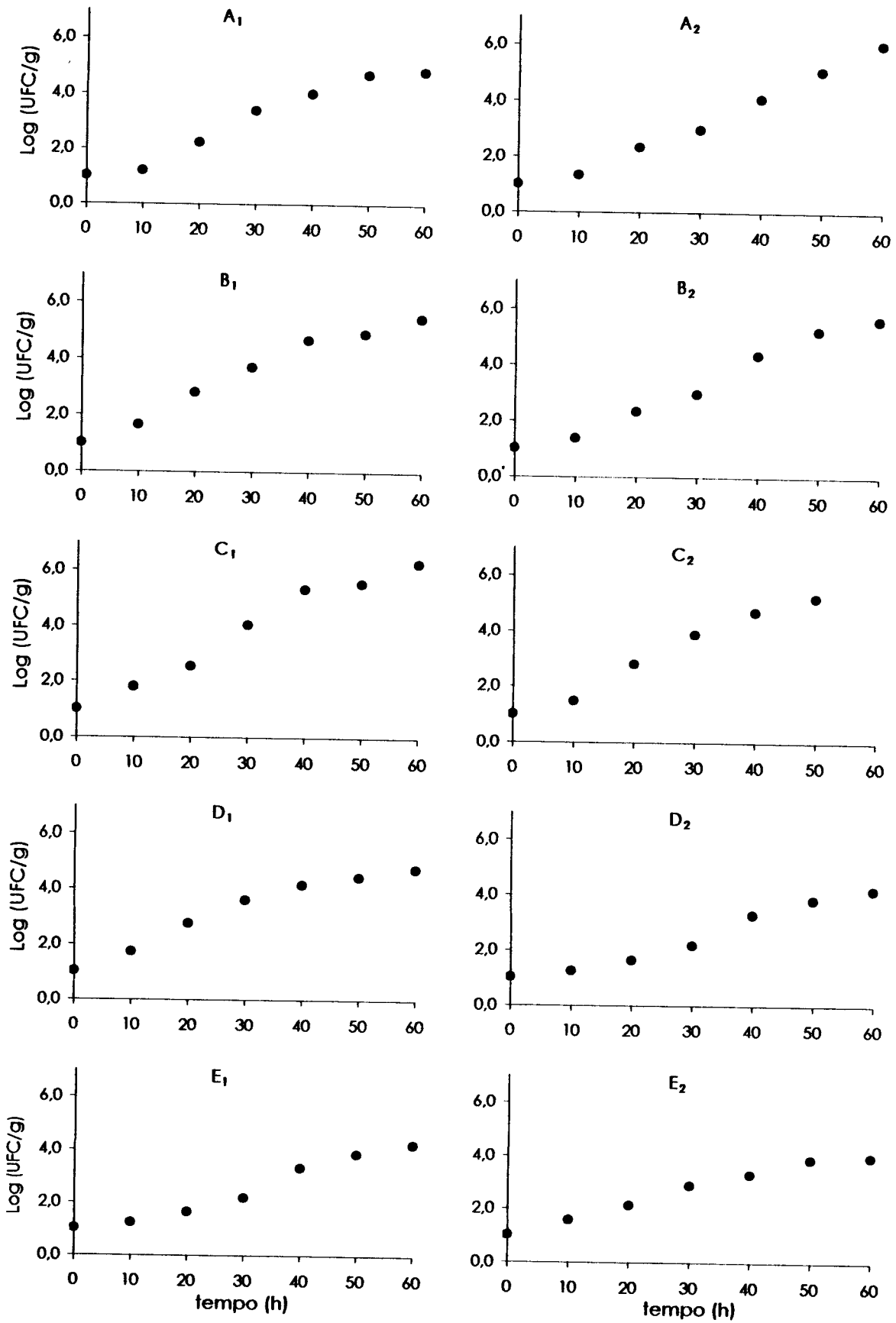


FIGURA 4.6 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 15°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

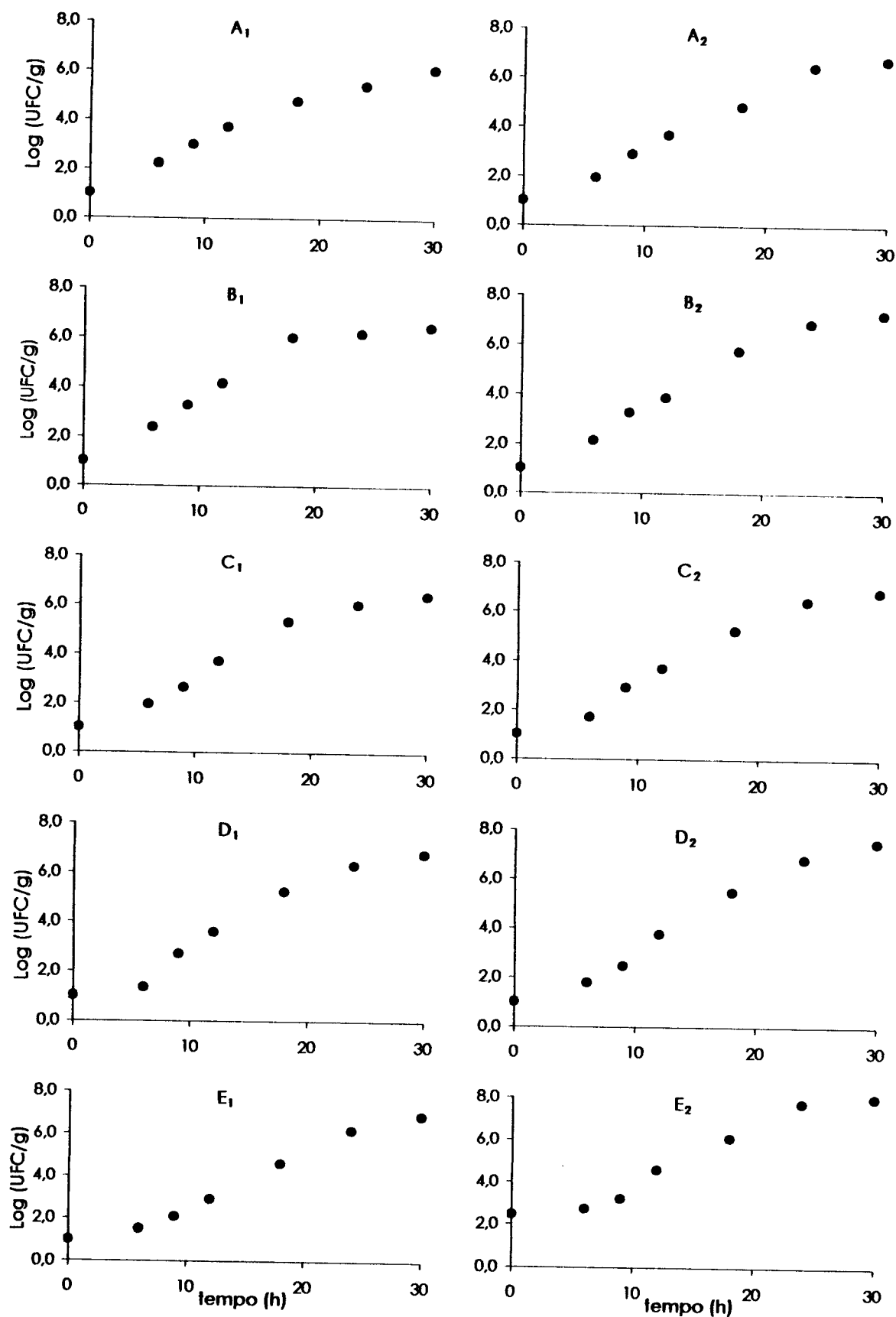


FIGURA 4.7 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 22°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

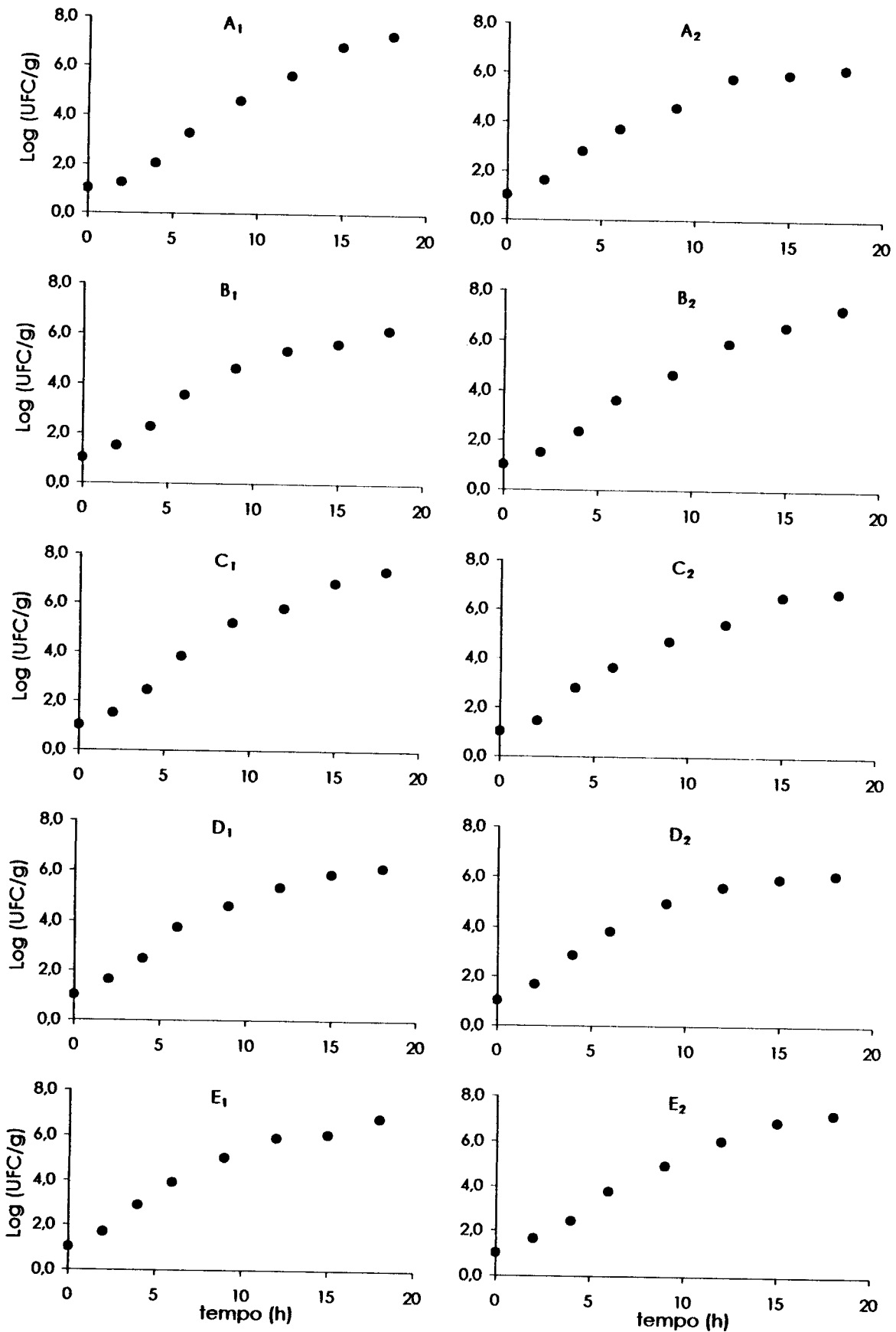


FIGURA 4.8 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 30°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

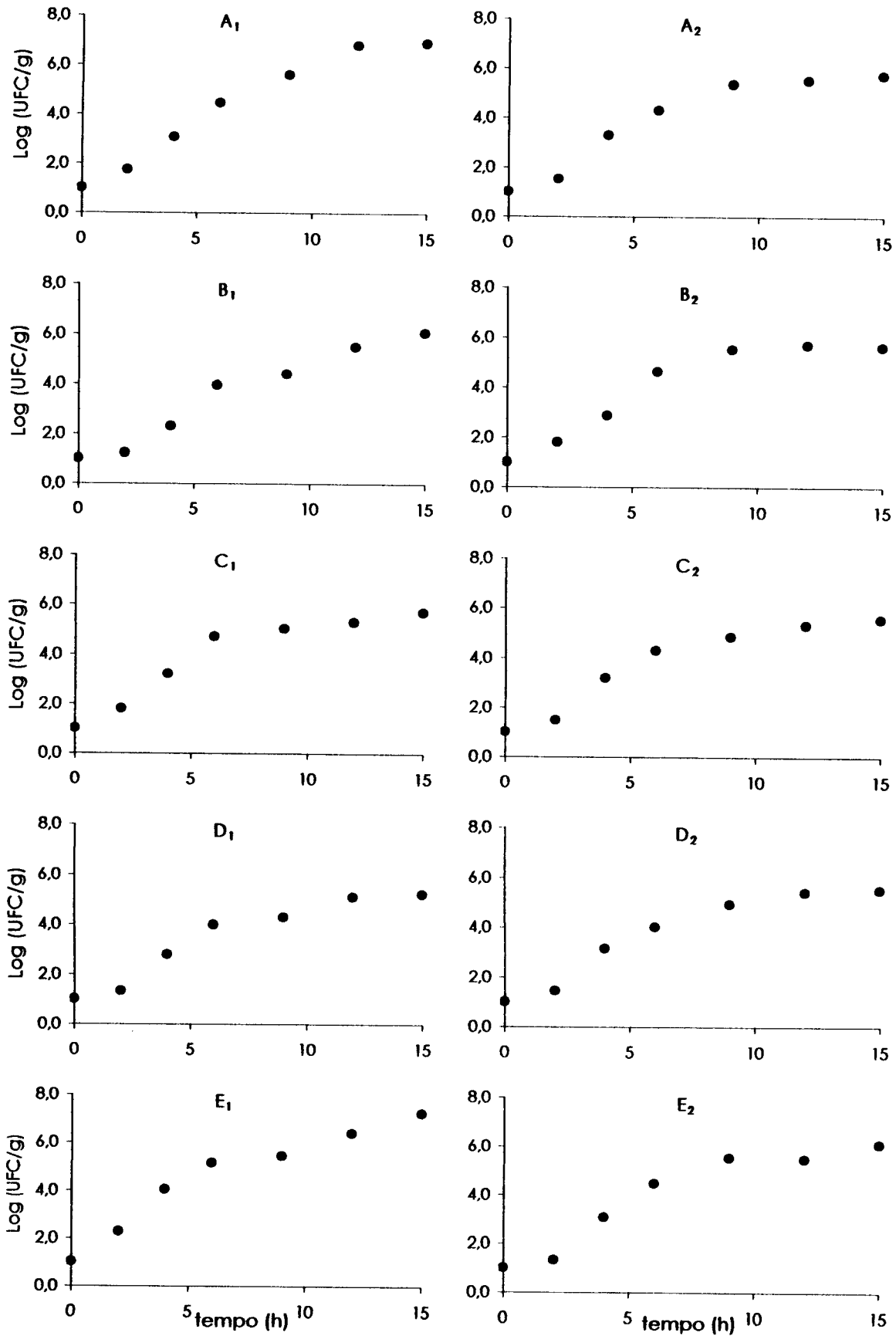


FIGURA 4.9 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 37°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

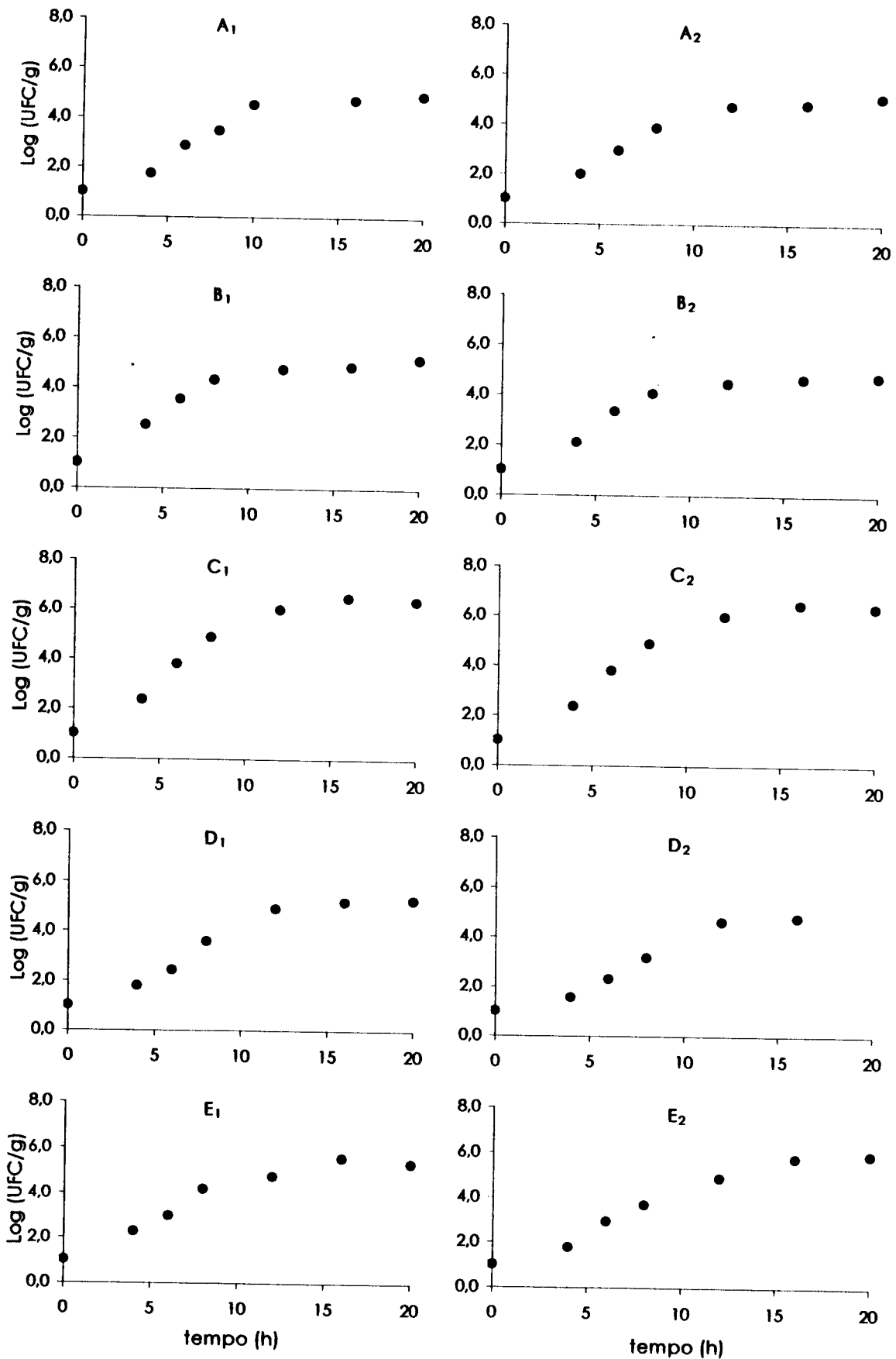


FIGURA 4.10 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 43°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

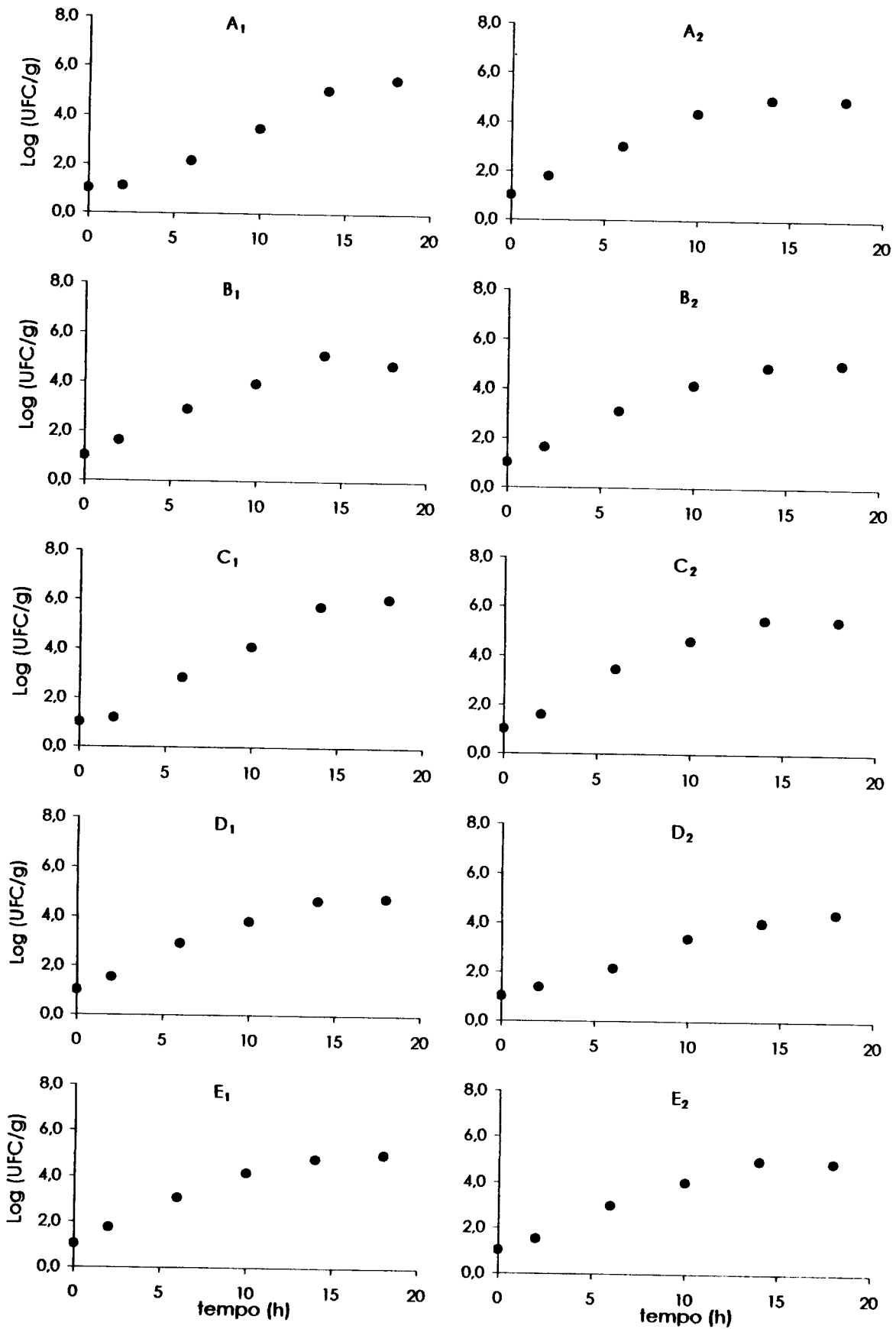


FIGURA 4.11 - Crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, a 45°C: suspensões de esporos A, B, C, D, E e repetições 1 e 2.

A 15°C, entretanto, o crescimento foi bem mais evidente, tendo sido observados aumentos de três ou mais ciclos logarítmicos, após 40 h de incubação, ou até mais de quatro ciclos, após 60 h (Figura 4.6). A suspensão C, particularmente, exibiu aumentos de 3 ciclos dentro de 30 h.

TABELA 4.10 - Taxas de crescimento (K_{max}) de *B. cereus*, em meio de arroz, a diferentes temperaturas

Suspensões de esporos	Temperaturas (°C)						
	10	15	22	30	37	43	45
A	0,0007	0,0917	0,2658	0,5120	0,6859	0,4477	0,3078
B	0,0028	0,098	0,2978	0,5209	0,6955	0,4730	0,3028
C	0,0004	0,1135	0,3115	0,5611	0,7168	0,6109	0,3688
D	0,0021	0,0781	0,3512	0,5317	0,6545	0,4245	0,2684
E	0,0039	0,0633	0,2819	0,5450	0,7544	0,4728	0,3057

* Os valores de K_{max} (h^{-1}) são médias de duas repetições e representam o inverso do tempo no qual as populações crescem um ciclo logarítmico [$K_{max} = (\text{Log}2)/G$, em que G é o tempo de geração].

TABELA 4.11 - Tempos de geração (min) de *B. cereus*, em meio de arroz, a diferentes temperaturas

Suspensões de esporos	Temperaturas (°C)					
	15	22	30	37	43	45
A	197	68	35	26	40	59
B	184	60	35	25	38	60
C	159	58	32	25	29	49
D	231	52	34	28	43	67
E	285	64	33	24	38	59

A 22°C registraram-se taxas de crescimento bastante expressivas, cujas dimensões podem ser avaliadas pelo exame da Figura 4.7 e das Tabelas 4.10 e 4.11. É de se notar que a cepa diarreica (suspensão D), apresentou crescimento mais rápido, a 15 e 22°C, do que o da cepa emética (suspensão E).

As Figuras 4.8 e 4.9 ilustram o crescimento, a 30 e 37°C, relativos às cinco suspensões inoculadas. Quando incubados a estas temperaturas, os

microrganismos alcançaram, de forma geral, suas maiores velocidades de crescimento (Tabelas 4.10 e 4.11). Além disso, o comportamento das diferentes suspensões foi bastante uniforme. A 30°C foram atingidas as maiores populações, da ordem de 10^9 microrganismos/g, porém as maiores velocidades de crescimento foram observadas a 37°C, registrando-se aumentos nas contagens que evidenciaram crescimentos superiores a 4 ciclos logarítmicos após apenas 9 h. A suspensão E, contendo a cepa emética, apresentou a maior taxa de crescimento do experimento, exatamente a 37°C (Tabela 4.10).

Foi possível verificar que, às temperaturas de 43 e 45°C, os esporos germinaram rapidamente e começaram a se multiplicar após curtos períodos de fase lag (Figuras 4.10 e 4.11), de forma semelhante ao que ocorreu a 37°C. As populações, contudo, não atingiram números tão grandes como observados a 30 e 37°C.

A 45°C, os halos de precipitação de lecitina que circundavam as colônias tornaram-se esmaecidos, ficando praticamente imperceptíveis nas placas onde cresceram as suspensões A, B, e D. RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK (1987) verificaram comportamento semelhante, observando que apenas cepas eméticas produziram lecitinases a essa temperatura.

As populações máximas alcançadas neste experimento estão em acordo com BENEDICT *et al.* (1993), que relataram densidades máximas entre 10^7 e 10^9 UFC/g em estudos de crescimento de *B. cereus*, a temperaturas entre 12 e 42°C. Foi possível constatar que, quando as contagens ultrapassavam 10^7 UFC/g, o meio de arroz apresentava sinais de deterioração, perceptíveis em forma de odor desagradável e formação de coloração amarelada, bem como alterações de viscosidade. Observações semelhantes foram relatadas por VIJAYALAKSHMI *et al.* (1981), incluindo detecção de odores típicos de reações de proteólise, em arroz contaminado com $\geq 10^7$ microrganismos/g.

É amplamente reconhecida a importância de fatores que afetam o crescimento de microrganismos, para o desenvolvimento de métodos de controle aplicáveis ao processamento e estocagem de alimentos. BAKER & GRIFFITHS (1993) provaram que a temperatura e a atividade de água são os principais determinantes tanto do crescimento de *B. cereus* como da produção de toxinas. FERMANIAN *et al.* (1994) chamaram atenção para grande

diversidade entre cepas e relataram, ainda, que os tempos de geração diminuíram em razão inversa das temperaturas de incubação, entre 20 e 42°C, enquanto aumentaram proporcionalmente à elevação da temperatura, de 42 até 46°C. Resultados obtidos por diversos pesquisadores foram reunidos por SUTHERLAND *et al.* (1997) e evidenciaram diferenças em valores G, obtidos a 15 e 30°C, variando entre 0,3 e 8,3 h, em função do substrato de crescimento.

O uso do meio de arroz, contendo 1,15% de sal e 0,38% de alho – que reproduz a preparação como é feita no Restaurante Universitário e, possivelmente, em grande parte dos domicílios brasileiros – resultou em submeter os microrganismos a esses dois agentes potencialmente inibitórios para seu crescimento. RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) observaram que o efeito inibidor do extrato de alho foi menos evidente quando os microrganismos cresceram em meio de arroz. Resultados obtidos por SALEEM & AL-DELAIFY (1982) permitem supor que o efeito da alicina (substância responsável pelo efeito inibidor) seja suprimido pelo processo de cozimento. Segundo estes pesquisadores, meios contendo 3% de alho inibiram em cerca de 30% o crescimento de *B. cereus*; contudo, após exposição durante 5min a 80 ou 90°C, a atividade da alicina foi totalmente destruída. Com relação ao cloreto de sódio, SHARMA & DOGRA (1983) notaram que concentrações acima de 1% inibiram a multiplicação de algumas cepas de *B. cereus* em meio de cultivo, ainda que até a 2% seu efeito tenha sido pouco significativo. Estudos de cinética de crescimento, conduzido em experimento fatorial no qual as variáveis foram temperatura, pH e percentuais de NaCl e de nitrito, levaram BENEDICT *et al.* (1993) a observar que o meio com 0,5% de sal de cozinha, sem adição de nitrito, permitiu o crescimento de *B. cereus* em todas as faixas de temperatura e pH testados e que, mesmo usando 2,5% de NaCl, o crescimento ocorreu, a 42°C, com um tempo de geração de 20 min. Ficou evidente que concentrações maiores do que 2,5% de sal apenas reduziram a faixa de temperatura de crescimento e a tolerância do microrganismo a baixos valores de pH.

Uma vez que, na presente pesquisa, o meio de arroz adotado foi submetido à autoclave por 15 min, pode-se concluir que nenhuma atividade inibitória tenha sido exercida pelo alho usado na formulação do meio. Assim também, o processo de cozimento do arroz – em cozinhas industriais ou em residências – provavelmente determina a destruição do princípio ativo desse

ingrediente. Da mesma forma, a concentração de sal utilizada, que retrata uma prática comum, não se caracteriza sensivelmente inibitória para o crescimento de *B. cereus*.

Os resultados obtidos reproduziram observações de GILBERT *et al.* (1974), com relação a ensaios de crescimento de *B. cereus* desenvolvidos a 22, 30 e 37°C. Entretanto, a 43°C, estes autores relataram taxas de crescimento muito reduzidas, que não se repetiram no presente estudo. Por outro lado, JOHNSON *et al.* (1983) observaram crescimento expressivo de uma cepa emética, em meio de arroz, a 45°C. Entre as cepas caracterizadas por FERMANIAN *et al.* (1994), nenhuma cresceu a 50°C, mas a 46°C foi registrada multiplicação de todas as oito cepas estudadas, com menção especial para o ativo crescimento da cepa emética NCTC 11143. À luz desta observação, vale destacar o comportamento da suspensão C, preparada com um exemplar de biótipo 6, para a qual se registraram os menores tempos para duplicar as populações, a 43 e 45°C (Tabela 4.11). Esta foi uma das cepas amilase-negativas identificadas nesta pesquisa, característica comum a tipos eméticos de *B. cereus*.

As respostas de crescimento a 37°C, com os valores de G variando entre 24 e 28 min, revelaram-se semelhantes às obtidas por outros pesquisadores. VIJAYAILAKSHMI *et al.* (1981) relataram aumentos de 5 ciclos, em 10 h, em arroz cozido. Em meio de cultivo laboratorial, contendo 0,5% de sal, e usando mistura de três cepas de *B. cereus*, BENEDICT *et al.* (1993) calcularam em apenas 15 min o tempo para duplicar as populações a 37°C.

Os tempos de geração a 30°C, entre 32 e 35 min (Tabela 4.11), foram semelhantes aos determinados por GILBERT *et al.* (1974), que observaram, a 30°C, a maior velocidade do crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, registrando tempos de geração entre 26 e 31 min. A temperaturas próximas de 30°C, WONG *et al.* (1988b) chegaram a registrar aumentos de 8 ciclos em apenas 8 h, em leite e, a 32°C, FERMANIAN *et al.* (1994) observaram valores de G variando de 21 a 26 min, entre oito cepas potencialmente patogênicas. BECKER *et al.* (1994) registraram aumentos de cinco a sete ciclos log após 12 h de incubação a 27°C. SUTHERLAND *et al.* (1996) publicaram resultados de diversos autores que situaram o tempo para duplicar a população a 30°C entre 26 e 48 min, segundo diferentes cepas e substratos de crescimento.

Dados publicados confirmam, geralmente, o que foi observado no decorrer destes experimentos, com referência ao crescimento a 22°C. Investigando o potencial de crescimento de *B. cereus* em arroz cozido, GILBERT *et al.* (1974) observaram que, incubadas a 22°C por 18 h, as populações chegaram a aumentar mais de quatro ciclos logarítmicos. PARRY & GILBERT (1980) relataram aumentos de quatro a cinco ciclos, após 18 h, para oito cepas que foram cultivadas em meio de arroz. RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK (1987) registraram tempos de geração, a 21°C, em faixa bem ampla, entre 77 e 222 min. Uma vez que temperaturas próximas a 22°C são freqüentemente registradas em nossos ambientes, fica evidente o risco de multiplicação de *B. cereus* em preparações de arroz mantidas sem refrigeração.

O crescimento a 15°C, cuja variação nos tempos de geração foi de 159 a 285 min (Tabela 4.11), encontrou apoio em citações recentes de SUTHERLAND *et al.* (1996), que situaram esses tempos entre 180 e 260 min, em meio de arroz. Anteriormente, RAJKOWSKY & MIKOLAJCIK (1987) observaram valores maiores, em meios de cultivo, de 5 a 8,33 h, ao caracterizar 7 cepas de *B. cereus*. A observação da capacidade de multiplicação de *B. cereus* a temperaturas próximas de 15°C comprovou vários relatos que denunciaram a detecção de altos níveis de contaminação em preparações de arroz conservadas em condições inadequadas de refrigeração (HARMON & KAUTER, 1991; BRYAN *et al.*, 1997; JERMINI *et al.*, 1997; SIMONE *et al.*, 1997). O crescimento é favorecido por adição de proteínas, segundo citação de KRAMER & GILBERT (1989), o que seria um fator agravante à exposição a temperaturas de abuso. Arroz-doce, sobremesa adicionada de leite, comum em nosso meio, já foi encontrada com expressiva contaminação por *B. cereus* (PENNA *et al.*, 1989).

Exemplares típicos de *B. cereus* não crescem a temperaturas iguais ou menores do que 10°C, porém têm sido isoladas cepas psicrótróficas, capazes de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração (DUFRENNE *et al.*, 1994, 1995). Evidências de que essa não é uma característica comum foram mostradas por GILBERT *et al.* (1974), ao relatarem que duas cepas patogênicas e uma isolada de alimento não cresceram a 10°C, em meio de arroz. A 12°C, BENEDICT *et al.* (1993) observaram extensa fase lag, em meio com 0,5% de NaCl e pH 6,5, assinalando tempos de geração superiores a 7 h; estes mesmos autores não

observaram crescimento de *B. cereus* à temperatura de 8°C. NOTERMANS & TATINI (1993) perceberam que o meio de arroz favoreceu a germinação de esporos de *B. cereus* a temperaturas abaixo de 10°C, ainda que o crescimento seja uma ocorrência rara. Estes autores citaram BUCK *et al.* (1992), que observaram estímulo à germinação quando, antes da incubação a temperaturas baixas, o alimento contaminado passava por um período de algumas horas a temperaturas mais altas, semelhantemente ao que ocorreu quando, no Restaurante Universitário, a manutenção em recipientes térmicos foi seguida de resfriamento.

A alta frequência de cepas psicrotróficas em leite levou ZWIETERING *et al.* (1996) a usar modelo matemático para estimar populações de *B. cereus* no momento do consumo. Simulando exposição de leite à temperatura constante de 12°C, concluíram que, após 44 h, seria possível o aumento populacional de até cinco ciclos logarítmicos, confirmando riscos de intoxicações causadas por cepas capazes de se multiplicar a temperaturas de refrigeração. A crescente procura por alimentos prontos para consumo, conservados pelo frio, a reduzida vida útil das comidas refrigeradas e a própria dificuldade em se manter a temperatura dentro de limites seguros, resultam em potencial exposição dos consumidores a perigos de origem microbiana, situação em que se enquadram preparações de arroz contaminadas por *B. cereus*.

4.4.2. Modelo para estimar o crescimento de *B. cereus* em meio de arroz

A Equação 2 (ZWIETERING *et al.*, 1991), ajustada aos valores experimentais (K_{max}), possibilitou a obtenção de valores estimados para taxas de crescimento em função da temperatura, $K(T)$, aplicáveis a quaisquer pontos situados no intervalo onde é possível o crescimento dos microrganismos de cada suspensão (Figura 4.12). Os parâmetros obtidos pelo ajuste, referentes a cada suspensão de esporos, foram reunidos na Tabela 4.12.

Foi possível, de posse dos valores estimados de $K(T)$, traçar as curvas preditivas do crescimento de *B. cereus* em arroz cozido (Figura 4.13), mediante simulação da exposição do alimento a duas condições de resfriamento, que reproduziram medições feitas no restaurante onde a pesquisa se ambientou.

Foram utilizados tempos e temperaturas conforme observados no centro geométrico dos recipientes (Figura 4.5).

TABELA 4.12 – Parâmetros a ($^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-1/2}$), b ($^{\circ}\text{C}^{-1}$), $T_{\min}$ e $T_{\max}$ ($^{\circ}\text{C}$), e respectivos desvios padrões (σ), estimados pelo ajuste do modelo 'Ratkowsky 3' aos valores experimentais de $K_{\max}$

Suspensões de esporos	Parâmetros							
	a	σ_a	b	σ_b	$T_{\min}$	$\sigma_{T_{\min}}$	$T_{\max}$	$\sigma_{T_{\max}}$
A	0,0379	0,0082	0,071	0,036	7,1	2,1	47,17	0,47
B	0,0355	0,0058	0,081	0,031	6,0	1,9	47,07	0,39
C	0,0306	0,0043	0,128	0,046	4,0	2,3	47,18	0,05
D	0,057	0,041	0,024	0,036	7,7	2,5	47,51	0,71
E	0,043	0,011	0,068	0,039	8,6	2,3	46,87	0,45

Na primeira medição, referente à estocagem em câmara fria, o resfriamento, de 45°C a $11,5^{\circ}\text{C}$, estendeu-se por 14h 20min, até que o alimento foi levado à cozinha para reutilização. Idêntico intervalo de tempo foi adotado para construção da segunda curva, de forma que, neste caso, a temperatura final alcançou 19°C , em processo de resfriamento evidentemente mais lento. Essas curvas preditivas são ilustrativas do que pode ocorrer quando arroz cozido, contaminado com apenas 1 microrganismo/g, for exposto a tais condições de resfriamento.

A Tabela 4.13 foi compilada com os valores preditos para as populações finais de *B. cereus*, após os períodos correspondentes às duas situações de resfriamento. No primeiro caso, quando foram preditos crescimentos de *B. cereus* simulando resfriamento em câmara fria a uma taxa média de $2,34^{\circ}\text{C}/\text{h}$, os níveis populacionais, depois de 14h20min, foram estimados, segundo variações entre suspensões, de $5,43 \times 10^3$ a $1,81 \times 10^4$ UFC/g. Quando se simulou resfriamento mais lento, na antecâmara, à taxa média de $1,81^{\circ}\text{C}/\text{h}$, as populações finais preditas variaram entre $2,60 \times 10^6$ e $1,13 \times 10^7$. Portanto, nas condições de resfriamento mais lento, mesmo que a temperatura ambiente tenha se situado em torno de 16°C , o alimento mostrou-se virtualmente propício a suportar níveis de

contaminação considerados perigosos, em vista de sua associação epidemiológica com surtos de intoxicações alimentares, diarreicas ou eméticas (KRAMER & GILBERT, 1989; SNYDER & POLAND, 1991; HARMON *et al.*, 1992).

Pelo exame das curvas de ajuste (Figura 4.12), que levaram à obtenção dos valores $K(T)$, pode-se verificar que incluem toda a faixa de temperatura testada e seus traçados revelam evidente adequação ao propósito de descrever o comportamento esperado para as diferentes suspensões de microrganismos. Os autores que propuseram o modelo (ZWIETERING *et al.*, 1991) conduziram comparações entre diversos modelos desenvolvidos para descrever o crescimento de microrganismos em função da temperatura. A equação 'Ratkowsky 3' foi, então, considerada a mais apropriada.

A semelhança entre as curvas, observada na Figura 4.13, revelou que os microrganismos estudados apresentaram comportamento bastante uniforme. É possível sugerir que as suspensões A e B, preparadas com misturas de esporos escolhidos aleatoriamente entre os isolados de arroz, possam, eventualmente, representar o padrão de comportamento de populações típicas de arroz. A observação dos resultados relativos à suspensão C, que nos dois conjuntos de curvas preditivas está representada pelo traçado superior, indicativo de maior rapidez de crescimento, parece sugerir a possibilidade de ocorrência de cepas melhor adaptadas ao meio, mas os resultados obtidos não podem ser considerados conclusivos a respeito dessas possíveis diferenças.

TABELA 4.13 – Valores preditos para populações finais de *B. cereus*, por grama de arroz cozido, mediante simulação de duas condições de resfriamento. Populações iniciais hipotéticas: 1 microrganismo/g

Suspensões de esporos	Resfriamento 1	Resfriamento 2
A	$5,43 \times 10^3$	$2,60 \times 10^6$
B	$8,71 \times 10^3$	$4,26 \times 10^6$
C	$1,81 \times 10^4$	$1,13 \times 10^7$
D	$1,07 \times 10^4$	$5,36 \times 10^6$
E	$6,96 \times 10^3$	$6,97 \times 10^6$

Resfriamento 1 – durante 14h20min a temperatura decaiu de 45°C a 11,5°C
 Resfriamento 2 – durante 14h20min a temperatura decaiu de 45°C a 19°C

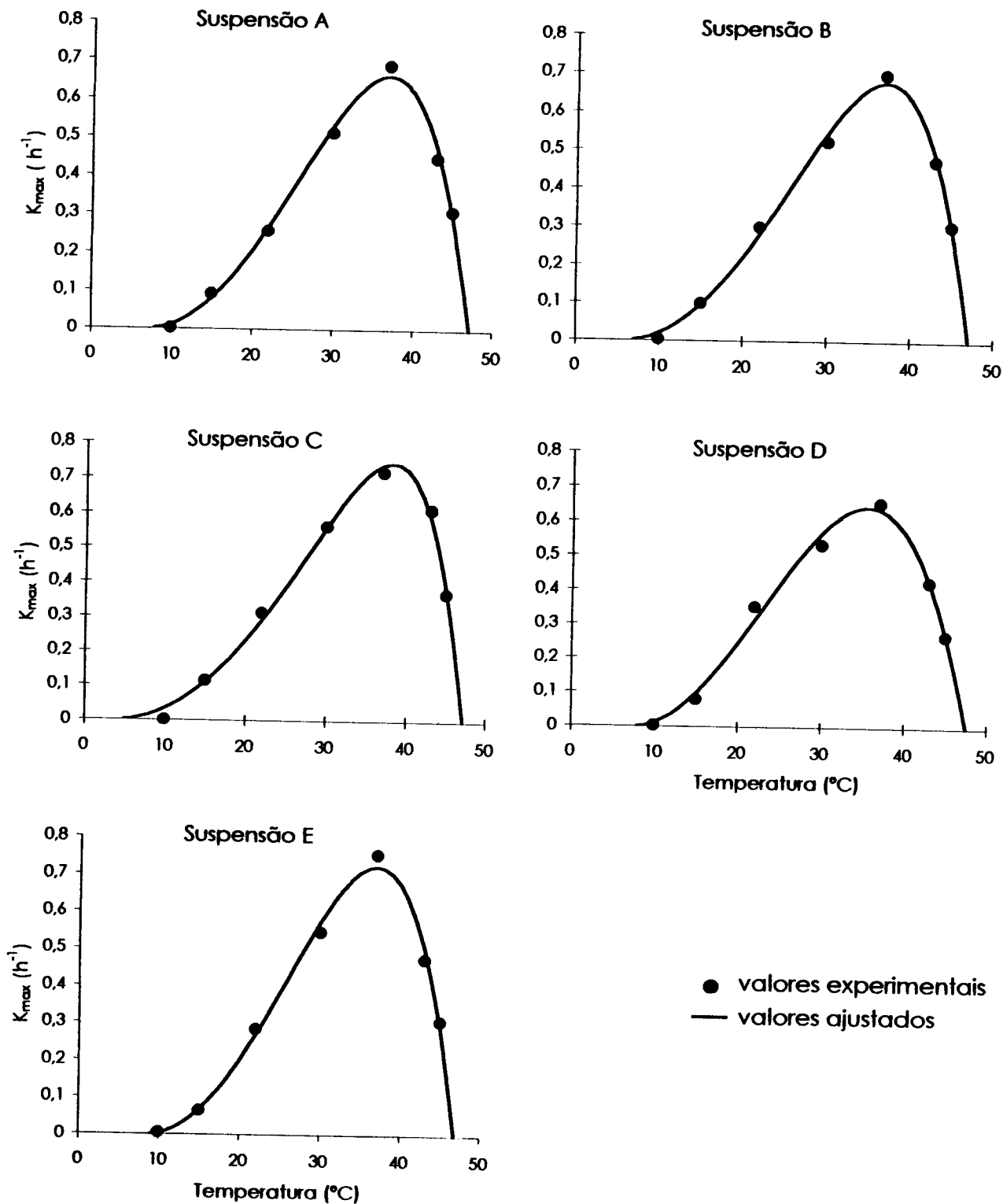


FIGURA 4.12 - Taxas de crescimento de *B. cereus* em meio de arroz, modeladas com a equação 2 (Ratkowsky 3).

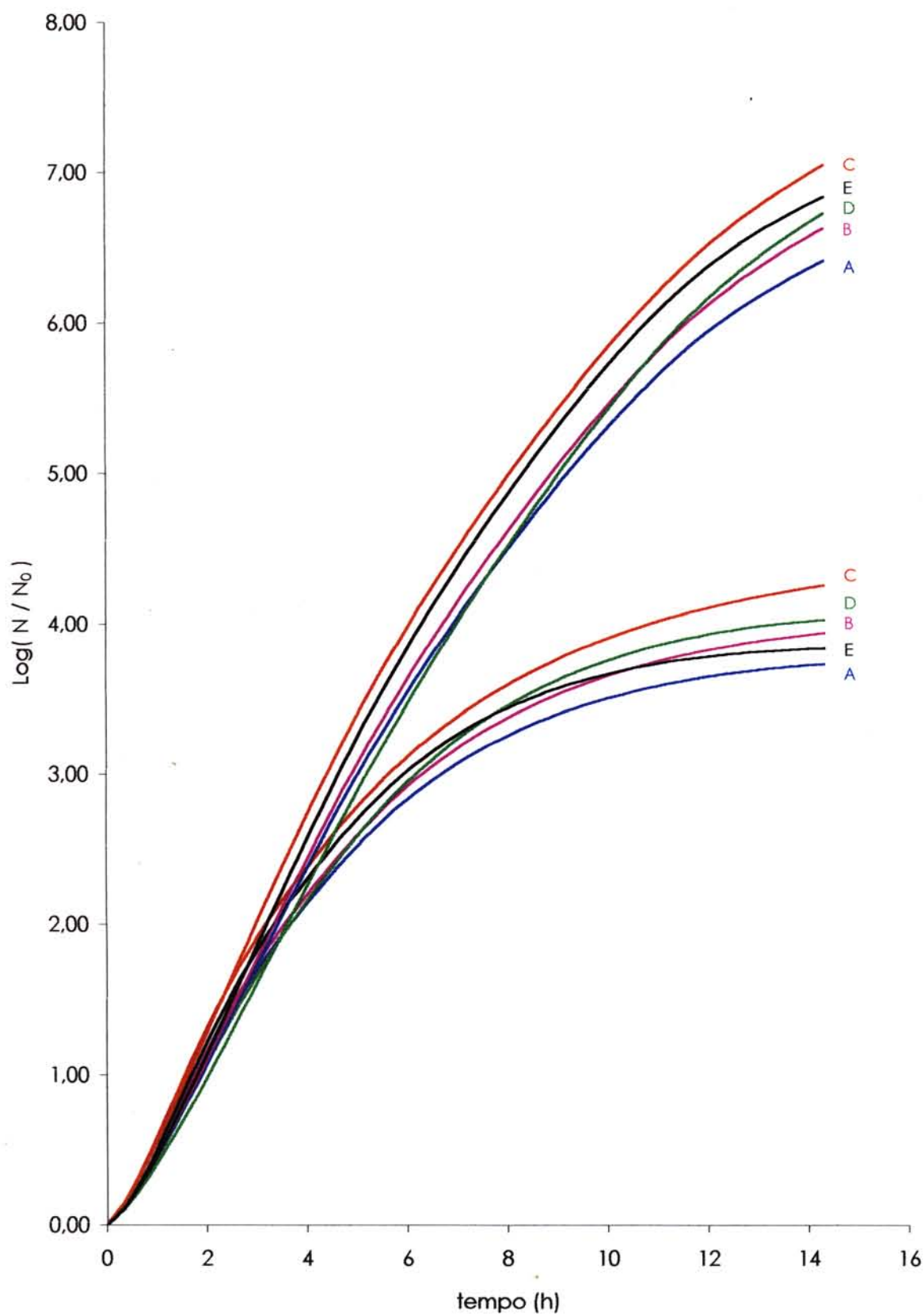


FIGURA 4.13 - Curvas preditivas do crescimento de *B. cereus* em meio de arroz (suspensões de esporos A, B, C, D e E). As curvas superiores referem-se a resfriamento em antecâmara, e as inferiores em câmara refrigerada.

O hábito de se manter o alimento pronto à temperatura ambiente contribui para aumentar os riscos da multiplicação de *B. cereus* até níveis perigosos. É preciso notar que não houve, nas duas condições simuladas, armazenamento em tais condições, o que se pode afirmar seria extremamente mais propício à rápida multiplicação e ao alcance de ainda maiores populações, fato constatado por BRYAN *et al.* (1997) e JERMINI *et al.* (1997). Populações de *B. cereus* próximas de 10^7 UFC/g foram observadas em amostras de arroz mantidas por várias horas a 26°C, recolhidas de cantinas universitárias, segundo relato de HARMON & KAUTER (1991).

O uso de equações matemáticas para descrever o comportamento microbiano tem recebido, desde a década passada, considerável atenção, e mesmo anteriormente, a partir dos anos 40, alguns trabalhos foram desenvolvidos, conforme citações de ROSS (1993). O conceito de microbiologia preditiva parte da suposição de que respostas de microrganismos a fatores do meio podem ser expressas por equações matemáticas (ROSS & McMEEKIN, 1994; SKINNER *et al.*, 1994). A modelagem preditiva tem sido proposta de forma a reduzir gastos com tempo e materiais normalmente despendidos em experimentos de laboratório (BUCHANAN & WHITING, 1996). Tal prática, entretanto, tem sido vista com suspeita por aqueles que consideram temerário extrapolar dados obtidos em condições laboratoriais para alimentos, sistemas complexos que determinam respostas variáveis em organismos igualmente complexos (ROBERTS, 1997). Quando RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) usaram modelos empíricos, baseados em meios de cultivo laboratorial, para estimar o crescimento de *B. cereus*, constataram que os valores preditos foram inferiores aos verificados experimentalmente, em meios de arroz e de carne. Na presente pesquisa, porém, os dados foram obtidos a partir de substrato que reproduz uma preparação rotineira de arroz, o que contribui para a confiabilidade das estimativas.

Uma vez que as equações ajustadas permitiram estimar a multiplicação de diferentes cepas de *B. cereus* em ampla faixa de temperatura, sua aplicação estende-se, potencialmente, a quaisquer condições de resfriamento observadas em operações de conservação de arroz cozido.

5. CONCLUSÕES

Conduzida com o propósito de contribuir para a estimativa de riscos de intoxicações por *B. cereus* veiculadas por arroz, esta pesquisa desenvolveu-se, basicamente, quantificando fatores que contribuem para a exposição dos consumidores a níveis perigosos de contaminação pelo microrganismo. Os resultados obtidos apresentam potencial de uso aplicável ao segmento de restaurantes e é extensível a ambientes domésticos.

- Os níveis de contaminação por *B. cereus*, em 60 amostras de arroz cru, verificados entre 1×10^2 e $1,76 \times 10^3$ UFC/g, não foram suficientemente altos para caracterizar risco à saúde. A presença de pequena porcentagem de isolados amilase-negativos (1,85%), parece indicar a baixa frequência de cepas produtoras de toxina emética.
- As determinações de temperatura de arroz, feitas em um restaurante institucional, evidenciaram condições propícias ao crescimento de *B. cereus*, em operações de resfriamento do alimento pronto, observando-se sua exposição a temperaturas entre 20 e 49°C durante até 14h 50min.
- O tratamento térmico a 97,5°C durante 40 min, reproduzindo o processo de cocção do alimento, determinou reduções nos números de esporos de *B. cereus*, superiores a dois ciclos logarítmicos. Entre cinco suspensões inoculadas em meio de arroz, registraram-se valores $D_{97,5^\circ\text{C}}$ de 10,8 a 17,2 min. Dessa forma, concluiu-se que, quando a contaminação se assemelhar aos valores encontrados nesta pesquisa, pode-se considerar seguro o alimento que se consome imediatamente ao fim da operação de cozimento.
- Foi demonstrada a capacidade de multiplicação, em meio de arroz, dos diversos microrganismos testados, ao longo de extensa faixa de temperatura, entre 15 e 45°C. Os tempos de geração se reduziram, de 285 a 24 min, quando as temperaturas de incubação se elevaram, entre 15°C e 37°C. A partir de 37°C os valores G aumentaram, chegando a 67 min a 45°C. O arroz cozido, adicionado de sal e alho nas proporções estudadas, representou um meio propício à germinação e crescimento das diferentes cepas.

- Mesmo conservado sob refrigeração, expressivo crescimento de *B. cereus* pode ser esperado em arroz cozido exposto a temperaturas situadas em faixas que permitam essa multiplicação. A extensão desse potencial ficou evidenciada pela observação de curvas preditivas, que permitiram estimar aumentos nas populações de *B. cereus* equivalentes a sete ciclos logarítmicos, quando o alimento foi resfriado de 45 a 11,5°C, à taxa de 1,81°C/h, em ambiente a 16°C. Ficou evidenciando o risco de que, mesmo a partir de números iniciais baixos, populações determinantes de intoxicações alimentares venham a se desenvolver, sob condições semelhantes.

À luz dessas estimativas devem ser consideradas certas tendências observadas em cozinhas mantidas por verbas públicas, ao se avaliarem riscos microbiológicos. Uma delas é o desacoplamento temporal entre produção e consumo de alimentos. Tal prática, que consiste na preparação antecipada de alimentos, resulta da necessidade de racionalizar uso de equipamentos e espaços em cozinhas subdimensionadas, nas quais não têm sido feitos investimentos proporcionais à demanda crescente. As deficiências que geram tais procedimentos são as mesmas que levam às condições inadequadas para armazenar as preparações feitas com antecedência.

Admitindo-se que, tanto em restaurantes que atendem coletividades como em ambientes domésticos, preparações de arroz sejam comumente mantidas a temperaturas abusivas, é cabível supor que intoxicações por *B. cereus* sejam subestimadas em nosso meio.

6. SUGESTÕES

Observações de que adição de proteínas torna o meio de arroz mais propício ao crescimento de *B. cereus*, permitem supor que preparações enriquecidas com leite e outros ingredientes protéicos apresentem-se altamente contaminadas pelo microrganismo. Além disso, a freqüência de cepas psicotróficas em leite sugere o crescimento do microrganismo em temperaturas de refrigeração a que se submetem preparações desse tipo. Altos níveis de contaminação observados em condimentos e especiarias evidenciam o perigo representado pela contaminação de preparações como risoto, arroz-de-carreteiro, arroz com açafrão e outras igualmente elaboradas. Sugere-se, pois, que tais alimentos sejam investigados quanto à contaminação e potencial meio de crescimento de *B. cereus*.

A avaliação da incidência do patógeno em formulações destinadas a uso pediátrico, em creches, hospitais ou mesmo para uso domiciliar, também é de interesse na avaliação do seu papel na etiologia de diarreias infantis.

O crescimento do setor comercial de refeições, simplificado e tornado mais acessível pelo uso de atendimento "self-service", veio trazer um fator agravante aos já conhecidos riscos de ocorrência de doenças de origem alimentar: são os longos períodos em que os alimentos são mantidos em temperatura de banho-maria e expostos à contaminação ambiental e à manipulação pela clientela. Nesses locais a contaminação por *B. cereus* nos alimentos prontos deve ser avaliada, de forma a orientar ações preventivas.

Ficam essas sugestões para trabalhos futuros, bem como a investigação das fontes de contaminação, em cozinhas domésticas e em diferentes serviços de alimentação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M.; SUWAN, S.; OHTANI, I.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 31-34, aug. 1994.
- AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. *Microbiology*, Reading, v. 141, n. 4, p. 983-988, apr. 1995a.
- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, in an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 17-20, june 1995b.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. v. 52.
- AHMED, A.A.; MOUSTAFA, M.K.; MARTH, E.H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 46, n. 2, p. 126-128, feb. 1983.
- AHMED, R.; SANKAR-MISTRY, P.; JACKSON, S.; ACKERMANN, H.W.; KASATIYA, S.S. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, n. 3, p. 636-640, mar. 1995.
- ALMEIDA, R.C.C.; SCHNEIDER, I.S. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos ao varejo no município de Campinas. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 2, n. 1/2, p. 37-41, mar./jun. 1983.
- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P.E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 145-156, dec. 1995.
- ARBUTHNOTT, J.P. Role of exotoxins in bacterial pathogenicity. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 44, p. 329-345, 1978.
- ASANO, S.I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, mar. 1997.
- ASPLUND, K.; NURMI, E.; HILL, P.; HIRN, J. The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, p. 349-352, 1988.

- AVENS, J.S.; PODUSKA, P.J.; SCHMIDT, F.P.; JANSEN, G.R., HARPER, J.M. Food safety hazards associated with school food service delivery systems. *Journal of Food Science*, Chicago, v.43, p. 453-456, 1978.
- BACHHIL, V.N.; JAISWAL, T.N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 25, n. 6, p. 371-372, nov./dec. 1988.
- BAKER, J.M.; GRIFFITHS, M.W. Evidence for increased thermostability of *Bacillus cereus* enterotoxin in milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 58, n. 4, p. 443-445, apr. 1995.
- BAKER, J.M.; GRIFFITHS, M.W. Predictive modeling of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 56, n. 8, p. 684-688, aug. 1993.
- BAXTER, R.; HOLZAPFEL W.H. A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 47, p. 570-574, 1982.
- BECKER, H.; SCHALLER, G.; WIESE, W.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1-15, set. 1994.
- BECKERS, H.J.; VAN ERNE, E.H.W. Survival of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in "Advocaat". *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 46, n. 2, p. 98-99, feb. 1983.
- BEECHER, D.J.; MacMILLAN, J.D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 59, p. 1778-1784, 1991.
- BEECHER, D.J.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, nov. 1995.
- BEECHER, D.J.; WONG, A.C.L. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, n. 12, p. 4614-4616, dec. 1994.
- BENEDICT, R.C.; PARTRIDGE, T., WELLS, D.; BUCHANAN, R.L. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 56, n. 3, p. 211-214, mar. 1993.

- BENNETT, R.W.; MURTHY, G.; KAYLOR, L.; COX, S.; HARMON, S.M. Biological characterization and serological identification of *Bacillus cereus* diarrhoeal factor. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Meppel, v. 47, n. 2, p. 105-120, 1993.
- BLAKEY, L.J.; PRIEST, F.G. The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 48, p. 297-302, 1980.
- 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, july 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, june 1985.
- BRYAN, F.L. Hazard analyses of street foods and considerations for food safety. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, Des Moines, v. 15, n. 2, p. 64-69, feb. 1995.
- BRYAN, F.L.; JERMINI, M.; SCHMITT, R.; CHILUFYA, E.N.; MICHAEL, M.; MATOBA, A.; MFUME, E.; CHIBIYA, H. Hazard associated with holding and reheating foods at vending sites in a small town in Zambia. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 60, n. 4, p. 391-398, apr. 1997.
- BUCHANAN, R.L.; SCHULTZ, F.J. Evaluation of the oxoid BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 55, n. 6, p. 440-443, june 1992.
- BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, Des Moines, p. 31-36, 1996 supplement.
- BURRELL, P.; FARR, L.; BATES, J.; TAN, A. A rapid enzyme immunoassay for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin in food and culture supernatants. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 71, n. 6, p.xxii, dec. 1991.
- CANTONI, C.; BRESCIANI, C.M. Frequenza di *B. cereus* negli alimenti. *Industrie Alimentari*, Pinerolo, p. 641-646, lug./ago. 1987.
- CARLSON, C.R.; CAUGANT, D.A.; KOLSTO, A. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, n. 6, p. 1719-1725, june 1994.

- CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Meppel, v. 47, n. 2, p. 79-87, 1993.
- CHRISTIANSSON, A.; NAIDU, A.S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETERSSON, H.K. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 55, n. 10, p. 2595-2600, oct. 1989.
- CHUNG, K.T.; SUN, H.L. Distribution and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from rice in Taiwan. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 51, n. 5, p. 1208-1212, 1986.
- 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.
- CREMER, M.L.; CHIPLEY, J.R. Satellite food-service system assessment in terms of time and temperature conditions and microbiological and sensory quality of spaghetti and chili. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 42, p. 225-229, 1977.
- CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk products. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 77, p. 256-263, 1994.
- DAMGAARD, P.H.; LARSEN, H.D.; BRESCIANI, J.; JORGENSEN, K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 23, p. 146-150, sept. 1996.
- D'AUBERT, S.; ABBATI, P.; CANTONI, C. Sull'intossicazione alimentare da *Bacillus cereus*. *Industrie Alimentari*, Pinerolo, v. 19, n. 12, p. 913-926, dic. 1980.
- DAVEY, G.R. Food poisoning in New South Wales: 1977-84. *Food Technology in Australia*, 37, n. 10, p. 453-456, oct. 1985.
- DAY, T.L.; TATANI, S.R.; NOTERMANS, S.; BENNETT, R.W. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 77, p. 9-13, 1994.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; UBOLDI-EIROA, M.N. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, n. 60, p. 31-40, nov./dez. 1978.
- DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 6, n. 4, p. 324-338, oct. 1993.

- 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.
- DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 27, n. 2/3, p. 175-183, oct. 1995.
- FAILLE, C.; LEBRET, V.; GAVINI, F.; MAINGONNAT, J.F. Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 60, n. 5, p. 544-547, may 1997.
- FERMANIAN, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 19, p. 414-418, dec. 1994.
- FERMANIAN, C.; LAPEYRE, C.; FRÉMY, J.M.; CLAISSE, M. Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 345-358, july 1996.
- GARCIA-ARRIBAS, M.L.; PLAZA, C.J.; ROSA, M.C.; MOSSO, M.A. Characterization of *B. cereus* strains isolated from drugs and evaluation of their toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 64, p. 257-264, 1988.
- GARCIA-ARRIBAS, M.L.; KRAMER, J.M. The effect of glucose, starch, and pH on growth, enterotoxin and haemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 21-34, aug. 1990.
- GIANNELLA, R.A.; BRASILE, L. A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic, and microbiologic studies. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 139, n. 3, p. 366-370, mar. 1979.
- GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; LEIJENDEKKERS, S.; ROMBOUTS, F.M. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology*, London, v. 13, n. 1, p. 53-58, feb. 1996.
- GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L.F., eds. *Foodborne Infections and intoxications*. 2. ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.
- GILBERT, R.J.; PARRY, J.M. Serotypes of *Bacillus cereus* from outbreaks of food poisoning and from routine foods. *Journal of Hygiene*, London, v. 78, p. 69-74, 1977.

- GILBERT, R.J.; STRINGER, M.F.; PEACE, T.C. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene, London*, v. 73, n. 3, p. 433-444, 1974.
- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *Journal of Milk and Food Technology, Des Moines*, v. 35, n. 4, p. 213-226, 1972.
- GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat. *Food Technology, Chicago*, v. 37, n. 11, p. 105-110, nov. 1983.
- GONZALEZ, I.; LOPEZ, M.; MAZAS, M.; GONZALEZ, J.; BERNARDO, A. The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Applied Bacteriology, Oxford*, v. 78, p. 548-554, 1995.
- GORDON, R.E. The genus *Bacillus*. In: LASKIN, A.I.; LECHEVALIER, H.A., eds. *Handbook of Microbiology*. Cleveland: CRC Press, 1973. v. 1, p. 71-88.
- GORINA, L.G.; FLUER, F.S.; OLOVNIKOV, A.M.; EZEPCUK, Y.V. Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exo-enterotoxin of *Bacillus cereus*. *Applied Microbiology, Baltimore*, v. 29, n. 2, p. 201-204, feb. 1975.
- GRANUM, P.E.; ANDERSSON, A.; GAYTHER, C.; GIFFEL, M.; LARSEN, H.; LUND, T.; O'SULLIVAN, K. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters, Amsterdam*, v. 141, n. 2-3, p. 145-149, aug. 1996.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology, Cambridge*, v. 76, p. 61S-66S, Symposium Supplement 1994.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., ed. *Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 1997, p. 327-336.
- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *International Journal of Food Microbiology, Amsterdam*, v. 17, n. 4, p. 269-279, feb. 1993a.
- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; O'SULLIVAN, K.; NISSEN, H. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. *Netherlands Milk and Dairy Journal, Meppel*, v. 47, n. 2, p. 63-70, 1993b.
- GRANUM, P.E.; NISSEN, H. Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex' produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters, Amsterdam*, v. 110, n. 1, p. 97-100, june 1993.

- GRANUM, P.E.; TOMAS, J.M.; ALOUF, J.E. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 129-144, dec. 1995.
- GRIFFITH, C.J.; WORSFOLD, D. Application of HACCP to food preparation practices in domestic kitchens. *Food Control*, Oxford, v. 5, n. 3, p. 200-204, july 1994.
- GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 790-792, sep. 1990.
- HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: UNITED STATES FOOD AND DRUG ASSOCIATION (FDA). *Bacteriological Analytical Manual*. 6. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1984. Chap. 16, p. 16.01-16.08.
- HARMON, S.M.; GOEPFERT, J.M.; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F., eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3d. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. p. 593-604.
- HARMON, S.M.; KAUTER, D.A. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 54, n. 5, p. 372-374, may 1991.
- HARMON, S.M.; KAUTER, D.A.; McCLURE, F.D. Comparison of selective plating media for enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 47, n. 1, p. 65-67, jan. 1984.
- HARMON, S.M.; KAUTER, D.A.; SOLOMON, H.M. *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 50, n. 1, p. 62-65, jan. 1987.
- HARMON, S.M. New method for differentiating members of the *Bacillus cereus* group: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, v. 65, n. 5, p. 1134-1139, may 1982.
- HASSAN, G.; NABBUT, N. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* isolates from clinical and natural sources. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 59, n. 2, p. 193-196, feb. 1996.
- HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming *bacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 18, n. 3, p. 591-595, dec. 1955.
- HAUGE, S. Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus*. *Nordisk Hygienisk Tidsskrift*, v. 31, p. 189-206, 1950.

- HOLBROOK, R.; ANDERSON, J.M. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 26, p. 753-759, 1980.
- HOLMES, J.R.; PLUNKETT, T.; PATE, P.; ROPER, W.L.; ALEXANDER, W.J. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, v. 141, n. 6, p. 766-767, may 1981.
- HONDA, T.; SHIBA, A.; SEO, S.; YAMAMOTO, J.; MATSUYAMA, J.; MIWATANI, T. Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 63, n. 2/3, p. 205-209, 1991.
- HOOD, A.M.; TUCK, A.; DANE, C.R. A medium for the isolation, enumeration and rapid presumptive identification of injured *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 69, p. 359-372, 1990.
- HUGHES, S.; BARTHOLOMEW, B.; HARDY, J.C.; KRAMER, J.M. Potencial application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 52, p. 7-12, 1988.
- HUSMARK, U.; SIK, U.R. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 69, p. 557-562, 1990.
- IACONA, V.A.; SIMONETTA, A.; BASILICO, J.C. Incidencia de *Bacillus cereus* en alimentos deshidratados en polvo. *Revista Argentina de Microbiologia*, Santa Fe, v. 19, n. 4, p. 145-152, oct./dic. 1987.
- IVERS, J.T.; POTTER, N.N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C, and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 40, n. 1, p. 17-22, jan. 1977.
- JACKSON, S.G.; GOODBRAND, R.B.; AHMED, R.; KASATIYA, S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 21, n. 2, p. 103-105, aug. 1995.
- JAKOBSEN, M.; MURREL, W.G. The effect of water activity and a_w -controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus* T. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 43, p. 239-245, 1977.
- JERMINI, M.; BRYAN, F.L.; SCHMITT, R.; MWANDWE, C.; MWENYA, J.; ZYUULU, M.H.; CHILUFYA, E.N.; MATOBA, A.; HAKALIMA, A.T.; MICHAEL, M. Hazards and critical control points of food vending operations in a city in Zambia. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 60, n. 3, p. 288-299, mar. 1997.

- JINBO, K.; KOKUBO, Y. Biological typing of *Bacillus cereus* isolates and heat tolerance of their spores. Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, v. 33, p. 161-165, 1982.
- JINBO, K.; MATSUMOTO, M.; MURAKAMI, H. Development of a selective enumeration medium for *Bacillus cereus* in food of animal origin. Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, v. 29, n. 1, p. 158-162, 1978.
- JOHNSON, C.E.; BONVENTRE, P.F. Lethal toxin of *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 94, n. 2, p. 306-316, aug. 1967.
- JOHNSON, K.M. *Bacillus cereus* foodborne illness – an update. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 47, n. 2, p. 145-153, feb. 1984.
- JOHNSON, K.M.; BUSTA, F.F. Heat-induced temperature sensitivity of outgrowing *Bacillus cereus* spores. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 47, n. 4, p. 768-774, apr. 1984.
- JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. Journal of Food Science, Chicago, v. 47, n. 4, p. 1268-1271, july/aug. 1982.
- JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Influence of heating and cooling rates on *Bacillus cereus* spore survival and growth in a broth medium and in rice. Journal of Food Science, Chicago, v. 49, n. 1, p. 34-39, jan./feb. 1984.
- 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.
- KAMAT, A.S.; NENE, S.P.; NERKAR, D.P.; NADKARNI, G.B. The nature of toxins produced by *Bacillus cereus* BIS-59. Journal of Food Safety, Trumbull, v. 8, p. 71-81, 1987.
- KAMAT, A.S.; NERKAR, D.P.; NAIR, P.M. *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance. Journal of Food Safety, Trumbull, v. 10, n. 1, p. 31-41, 1989.
- KIM, H.U.; GOEPFERT, J.M. Efficacy of a fluorescent-antibody procedure for identifying *Bacillus cereus* in foods. Applied Microbiology, Washington, v. 24, n. 5, p. 708-713, nov. 1972.
- 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.

- KONUMA, H.; SHINAGAWA, K.; TOKUMARU, M.; ONOUE, Y.; KONNO, S.; FUJINO, N.; SHIGEHISA, T.; KURATA, H.; KUWABARA, Y.; LOPES, C.A.M. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 51, n. 4, p. 324-326, apr. 1988.
- KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M.P., ed. *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-69.
- KUTIMA, P.M.; FOEGEDING, P.M. Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 1, p. 47-52, jan. 1987.
- LANCETTE, G.A.; HARMON, S.M. Enumeration and confirmation of *Bacillus cereus* in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, v. 63, n. 3, p. 581-586, mar. 1980.
- LANGEVELD, L.P.M.; VAN SPRONSEN, W.A.; VAN BERESTEIJN, E.C.H.; NOTERMANS, S.H.W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 723-726, july 1996.
- LARSEN, H.D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 34, p. 179-186, feb. 1997.
- LEITÃO, M.F.F.; UBOLDI-EIROA, M.N.; DELAZARI, I. Contaminação de matérias-primas e alimentos semiprocessados de origem vegetal por esporos de bactérias. I. *Bacillus* sp. mesófilos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 20, n. 1, p. 39-54, jan./mar. 1983.
- LUND, T.; GRANUM, P.E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, aug. 1996.
- MALMSTEN, T.; PÄÄKKÖNEN, K.; HYVÖNEN, L. Packaging and storage effects on microbiological quality of dried herbs. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 56, n. 3, p. 873-875, may/june 1991.
- MARTIN, J.H.; BLACKWOOD, P.W. Effects of sub-lethal heat-shock, β -alanine, and L-alanine on germination and subsequent destruction of *Bacillus* spores by pasteurization. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 55, n. 5, p. 577-580, may 1972.
- MARTINS-VIEIRA, M.B.C.; SILVA, M.C.C.; DIAS, R.S. Surtos de toxinfecção alimentar ocorridos em Minas Gerais no período de 1992 a 1994. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1995, Santos. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1996, p. 57.

- MASSON, A. L'avenir des tests actuels de contrôle: "*B. cereus*". La Technique Laitière, v. 55, p. 57-59, avr. 1983.
- McKNIGHT, I.C.S.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F. *Bacillus cereus* em macarrões industrializados. II. Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para consumo. Revista de Microbiologia, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 268-275, 1990.
- MELLING, J.; CAPEL, B. J. Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. xxv, 1978.
- MELLING, J.; CAPEL, B. J.; TURNBULL, P.C.B.; GILBERT, R.J. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. Journal of Clinical Pathology, London, v. 29, p. 938-940, 1976.
- MIDURA, T.; GERBER, M.; WOOD, R.; LEONARD, A.R. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. Public Health Reports, Washington, v. 85, n. 1, p. 45-48, 1970.
- MIKAMI, T.; HIRAOKA, K.; MURAKAMI, T.; BOON-LONG, J.; MATSUMOTO, T.; SUZUKI, M. Detection of common flagella antigen in *Bacillus cereus* by monoclonal antibody. Microbiology and Immunology, Tokyo, v. 34, n. 8, p. 709-714, 1990.
- MIKAMI, T.; HORIGAWA, T.; MURAKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAWA, A.; MURAYAMA, S.; KATAGIRI S.; SHINAGAWA, K.; SUZUKI, M. An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 53-58, june 1994.
- MORTIMER, P.R.; McCANN, G. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. The Lancet, London, v. 1, n. 7865, p. 1043-1045, may 1974.
- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Applied Microbiology, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 650-653, may 1967.
- MOSSO, C.; GUGLIELMINI, N.; LANZETTI, A. Capacità di *B. cereus* di crescere e produrre enterotossina ed attività di diversi disinfettanti. Industrie Alimentari, Pinerolo, v. 35, n. 352, p. 1073-1075, ott. 1996.
- MURAKAMI, T.; HIRAOKA, K.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; KATAGIRI S.; SUZUKI, M. Detection of *Bacillus cereus* flagellar antigen by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Microbiology and Immunology, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 223-234, 1991.
- NACLERIO, G.; RICCA, E., SACCO, M.; DE FELICE, M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 12, p. 4313-4316, dec. 1993.

- 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.
- NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; BEUMER, R.; GIFFEL, M.; WEEM, P.P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology*, London, v. 14, n. 2, p. 143-151, apr. 1997.
- NOTERMANS, S.; TATINI, S. Characterization of *B. cereus* in relation to toxin production. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Meppel, v. 47, n. 2, p. 71-77, 1993.
- OMBUI, J.N.; SCHMIEGER, 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.
- PARRY, J.M.; GILBERT, R.J. Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. *Journal of Hygiene*, London, v. 84, n. 1, p. 77-82, 1980.
- PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas - SP - no período de 1987 a 1993. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 77-82, jan./jun. 1996.
- PENNA, T.C.V.; ABE, L.E.; MACHOSHVILI, I.A.; COLOMBO, A.J.; BARUFFALDI, R. Controle de qualidade no processamento de alimentos em restaurante industrial. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 62-78, jan./jun. 1989.
- PETERZ, M.; WIBERG, C.; NORBERG, P. Comparison of media for isolation of *Bacillus cereus* from foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 48, n. 11, p. 969-970, nov. 1985.
- PFEIFER, J.; KESSLER, H.G. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores located between seals and seal surfaces. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 58, n. 11, p. 1206-1210, nov. 1995.
- PILLAI, R.A.V.; KHAN, M.M.H.; REDDY, V.P. Incidence of aerobic spore formers in lassi. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 30, n. 2, p. 141-142, mar./apr. 1993.
- PILLAIYAR, P. Rice parboiling research in India. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 35, n. 2, p. 225-227, feb. 1990.

- POTTER, M.E. Risk Assessment terms and definitions. *Journal of Food Protection*, Des Moines, p. 6-9, 1996 supplement.
- RABINOVITCH, L.; VASCONCELOS, F.J.M. A new medium for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in food. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 330-334, out./dez. 1987.
- RABINOVITCH, L.; VICENTE, M.M.A.; GUAYCURÚS, T.V.; FREITAS, J.P.G.V.; MESQUITA, R.P. Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 1985.
- 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.
- RAEVUORI, M.; KIUTAMO, T.; NISKANEN, A.; SALMINEN, K. An outbreak of *Bacillus cereus* food-poisoning in Finland associated with boiled rice. *Journal of Hygiene*, London, v. 76, n. 3, p. 319-327, 1976.
- RAJKOWSKI, K.T.; MIKOLAJCIK, E.M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 50, n. 3, p. 199-205, mar. 1987.
- RAPPAPORT, H.; GOEPFERT, J.M. Thermal injury and recovery of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 41, n. 7, p. 533-537, July 1978.
- RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.; McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J. Comparison of Arrhenius-type and Belehrádek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 71, p. 452-459, nov. 1991.
- RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; McMEEKIN, T.A.; STOKES, A.N.; CHANDLER, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 154, p. 1222-1226, 1983.
- RIVAS, M.; RODRICKS, J.V. Food hazards of microbial origin. II. Bacterial toxins. *Revista Latino-americana de Microbiologia*, v. 21, p. 159-165, 1979.
- ROBERTS, T.A. Microbial growth and survival: developments in predictive modeling. *Food Technology*, Chicago, v. 51, n. 4, p. 88-90, apr. 1997.
- RODRIQUEZ, M.H.; BARRETT, E.L. Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 49, n.9, p. 680-686, sept. 1986.

- ROSS, T. Belehrádek-type models. *Journal of Industrial Microbiology*, Hampshire, v. 12, n. 3/5, p. 180-189, 1993.
- ROSS, T.; McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 23, n. 3/4, p. 241-264, nov. 1994.
- ROWAN, N.J.; ANDERSON, J.G. Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 3, p. 1182-1184, mar. 1997.
- RUSUL, G.; YAACOB, N.H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 131-139, apr. 1995.
- SALEEM, Z.M.; AL-DELAIFY, K.S. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 45, n. 11, p. 1007-1009, sept. 1982.
- 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.
- SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 60, n. 1, p. 167-215, mar. 1996.
- SHAH, R.C.; WADHER, B.J.; BHOOSREDDY, G.L. Incidence and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from Indian foods. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 33, n. 3, p. 249-250, may/june 1996.
- SHARMA, P.L.; DOGRA, R.C. *Bacillus cereus* enterotoxin and its production in different foods. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 20, n. 3, p. 223-227, sept./oct. 1983.
- 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.; KONUMA, H.; SEKITA, S.; SUGII, S. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 87-90, July 1995.
- SHINAGAWA, K.; KONUMA, H.; TOKUMARU, M.; TAKEMASA, N.; HASHIGIWA, M.; SHIGEHISA, T.; LOPES, C.A.M. Enumeration of aerobic spore-formers and *Bacillus cereus* in meat product additives. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 51, n. 8, p. 648-650, aug. 1988.

- SHINAGAWA, K.; KUNITA, N.; SASAKI, Y.; OKAMOTO, A. Biochemical characteristics and heat tolerance of strains of *Bacillus cereus* isolated from uncooked and cooked rice after food poisoning outbreaks. *Journal of Food Hygiene Society of Japan*, v. 20, n. 6, p. 430-436, 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*, Tokyo, v. 47, n. 4, p. 557-565, 1985.
- SHINAGAWA, K.; OTAKE, S.; MATSUSAKA, N.; SUGI, S. Production of the vacuolation factor of *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *Journal of Veterinary Medicine Science*, Tokyo, v. 54, n. 3, p. 443-446, 1992a.
- SHINAGAWA, K.; SATO, K.; KONUMA, H.; MATSUSAKA, N.; SUGI, S. Fluid accumulation in mouse ligated intestine inoculated with the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 167-171, apr. 1991a.
- SHINAGAWA, K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Meppel, v. 47, n. 2, p. 89-103, 1993.
- SHINAGAWA, K.; TAKECHI, T.; MATSUSAKA, N. Purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus* by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 38, n. 2, p. 153-156, feb. 1992b.
- SHINAGAWA, K.; UENO, S.; KONUMA, H.; MATSUSAKA, N.; SUGI, S. Purification and characterization of the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 281-286, 1991b.
- SHINAGAWA, K.; UENO, S.; MATSUSAKA, N.; SUGI, S. *In vitro* stability in biological activity and antigenicity of the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 317-319, apr. 1991c.
- SHINAGAWA, S.; YOKOI, R.; MATSUSAKA, N.; SUGI, S. Development of murine monoclonal antibodies against an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 419-422, 1991d.
- 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.
- SINGH, D.K.; NARAYAN, K.G. Effect of hydrogen ion concentration and sucrose on enterotoxin production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 31, n. 4, p. 338-340, 1994.
- SKINNER, G.E.; LARKIN, J.W.; RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *Journal of Food Safety*, Trumbull, v. 14, p. 175-217, 1994.
- SNYDER, P.O.; MATTHEWS, M.E. Microbiological quality of foodservice menu items produced and stored by cook/chill, cook/freeze, cook/hot-hold and heat/serve methods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 47, n. 11, p. 876-885, nov. 1984.
- SNYDER, P.O.; POLAND, D.M. America's "safe" food - part 2. Dairy, Food and Environmental Sanitation, Des Moines, v. 11, n. 1, p. 14-20, jan. 1991.
- SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* - induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Applied Microbiology*, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 341-348, sep. 1972.
- SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 21, p. 1237-1246, 1975.
- SPIRA, W.M.; SILVERMAN, G.J. Effects of glucose, pH, and dissolved-oxygen tension on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 37, n. 1, p. 109-116, jan. 1979.
- SREENIVASAMURTHY, V. Food toxins. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 17, n. 1/2, p. 89-94, jan./apr. 1980.
- SUTHERLAND, A.D.; LIMOND, A.M. Influence of pH on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 60, n. 4, p. 575-580, nov. 1993.
- SUTHERLAND, A.D. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 60, n. 4, p. 569-574, nov. 1993.
- SUTHERLAND, J.P.; AHERNE, A.; BEAUMONT, A.L. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 60, p. 359-372, july 1996.

- SUWAN, S.; ISOBE, M.; OHTANI, I.; AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M. Structure of celeuride, a cyclic dodecadepsipeptide toxin from *Bacillus cereus* and studies on NMR characteristics of its alkali metal complexes including a conformational structure of the K⁺ complex. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, Cambridge, v. 30, n. 7, p. 765-775, apr. 1995.
- SZABO, R.A.; SPEIRS, J.; AKHTAR, M. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 54, n. 4, p. 272-276, apr. 1991.
- SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; RAYMAN, M.K. Twenty-four hour isolation and confirmation of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 47, n. 8, p. 856-860, aug. 1984.
- TAYLOR, A.J.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. *Journal of Medical Microbiology*, Edinburgh, v. 8, p. 543-550, 1975.
- TERRANOVA, W.; BLAKE, P.A. *Bacillus cereus* food poisoning. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 298, n. 3, p. 143-144, jan. 1978.
- THOMPSON, N.E.; KETTERHAGEN, M.J.; BERGDOLL, M.S.; SCHANTZ, E.J. Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 43, n. 3, p. 887-894, mar. 1984.
- TING, W.T.; BANWART, G.J. Detection of *Bacillus cereus* diarrheagenic toxin using a rat ligated intestinal loop assay. *Journal of Food Safety*, Trumbull, v. 7, p. 57-63, 1985.
- TITBALL, R.W. Bacterial phospholipases C. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 57, n. 2, p. 347-366, june 1993.
- 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.; GILBERT, R.J.; MELLING, J. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.32, p. 219-228, jan. 1979.
- TURNBULL, P.C.B. Studies on the production of enterotoxins by *Bacillus cereus*. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 29, p. 941-948, 1976.
- TURNER, B.E.; FOEGEDING, P.M.; LARICK, D.K.; MURPHY, A.H. Control of *Bacillus cereus* spores and spoilage microflora in sous-vide chicken breast. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 61, n. 1, p. 217-234, jan./feb. 1996.

- UBOLDI-EIROA, M.N.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F.; VITTI, P. Caracterização microbiológica de farinhas e amidos. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 6, n. 2, p. 459-473, 1975.
- UEDA, S.; KUWABARA, Y. An ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing – putetative emetic toxin production by *B. cereus* strains at various stages of the process. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, Japan, v.21, n. 9, p. 499-502, 1993.
- VÄISÄNEN, O.M.; MWAISUMO, N.J.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 70, p. 315-324, 1991.
- VAN NETTEN, P.; KRAMER, J.M. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 85-89, oct. 1992.
- VAN NETTEN, P.; VAN DE MOOSDIJK, A.; VAN HOENSEL, P.; MOSSEL, D.A.A.; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 69, p. 73-79, 1990.
- VARADARAJ, M.C. Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: a critical evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 30, n. 1, p. 1-13, jan./fev. 1993.
- VASCONCELOS, F.J.M.; RABINOVITCH, L. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 235-238, mar. 1995.
- VIJAYALAKSHMI, G.; DWARAKANATH, C.T.; SREENIVASA MURTHY, V. Studies on *Bacillus cereus* contamination of rice and rice preparations. *Journal of Food Science and Technology*, New Delhi, v. 18, n. 6, p. 231-234, nov./dec. 1981.
- WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearotheophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 60, n. 3, p. 446-450, may/june 1995.
- WONG, H.C.; CHANG, M.H.; FAN, J.Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 54, n. 3, p. 699-702, mar. 1988a.
- WONG, H.C.; CHEN, Y.L.; CHEN, C.L.F. Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 51, n. 9, p. 707-710, sep. 1988b.

- YUSUF, I.Z.; UMOH, V.J.; AHMAD, A.A. Occurrence and survival of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in some Nigerian flour-based foods. *Food Control*, Oxford, v. 3, n. 3, p. 149-152, 1992.
- ZAHNER, V.; MOMEN, H.; SALLES, C.A.; RABINOVITCH, L. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* na *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Bacteriology*, Cambridge, v. 67, p. 275-282, 1989.
- ZWIETERING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; WIT, J.C.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n. 4, p. 1094-1101, apr. 1991.
- ZWIETERING, M.H.; WIT, J.C.; NOTERMANS, S. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 30, p. 55-70, june 1996.

ANEXO 1 - Biótipos de *Bacillus cereus* isolados de amostras de arroz

Material	Identificação das amostras	Nº e identificação dos isolados					
		Biótipo 1		Biótipo 2		Biótipo 6	
Arroz polido	P ₄	0	-	3	001 a 003	0	-
	P ₆	0	-	2	004 a 005	0	-
	P ₇	1	006	3	007 a 009	0	-
	P ₁₀	0	-	3	010 a 012	0	-
	P ₁₂	1	013	7	014 a 020	0	-
	P ₁₃	2	021 a 022	0	-	0	-
	P ₁₆	0	-	8	023 a 030	0	-
	P ₁₇	0	-	4	031 a 034	0	-
	P ₁₉	1	035	3	036 a 038	0	-
	P ₂₀	1	039	6	040 a 045	1	046
Arroz parboilizado	PbA ₉	0	-	2	047 a 048	0	-
	PbB ₇	0	-	2	049 a 050	0	-
	Ia ₁	1	051	9	052 a 060	0	-
	Ia ₂	0	-	5	061 a 065	0	-
	Ia ₃	0	-	8	066 a 073	0	-
	Ia ₄	0	-	8	074 a 081	0	-
	Ia ₅	0	-	7	082 a 088	0	-
	Ia ₆	1	089	7	090 a 096	0	-
	Ia ₇	0	-	9	097 a 105	1	106
	Ia ₈	0	-	9	107 a 115	0	-
Arroz integral	Ia ₉	1	116	7	117 a 123	0	-
	Ia ₁₀	1	124	6	125 a 130	0	-
	Ib ₁	2	131 a 132	7	133 a 139	0	-
	Ib ₂	1	140	7	141 a 147	0	-
	Ib ₃	0	-	7	148 a 154	0	-
	Ib ₄	0	-	12	155 a 166	0	-
	Ib ₅	0	-	7	167 a 173	1	174
	Ib ₆	0	-	7	175 a 181	0	-
	Ib ₇	2	182 a 183	9	184 a 192	0	-
	Ib ₈	0	-	6	193 a 198	0	-
	Ib ₉	1	199	6	200 a 205	1	206
	Ib ₁₀	1	207	9	208 a 216	0	-

ANEXO 2 - Registros de temperaturas durante período de manutenção de arroz cozido em recipientes térmicos. Resultados de 3 medições, feitas em 3 pontos dos recipientes examinados: borda inferior (base), centro e borda superior (topo)

Tempo (min)	Medidas de temperaturas (°C), segundo localização dos sensores								
	1ª medição			2ª medição			3ª medição		
	Base	Centro	Topo	Base	Centro	Topo	Base	Centro	Topo
0	78,5	86,0	78,0	83,5	89,0	77,5	81,0	87,5	80,0
10	78,5	86,0	77,0	83,0	88,5	75,5	80,5	87,5	78,0
20	78,5	86,0	75,5	82,5	88,5	75,0	80,5	87,5	76,0
30	78,0	86,0	74,0	82,5	88,0	74,5	80,5	87,5	74,0
40	77,5	85,5	72,0	81,5	87,5	73,0	80,5	87,0	73,0
50	77,5	85,5	71,0	80,5	87,0	72,0	80,0	87,0	72,0
60	77,0	85,0	70,0	80,5	87,0	71,5	79,5	86,5	71,0
70	77,0	85,0	68,5	80,0	87,0	70,0	78,5	86,0	70,0
80	76,0	84,5	67,5	80,0	87,0	68,5	78,0	86,0	68,5
90	75,5	84,5	67,0	79,5	87,0	67,5	78,0	86,0	67,5
100	75,0	84,5	66,5	79,5	87,0	66,5	78,0	85,5	66,0
110	75,0	84,0	66,0	79,0	86,5	65,0	77,0	85,0	64,0
120	75,0	84,0	65,0	79,0	86,0	63,5	77,0	85,0	62,5
130	74,0	83,5	64,0	78,0	85,5	62,5	76,5	84,5	61,0
140	74,0	83,0	63,5	74,0	85,0	60,5	76,5	84,0	61,0
150	73,5	83,0	62,5	73,0	84,5	59,5	76,5	84,0	59,0
160	73,5	83,0	62,0	-	-	-	76,0	83,5	58,0
170	73,0	82,5	61,5	-	-	-	75,0	83,0	57,0
180	73,0	82,5	61,0	-	-	-	74,0	82,5	56,5
190	72,0	82,0	59,5	-	-	-	-	-	-
200	71,0	82,0	58,5	-	-	-	-	-	-

ANEXO 3 - Temperaturas (°C) registradas durante 1ª fase de resfriamento de sobras de arroz, à temperatura ambiente

Tempo (min)	1ª Medição			2ª Medição			3ª Medição		
	base	centro	topo	base	Centro	topo	base	centro	topo
0	57,5	56	57	51,5	48,5	50	56,5	58	59
10	57	56	56,5	49,5	48	49,5	55,5	57,5	58
20	57	55,5	56	49	47,5	48,5	55	56,5	57
30	56	55	56	48,5	47,5	47	54,5	56	56,5
40	55,5	55	55	48	47	46,5	54	56	56
50	55	55	54,5	48	47	46	53	55,5	54,5
60	55	54,5	54	47,5	47	46	52,5	55,5	53,5
70	54,5	54	53,5	47	46,5	45	52,5	55	52,5
80	54,5	53,5	53	46,5	46	44,5	52	55	51,5
90	53	53,5	52	46,5	46	44	51,5	54,5	51
100	53	53	51,5	45	46	43,5	51	53,5	50
110	52,5	53	51	45	45,5	42,5	51	52,5	49,5
120	52,5	52	51	-	-	-	50,5	52,5	48,5
130	52,5	51,5	50,5	-	-	-	50,5	52	47,5
140	52	51,5	49,5	-	-	-	49,5	52	47
150	51	51	48	-	-	-	49,5	51,5	46,5
160	50	51	47	-	-	-	49	51	46
170	48,5	50,5	46,5	-	-	-	48	51	45
180	47,5	50	46	-	-	-	48,5	50,5	44,5
190	46,5	49,5	45,5	-	-	-	-	-	-
200	45	49	45	-	-	-	-	-	-
210	44	48,5	44	-	-	-	-	-	-
220	44	48	43	-	-	-	-	-	-

ANEXO 4 – Efeitos do tratamento térmico a 97,5°C, em meio de arroz, sobre contagens de *B. cereus*

Suspensões de esporos	Repetições	UFC/g* segundo diferentes tempos de exposição (min)				
		0	10	20	30	40
A	1	2,20 x 10 ⁶	5,75 x 10 ⁵	1,82x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁴	9,47 x 10 ³
	2	7,52 x 10 ⁶	9,05 x 10 ⁵	3,27 x 10 ⁵	9,47 x 10 ⁴	3,67 x 10 ⁴
B	1	3,12 x 10 ⁷	6,85 x 10 ⁶	7,62 x 10 ⁵	1,70 x 10 ⁵	8,90 x 10 ⁴
	2	8,20 x 10 ⁷	5,52 x 10 ⁶	7,95 x 10 ⁵	4,35 x 10 ⁵	7,77 x 10 ⁴
C	1	2,27 x 10 ⁷	4,92 x 10 ⁶	9,77 x 10 ⁵	4,70 x 10 ⁵	2,05 x 10 ⁵
	2	5,17 x 10 ⁷	8,80 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁶	6,15 x 10 ⁵	2,97 x 10 ⁵
D	1	7,70 x 10 ⁶	9,82 x 10 ⁵	5,95 x 10 ⁴	6,47 x 10 ³	2,20 x 10 ³
	2	5,87 x10 ⁶	8,50 x 10 ⁵	6,72 x 10 ⁴	5,67 x 10 ³	1,85 x 10 ³
E	1	4,52 x 10 ⁷	6,67 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁶	3,90 x 10 ⁵	9,70 x 10 ⁴
	2	1,87 x 10 ⁷	3,80 x 10 ⁶	7,72 x 10 ⁵	1,25 x 10 ⁵	9,02 x 10 ⁴

*Médias de amostras

ANEXO 5 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 10°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)						
		0	12	24	36	48	60	72
A	1	1,52 x 10 ⁴	1,80 x 10 ⁴	1,05 x 10 ⁴	1,57 x 10 ⁴	2,00 x 10 ⁴	1,20 x 10 ⁴	2,12 x 10 ⁴
	2	1,80 x 10 ⁴	2,00 x 10 ⁴	1,92 x 10 ⁴	1,82 x 10 ⁴	2,10 x 10 ⁴	1,97 x 10 ⁴	1,92 x 10 ⁴
B	1	1,20 x 10 ⁴	2,25 x 10 ⁴	8,67 x 10 ³	1,50 x 10 ⁴	9,50 x 10 ³	1,90 x 10 ⁴	2,22 x 10 ⁴
	2	2,22 x 10 ⁴	2,80 x 10 ⁴	2,60 x 10 ⁴	2,50 x 10 ⁴	2,85 x 10 ⁴	3,22 x 10 ⁴	4,67 x 10 ⁴
C	1	3,00 x 10 ³	3,30 x 10 ³	2,52 x 10 ³	2,70 x 10 ³	3,47 x 10 ³	3,15 x 10 ³	NR**
	2	2,30 x 10 ³	2,92 x 10 ³	3,85 x 10 ³	2,75 x 10 ³	2,97 x 10 ³	2,65 x 10 ³	2,87 x 10 ³
D	1	2,47 x 10 ⁴	2,00 x 10 ⁴	1,17 x 10 ⁴	2,92 x 10 ⁴	1,65 x 10 ⁴	1,80 x 10 ⁴	3,40 x 10 ⁴
	2	1,22 x 10 ⁴	1,77 x 10 ⁴	2,30 x 10 ⁴	1,70 x 10 ⁴	1,85 x 10 ⁴	2,32 x 10 ⁴	2,17 x 10 ⁴
E	1	5,97 x 10 ³	3,85 x 10 ³	8,65 x 10 ³	7,47 x 10 ³	9,12 x 10 ³	8,50 x 10 ³	7,52 x 10 ³
	2	4,72 x 10 ³	5,25 x 10 ³	6,35 x 10 ³	8,82 x 10 ³	1,17 x 10 ⁴	8,15 x 10 ³	9,55 x 10 ³

* Médias de amostras
** Não realizado

ANEXO 6 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 15°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)							
		0	10	20	30	40	50	60	
A	1	2,02 x 10 ³	3,15 x 10 ³	3,40 x 10 ⁴	4,77 x 10 ⁵	1,95 x 10 ⁶	9,72 x 10 ⁶	1,27 x 10 ⁷	
	2	7,97 x 10 ²	1,70 x 10 ³	1,77 x 10 ⁴	7,30 x 10 ⁴	9,20 x 10 ⁵	8,92 x 10 ⁶	7,87 x 10 ⁷	
B	1	1,07 x 10 ³	4,60 x 10 ³	6,77 x 10 ⁴	5,22 x 10 ⁵	4,95 x 10 ⁶	8,55 x 10 ⁶	3,10 x 10 ⁷	
	2	2,25 x 10 ³	5,20 x 10 ³	4,80 x 10 ⁴	2,07 x 10 ⁵	5,15 x 10 ⁶	3,75 x 10 ⁷	9,32 x 10 ⁷	
C	1	8,87 x 10 ²	5,52 x 10 ³	3,02 x 10 ⁴	9,30 x 10 ⁵	1,82 x 10 ⁷	2,97 x 10 ⁷	1,65 x 10 ⁸	
	2	7,52 x 10 ²	2,30 x 10 ³	4,67 x 10 ⁴	5,50 x 10 ⁵	3,60 x 10 ⁶	1,17 x 10 ⁷	NR**	
D	1	1,17 x 10 ³	6,10 x 10 ³	6,87 x 10 ⁴	4,55 x 10 ⁵	1,65 x 10 ⁶	3,22 x 10 ⁶	6,35 x 10 ⁶	
	2	2,57 x 10 ³	1,65 x 10 ⁴	4,85 x 10 ⁴	2,27 x 10 ⁵	3,12 x 10 ⁶	5,27 x 10 ⁶	9,15 x 10 ⁶	
E	1	1,27 x 10 ³	2,17 x 10 ³	5,32 x 10 ³	1,87 x 10 ⁴	2,52 x 10 ⁵	8,45 x 10 ⁵	1,97 x 10 ⁶	
	2	1,12 x 10 ³	4,10 x 10 ³	1,45 x 10 ⁴	8,22 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁵	7,87 x 10 ⁵	9,55 x 10 ⁵	

* Médias de amostras
** Não realizado

ANEXO 7 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 22°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)						
		0	6	9	12	18	24	30
A	1	3,07 x 10 ³	4,95 x 10 ⁴	2,82 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁶	1,72 x 10 ⁷	7,45 x 10 ⁷	3,60 x 10 ⁸
	2	7,80 x 10 ²	6,85 x 10 ³	5,92 x 10 ⁴	3,50 x 10 ⁵	5,07 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁸	3,97 x 10 ⁸
B	1	9,17 x 10 ²	2,15 x 10 ⁴	1,72 x 10 ⁵	1,27 x 10 ⁶	9,17 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁸	2,55 x 10 ⁸
	2	3,50 x 10 ²	4,82 x 10 ³	6,52 x 10 ⁴	2,57 x 10 ⁵	1,95 x 10 ⁷	2,60 x 10 ⁸	6,22 x 10 ⁸
C	1	2,12 x 10 ³	1,80 x 10 ⁴	8,85 x 10 ⁴	1,05 x 10 ⁶	4,27 x 10 ⁷	2,15 x 10 ⁸	5,22 x 10 ⁸
	2	4,70 x 10 ²	2,35 x 10 ³	3,67 x 10 ⁴	2,20 x 10 ⁵	8,00 x 10 ⁶	1,27 x 10 ⁸	3,02 x 10 ⁸
D	1	1,05 x 10 ³	2,22 x 10 ³	5,20 x 10 ⁴	3,97 x 10 ⁵	1,70 x 10 ⁷	2,17 x 10 ⁸	6,55 x 10 ⁸
	2	1,10 x 10 ²	6,50 x 10 ²	3,15 x 10 ³	5,95 x 10 ⁴	3,07 x 10 ⁶	7,00 x 10 ⁷	3,32 x 10 ⁸
E	1	1,22 x 10 ²	3,72 x 10 ²	1,40 x 10 ³	9,37 x 10 ³	4,80 x 10 ⁵	1,80 x 10 ⁷	8,67 x 10 ⁷
	2	2,75 x 10 ²	5,07 x 10 ²	1,60 x 10 ³	3,80 x 10 ⁴	1,17 x 10 ⁶	4,95 x 10 ⁷	9,12 x 10 ⁷

* Médias de amostras

ANEXO 8 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 30°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)								
Repetições		0	2	4	6	9	12	15	18	
A	1	5,00 x 10 ²	8,45 x 10 ²	5,37 x 10 ³	8,80 x 10 ⁴	1,87 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷	3,25 x 10 ⁸	9,15 x 10 ⁸	
	2	8,97 x 10 ³	3,55 x 10 ⁴	5,22 x 10 ⁵	4,25 x 10 ⁶	3,20 x 10 ⁷	5,10 x 10 ⁸	7,07 x 10 ⁸	1,22 x 10 ⁹	
B	1	9,42 x 10 ²	2,85 x 10 ³	1,70 x 10 ⁴	3,20 x 10 ⁵	3,77 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁷	3,87 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁸	
	2	2,02 x 10 ²	6,15 x 10 ²	4,27 x 10 ³	8,05 x 10 ⁴	8,50 x 10 ⁵	1,55 x 10 ⁷	7,22 x 10 ⁷	3,57 x 10 ⁸	
C	1	3,00 x 10 ²	9,50 x 10 ²	8,22 x 10 ³	1,95 x 10 ⁵	4,52 x 10 ⁶	1,87 x 10 ⁷	2,00 x 10 ⁸	6,17 x 10 ⁸	
	2	1,05 x 10 ³	2,90 x 10 ³	6,12 x 10 ⁴	4,35 x 10 ⁵	5,15 x 10 ⁶	2,67 x 10 ⁷	3,55 x 10 ⁸	5,00 x 10 ⁸	
D	1	1,22 x 10 ³	5,05 x 10 ³	3,62 x 10 ⁴	6,50 x 10 ⁵	4,75 x 10 ⁶	2,57 x 10 ⁷	8,95 x 10 ⁷	1,65 x 10 ⁸	
	2	6,07 x 10 ³	2,80 x 10 ⁴	4,15 x 10 ⁵	3,90 x 10 ⁶	5,22 x 10 ⁷	2,37 x 10 ⁸	5,20 x 10 ⁸	7,37 x 10 ⁸	
E	1	9,02 x 10 ²	4,20 x 10 ³	6,97 x 10 ⁴	7,15 x 10 ⁵	9,15 x 10 ⁶	6,80 x 10 ⁷	9,80 x 10 ⁷	5,05 x 10 ⁸	
	2	7,50 x 10 ²	3,20 x 10 ³	1,95 x 10 ⁴	4,30 x 10 ⁵	6,07 x 10 ⁶	7,85 x 10 ⁷	5,22 x 10 ⁸	1,10 x 10 ⁹	

* Médias de amostras

ANEXO 9 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 37°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)							
		0	2	4	6	9	12	15	
A	1	1,12 x 10 ³	6,15 x 10 ³	1,27 x 10 ⁵	3,20 x 10 ⁶	4,22 x 10 ⁷	6,95 x 10 ⁸	8,37 x 10 ⁸	
	2	9,50 x 10 ³	3,17 x 10 ⁴	1,75 x 10 ⁶	1,87 x 10 ⁷	2,15 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁸	4,75 x 10 ⁸	
B	1	4,97 x 10 ³	8,15 x 10 ³	9,72 x 10 ⁴	4,35 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁷	1,47 x 10 ⁸	5,55 x 10 ⁷	
	2	7,07 x 10 ³	4,30 x 10 ⁴	5,15 x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁷	2,35 x 10 ⁸	3,50 x 10 ⁸	2,92 x 10 ⁸	
C	1	8,35 x 10 ³	5,15 x 10 ⁴	1,27 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁷	8,95 x 10 ⁷	1,62 x 10 ⁸	4,12 x 10 ⁸	
	2	3,20 x 10 ³	9,42 x 10 ³	4,80 x 10 ⁵	6,12 x 10 ⁶	2,25 x 10 ⁷	6,60 x 10 ⁷	1,10 x 10 ⁸	
D	1	1,12 x 10 ³	1,05 x 10 ⁴	3,15 x 10 ⁵	4,90 x 10 ⁶	9,75 x 10 ⁶	6,50 x 10 ⁷	8,57 x 10 ⁷	
	2	2,90 x 10 ³	8,00 x 10 ³	4,05 x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁶	2,35 x 10 ⁷	7,32 x 10 ⁷	9,00 x 10 ⁷	
E	1	3,50 x 10 ³	6,37 x 10 ³	3,75 x 10 ⁵	4,90 x 10 ⁶	9,57 x 10 ⁶	8,32 x 10 ⁷	5,90 x 10 ⁸	
	2	5,37 x 10 ³	1,10 x 10 ⁴	6,12 x 10 ⁵	1,55 x 10 ⁷	1,70 x 10 ⁸	1,52 x 10 ⁸	6,17 x 10 ⁸	

* Médias de amostras

ANEXO 10 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 43°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)							
		0	4	6	8	12	16	20	
A	1	6,77 x 10 ³	3,70 x 10 ⁴	5,12 x 10 ⁵	2,00 x 10 ⁶	2,17 x 10 ⁷	3,40 x 10 ⁷	5,25 x 10 ⁷	
	2	7,00 x 10 ³	6,95 x 10 ⁴	6,15 x 10 ⁵	4,90 x 10 ⁶	3,75 x 10 ⁷	4,52 x 10 ⁷	8,45 x 10 ⁷	
B	1	9,07 x 10 ³	2,90 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁶	1,85 x 10 ⁷	4,87 x 10 ⁷	6,65 x 10 ⁷	1,32 x 10 ⁸	
	2	1,75 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁵	3,92 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁷	5,25 x 10 ⁷	7,80 x 10 ⁷	9,42 x 10 ⁷	
C	1	2,82 x 10 ³	1,30 x 10 ⁴	5,25 x 10 ⁵	3,20 x 10 ⁶	7,72 x 10 ⁷	4,40 x 10 ⁸	2,77 x 10 ⁸	
	2	9,95 x 10 ²	2,30 x 10 ⁴	6,25 x 10 ⁵	7,20 x 10 ⁶	9,57 x 10 ⁷	2,92 x 10 ⁸	2,22 x 10 ⁸	
D	1	4,27 x 10 ³	2,70 x 10 ⁴	1,15 x 10 ⁵	1,65 x 10 ⁶	3,35 x 10 ⁷	6,52 x 10 ⁷	7,60 x 10 ⁷	
	2	6,67 x 10 ³	2,42 x 10 ⁴	1,35 x 10 ⁵	9,85 x 10 ⁵	2,80 x 10 ⁷	3,95 x 10 ⁷	NR**	
E	1	9,80 x 10 ³	1,85 x 10 ⁵	9,22 x 10 ⁵	1,40 x 10 ⁷	5,25 x 10 ⁷	3,45 x 10 ⁸	1,97 x 10 ⁸	
	2	3,92 x 10 ³	2,25 x 10 ⁴	3,22 x 10 ⁵	1,80 x 10 ⁶	2,95 x 10 ⁷	2,17 x 10 ⁸	2,95 x 10 ⁸	

* Médias de amostras
** Não realizado

ANEXO 11 – Números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *B. cereus* durante o crescimento em meio de arroz, a 45°C

Suspensões		Tempo de incubação (h)						
		0	2	6	10	14	18	
A	1	7,72 x 10 ²	9,75 x 10 ²	1,07 x 10 ⁴	2,20 x 10 ⁵	8,40 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁷	
	2	9,10 x 10 ³	5,42 x 10 ⁴	9,10 x 10 ⁵	2,02 x 10 ⁷	7,25 x 10 ⁷	7,10 x 10 ⁷	
B	1	6,97 x 10 ³	2,90 x 10 ⁴	5,25 x 10 ⁵	5,90 x 10 ⁶	8,65 x 10 ⁷	3,42 x 10 ⁷	
	2	8,20 x 10 ³	3,35 x 10 ⁴	9,77 x 10 ⁵	1,15 x 10 ⁷	6,12 x 10 ⁷	8,15 x 10 ⁷	
C	1	8,40 x 10 ²	1,27 x 10 ³	5,50 x 10 ⁴	9,67 x 10 ⁵	4,40 x 10 ⁷	9,22 x 10 ⁷	
	2	2, 52x 10 ³	9,40 x 10 ³	6,95 x 10 ⁵	9,80 x 10 ⁶	7,15 x 10 ⁷	6,37 x 10 ⁷	
D	1	9,25 x 10 ³	3,05 x 10 ⁴	7,37 x 10 ⁵	5,85 x 10 ⁶	3,92 x 10 ⁷	5,15 x 10 ⁷	
	2	8,80 x 10 ³	2,02 x 10 ⁴	1,20 x 10 ⁵	2,07 x 10 ⁶	8,95 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁷	
E	1	7,57 x 10 ³	4,15 x 10 ⁴	8,22 x 10 ⁵	1,05 x 10 ⁷	4,35 x 10 ⁷	6,77 x 10 ⁷	
	2	8,62 x 10 ³	2,70 x 10 ⁴	7,95 x 10 ⁵	8,30 x 10 ⁶	7,57 x 10 ⁷	5,95 x 10 ⁷	

* Médias de amostras

ANEXO 12 - Valores preditos pela Equação 2, para taxas de crescimento [K(T)] e populações de *B. cereus*, durante estocagem de arroz em câmara fria

Tempo (min)	Temper. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
0	45.0	0.2945	0.00	0.2968	0.00	0.3808	0.00	0.2706	0.00	0.2903	0.00
10	44.5	0.3469	0.05	0.3521	0.05	0.4431	0.06	0.3140	0.05	0.3520	0.05
20	43.0	0.4742	0.11	0.4859	0.11	0.5864	0.14	0.4253	0.10	0.5023	0.11
30	42.5	0.5078	0.19	0.5208	0.19	0.6216	0.24	0.4565	0.17	0.5419	0.19
40	41.0	0.5853	0.27	0.6011	0.28	0.6965	0.34	0.5336	0.24	0.6336	0.28
50	39.5	0.6329	0.37	0.6497	0.38	0.7342	0.45	0.5884	0.33	0.6901	0.39
60	39.0	0.6430	0.47	0.6600	0.48	0.7401	0.58	0.6021	0.43	0.7022	0.50
70	38.0	0.6559	0.58	0.6729	0.59	0.7439	0.70	0.6234	0.53	0.7177	0.62
80	37.5	0.6590	0.69	0.6758	0.71	0.7422	0.82	0.6310	0.64	0.7215	0.74
90	36.5	0.6591	0.80	0.6756	0.82	0.7328	0.95	0.6409	0.74	0.7220	0.86
100	35.0	0.6465	0.91	0.6623	0.93	0.7067	1.07	0.6432	0.85	0.7075	0.98
110	34.5	0.6393	1.02	0.6549	1.04	0.6954	1.19	0.6410	0.95	0.6993	1.10
120	33.0	0.6108	1.12	0.6257	1.15	0.6557	1.30	0.6264	1.06	0.6661	1.21
130	32.5	0.5992	1.23	0.6140	1.26	0.6409	1.41	0.6192	1.17	0.6527	1.32
140	31.5	0.5736	1.33	0.5881	1.36	0.6097	1.52	0.6015	1.27	0.6229	1.43
150	31.0	0.5597	1.42	0.5741	1.46	0.5933	1.62	0.5912	1.37	0.6068	1.54
160	30.0	0.5302	1.51	0.5445	1.55	0.5597	1.72	0.5680	1.47	0.5725	1.64
170	29.5	0.5147	1.60	0.5289	1.64	0.5426	1.81	0.5552	1.56	0.5546	1.73
180	28.5	0.4825	1.69	0.4968	1.73	0.5078	1.90	0.5277	1.66	0.5173	1.83
190	28.0	0.4660	1.77	0.4804	1.81	0.4904	1.99	0.5130	1.74	0.4983	1.91
200	27.5	0.4493	1.85	0.4637	1.89	0.4729	2.07	0.4979	1.83	0.4789	2.00
210	27.0	0.4325	1.92	0.4469	1.97	0.4554	2.15	0.4822	1.91	0.4595	2.08
220	26.5	0.4155	1.99	0.4300	2.05	0.4380	2.23	0.4662	1.99	0.4399	2.15
230	26.5	0.4155	2.06	0.4300	2.12	0.4380	2.30	0.4662	2.07	0.4399	2.22
240	26.0	0.3984	2.13	0.4131	2.19	0.4208	2.37	0.4498	2.15	0.4203	2.30
250	26.0	0.3984	2.20	0.4131	2.26	0.4208	2.44	0.4498	2.22	0.4203	2.37
260	25.5	0.3814	2.27	0.3961	2.33	0.4036	2.51	0.4331	2.30	0.4007	2.44
270	25.5	0.3814	2.33	0.3961	2.39	0.4036	2.58	0.4331	2.37	0.4007	2.51
280	25.0	0.3644	2.39	0.3792	2.46	0.3866	2.65	0.4162	2.44	0.3812	2.57

ANEXO 12 - continuação

Tempo (min)	Temper. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
290	24,5	0,3474	2,45	0,3624	2,52	0,3698	2,71	0,3990	2,51	0,3617	2,64
300	24,5	0,3474	2,51	0,3624	2,58	0,3698	2,77	0,3990	2,58	0,3617	2,70
310	24,0	0,3306	2,57	0,3457	2,64	0,3533	2,83	0,3818	2,64	0,3425	2,76
320	23,5	0,3139	2,62	0,3291	2,70	0,3370	2,89	0,3644	2,71	0,3235	2,81
330	23,5	0,3139	2,68	0,3291	2,75	0,3370	2,95	0,3644	2,77	0,3235	2,87
340	23,0	0,2974	2,73	0,3127	2,81	0,3209	3,01	0,3470	2,83	0,3047	2,92
350	22,5	0,2811	2,78	0,2966	2,86	0,3051	3,06	0,3295	2,89	0,2862	2,97
360	22,0	0,2650	2,82	0,2806	2,91	0,2896	3,11	0,3122	2,94	0,2681	3,02
370	21,5	0,2492	2,87	0,2649	2,96	0,2744	3,16	0,2949	2,99	0,2503	3,06
380	21,5	0,2492	2,91	0,2649	3,00	0,2744	3,20	0,2949	3,04	0,2503	3,11
390	21,0	0,2338	2,95	0,2496	3,05	0,2596	3,25	0,2777	3,09	0,2329	3,15
400	21,0	0,2338	2,99	0,2496	3,09	0,2596	3,29	0,2777	3,14	0,2329	3,19
410	20,5	0,2186	3,03	0,2345	3,13	0,2451	3,34	0,2607	3,18	0,2160	3,23
420	20,0	0,2039	3,07	0,2197	3,17	0,2309	3,38	0,2440	3,23	0,1996	3,26
430	20,0	0,2039	3,10	0,2197	3,21	0,2309	3,42	0,2440	3,27	0,1996	3,29
440	19,5	0,1895	3,13	0,2054	3,24	0,2171	3,45	0,2274	3,31	0,1836	3,33
450	19,0	0,1755	3,17	0,1913	3,28	0,2037	3,49	0,2112	3,35	0,1682	3,36
460	19,0	0,1755	3,20	0,1913	3,31	0,2037	3,52	0,2112	3,38	0,1682	3,39
470	18,5	0,1619	3,22	0,1777	3,34	0,1906	3,56	0,1954	3,42	0,1533	3,41
480	18,5	0,1619	3,25	0,1777	3,37	0,1906	3,59	0,1954	3,45	0,1533	3,44
490	18,0	0,1487	3,28	0,1645	3,40	0,1780	3,62	0,1798	3,48	0,1389	3,47
500	18,0	0,1487	3,30	0,1645	3,43	0,1780	3,65	0,1798	3,51	0,1389	3,49
510	17,5	0,1361	3,33	0,1517	3,45	0,1657	3,68	0,1648	3,54	0,1252	3,51
520	17,5	0,1361	3,35	0,1517	3,48	0,1657	3,71	0,1648	3,57	0,1252	3,53
530	17,0	0,1239	3,37	0,1394	3,50	0,1539	3,74	0,1501	3,60	0,1121	3,55
540	17,0	0,1239	3,39	0,1394	3,53	0,1539	3,76	0,1501	3,62	0,1121	3,57
550	16,5	0,1122	3,41	0,1275	3,55	0,1424	3,79	0,1359	3,65	0,0997	3,59
560	16,5	0,1122	3,43	0,1275	3,57	0,1424	3,81	0,1359	3,67	0,0997	3,61
570	16,0	0,1010	3,45	0,1161	3,59	0,1314	3,83	0,1223	3,69	0,0879	3,62

ANEXO 12 - continuação

Tempo (min)	Temper. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
580	16,0	0,1010	3,47	0,1161	3,61	0,1314	3,86	0,1223	3,71	0,0879	3,64
590	16,0	0,1010	3,49	0,1161	3,63	0,1314	3,88	0,1223	3,73	0,0879	3,65
600	15,5	0,0903	3,50	0,1052	3,65	0,1208	3,90	0,1092	3,75	0,0767	3,67
610	15,5	0,0903	3,52	0,1052	3,67	0,1208	3,92	0,1092	3,77	0,0767	3,68
620	15,5	0,0903	3,53	0,1052	3,69	0,1208	3,94	0,1092	3,79	0,0767	3,69
630	15,0	0,0802	3,55	0,0947	3,70	0,1106	3,96	0,0967	3,81	0,0663	3,71
640	15,0	0,0802	3,56	0,0947	3,72	0,1106	3,98	0,0967	3,83	0,0663	3,72
650	14,5	0,0706	3,57	0,0848	3,74	0,1009	4,00	0,0848	3,84	0,0566	3,73
660	14,5	0,0706	3,59	0,0848	3,75	0,1009	4,01	0,0848	3,86	0,0566	3,74
670	14,5	0,0706	3,60	0,0848	3,76	0,1009	4,03	0,0848	3,87	0,0566	3,75
680	14,0	0,0616	3,61	0,0753	3,78	0,0916	4,05	0,0736	3,88	0,0476	3,76
690	14,0	0,0616	3,62	0,0753	3,79	0,0916	4,06	0,0736	3,90	0,0476	3,76
700	13,5	0,0532	3,63	0,0664	3,80	0,0827	4,08	0,0630	3,91	0,0393	3,77
710	13,5	0,0532	3,64	0,0664	3,81	0,0827	4,09	0,0630	3,92	0,0393	3,78
720	13,5	0,0532	3,65	0,0664	3,83	0,0827	4,11	0,0630	3,93	0,0393	3,79
730	13,5	0,0532	3,66	0,0664	3,84	0,0827	4,12	0,0630	3,94	0,0393	3,79
740	13,0	0,0453	3,67	0,0581	3,85	0,0743	4,13	0,0532	3,95	0,0318	3,80
750	13,0	0,0453	3,67	0,0581	3,86	0,0743	4,15	0,0532	3,96	0,0318	3,80
760	13,0	0,0453	3,68	0,0581	3,87	0,0743	4,16	0,0532	3,97	0,0318	3,81
770	12,5	0,0381	3,69	0,0502	3,88	0,0663	4,17	0,0441	3,98	0,0251	3,81
780	12,5	0,0381	3,69	0,0502	3,88	0,0663	4,18	0,0441	3,98	0,0251	3,82
790	12,0	0,0314	3,70	0,0429	3,89	0,0587	4,19	0,0358	3,99	0,0191	3,82
800	12,0	0,0314	3,71	0,0429	3,90	0,0587	4,20	0,0358	4,00	0,0191	3,83
810	12,0	0,0314	3,71	0,0429	3,91	0,0587	4,21	0,0358	4,00	0,0191	3,83
820	12,0	0,0314	3,72	0,0429	3,91	0,0587	4,22	0,0358	4,01	0,0191	3,83
830	11,5	0,0254	3,72	0,0362	3,92	0,0516	4,23	0,0283	4,02	0,0140	3,84
840	11,5	0,0254	3,73	0,0362	3,93	0,0516	4,24	0,0283	4,02	0,0140	3,84
850	11,5	0,0254	3,73	0,0362	3,93	0,0516	4,25	0,0283	4,02	0,0140	3,84
860	11,5	0,0254	3,73	0,0362	3,94	0,0516	4,26	0,0283	4,03	0,0140	3,84

ANEXO 13 - Valores preditos pela Equação 2, para taxas de crescimento $K(T)$ e populações de *B. cereus*, durante estocagem de arroz em antecâmara

Tempo (min)	Temper. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
0	45.0	0,2945	0,00	0,2968	0,00	0,3808	0,00	0,2706	0,00	1,00	0,00
10	44.5	0,3469	0,05	0,3521	0,05	0,4431	0,06	0,3140	0,05	1,12	0,05
20	43.5	0,4364	0,11	0,4463	0,11	0,5453	0,14	0,3912	0,10	1,28	0,11
30	43.0	0,4742	0,18	0,4859	0,18	0,5864	0,23	0,4253	0,16	1,53	0,18
40	42.0	0,5373	0,26	0,5515	0,26	0,6514	0,33	0,4848	0,23	1,85	0,27
50	41.5	0,5631	0,35	0,5782	0,36	0,6762	0,43	0,5105	0,31	2,31	0,36
60	41.0	0,5853	0,44	0,6011	0,45	0,6965	0,55	0,5336	0,40	2,91	0,46
70	40.5	0,6042	0,54	0,6205	0,55	0,7127	0,66	0,5543	0,49	3,72	0,57
80	40.0	0,6200	0,64	0,6366	0,66	0,7251	0,78	0,5725	0,58	4,78	0,68
90	40.0	0,6200	0,74	0,6366	0,76	0,7251	0,90	0,5725	0,68	6,19	0,79
100	39.5	0,6329	0,85	0,6497	0,87	0,7342	1,02	0,5884	0,77	8,02	0,90
110	39.0	0,6430	0,95	0,6600	0,98	0,7401	1,15	0,6021	0,87	10,45	1,02
120	38.0	0,6559	1,06	0,6729	1,09	0,7439	1,27	0,6234	0,97	13,69	1,14
130	37.5	0,6590	1,17	0,6758	1,20	0,7422	1,39	0,6310	1,07	18,03	1,26
140	37.5	0,6590	1,28	0,6758	1,31	0,7422	1,52	0,6310	1,18	23,78	1,38
150	37.0	0,6600	1,39	0,6767	1,42	0,7385	1,64	0,6368	1,28	31,36	1,50
160	37.0	0,6600	1,50	0,6767	1,54	0,7385	1,76	0,6368	1,39	41,39	1,62
170	36.5	0,6591	1,61	0,6756	1,65	0,7328	1,89	0,6409	1,50	54,62	1,74
180	36.0	0,6565	1,72	0,6727	1,76	0,7255	2,01	0,6432	1,60	72,06	1,86
190	36.0	0,6565	1,83	0,6727	1,87	0,7255	2,13	0,6432	1,71	94,96	1,98
200	35.0	0,6465	1,94	0,6623	1,99	0,7067	2,25	0,6432	1,82	125,13	2,10
210	35.0	0,6465	2,05	0,6623	2,10	0,7067	2,37	0,6432	1,92	164,16	2,22
220	34.5	0,6393	2,15	0,6549	2,21	0,6954	2,49	0,6410	2,03	215,37	2,33
230	34.5	0,6393	2,26	0,6549	2,32	0,6954	2,60	0,6410	2,14	281,67	2,45
240	34.0	0,6309	2,37	0,6463	2,42	0,6830	2,72	0,6374	2,25	368,36	2,57
250	34.0	0,6309	2,47	0,6463	2,53	0,6830	2,83	0,6374	2,35	479,95	2,68
260	33.5	0,6214	2,58	0,6365	2,64	0,6697	2,95	0,6325	2,46	625,35	2,80
270	33.5	0,6214	2,68	0,6365	2,75	0,6697	3,06	0,6325	2,56	811,33	2,91
280	33.0	0,6108	2,78	0,6257	2,85	0,6557	3,17	0,6264	2,67	1052,61	3,02

ANEXO 13 - continuação

Tempo (min)	Temper. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
290	32,0	0,5868	2,89	0,6014	2,96	0,6255	3,28	0,6108	2,77	0,6383	3,13
300	31,5	0,5736	2,98	0,5881	3,06	0,6097	3,38	0,6015	2,88	0,6229	3,24
310	31,5	0,5736	3,08	0,5881	3,15	0,6097	3,48	0,6015	2,98	0,6229	3,34
320	30,5	0,5452	3,17	0,5595	3,25	0,5767	3,59	0,5800	3,08	0,5900	3,45
330	30,0	0,5302	3,26	0,5445	3,35	0,5597	3,68	0,5680	3,17	0,5725	3,55
340	30,0	0,5302	3,35	0,5445	3,44	0,5597	3,78	0,5680	3,27	0,5725	3,64
350	30,0	0,5302	3,44	0,5445	3,53	0,5597	3,87	0,5680	3,36	0,5725	3,74
360	30,0	0,5302	3,53	0,5445	3,62	0,5597	3,96	0,5680	3,46	0,5725	3,83
370	29,5	0,5147	3,62	0,5289	3,71	0,5426	4,06	0,5552	3,55	0,5546	3,93
380	29,0	0,4988	3,70	0,5130	3,80	0,5253	4,15	0,5418	3,64	0,5361	4,02
390	28,5	0,4825	3,79	0,4968	3,88	0,5078	4,23	0,5277	3,73	0,5173	4,11
400	28,5	0,4825	3,87	0,4968	3,97	0,5078	4,32	0,5277	3,82	0,5173	4,20
410	28,5	0,4825	3,95	0,4968	4,05	0,5078	4,40	0,5277	3,91	0,5173	4,28
420	28,5	0,4825	4,03	0,4968	4,13	0,5078	4,49	0,5277	4,00	0,5173	4,37
430	28,0	0,4660	4,11	0,4804	4,21	0,4904	4,57	0,5130	4,09	0,4983	4,45
440	27,5	0,4493	4,19	0,4637	4,29	0,4729	4,65	0,4979	4,17	0,4789	4,54
450	27,5	0,4493	4,26	0,4637	4,37	0,4729	4,73	0,4979	4,25	0,4789	4,62
460	27,5	0,4493	4,34	0,4637	4,45	0,4729	4,81	0,4979	4,34	0,4789	4,70
470	27,0	0,4325	4,41	0,4469	4,53	0,4554	4,89	0,4822	4,42	0,4595	4,78
480	27,0	0,4325	4,48	0,4469	4,60	0,4554	4,97	0,4822	4,50	0,4595	4,85
490	27,0	0,4325	4,56	0,4469	4,67	0,4554	5,04	0,4822	4,58	0,4595	4,93
500	27,0	0,4325	4,63	0,4469	4,75	0,4554	5,12	0,4822	4,66	0,4595	5,01
510	26,5	0,4155	4,70	0,4300	4,82	0,4380	5,19	0,4662	4,74	0,4399	5,08
520	26,5	0,4155	4,77	0,4300	4,90	0,4380	5,27	0,4662	4,82	0,4399	5,16
530	26,5	0,4155	4,84	0,4300	4,97	0,4380	5,34	0,4662	4,90	0,4399	5,23
540	26,0	0,3984	4,91	0,4131	5,04	0,4208	5,41	0,4498	4,97	0,4203	5,30
550	26,0	0,3984	4,97	0,4131	5,11	0,4208	5,48	0,4498	5,05	0,4203	5,37
560	26,0	0,3984	5,04	0,4131	5,18	0,4208	5,55	0,4498	5,12	0,4203	5,44
570	25,5	0,3814	5,11	0,3961	5,25	0,4036	5,62	0,4331	5,20	0,4007	5,51

ANEXO 13 - continuação

Tempo (min)	Temp. (°C)	Suspensão A		Suspensão B		Suspensão C		Suspensão D		Suspensão E	
		K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)	K(T)	Log(N/N ₀)
580	25,5	0,3814	5,17	0,3961	5,31	0,4036	5,69	0,4331	5,27	0,4007	5,58
590	25,0	0,3644	5,23	0,3792	5,38	0,3866	5,76	0,4162	5,34	0,3812	5,65
600	25,0	0,3644	5,29	0,3792	5,44	0,3866	5,82	0,4162	5,41	0,3812	5,71
610	25,0	0,3644	5,36	0,3792	5,50	0,3866	5,89	0,4162	5,48	0,3812	5,77
620	24,5	0,3474	5,42	0,3624	5,57	0,3698	5,95	0,3990	5,55	0,3617	5,84
630	24,5	0,3474	5,47	0,3624	5,63	0,3698	6,01	0,3990	5,62	0,3617	5,90
640	24,0	0,3306	5,53	0,3457	5,69	0,3533	6,07	0,3818	5,69	0,3425	5,96
650	24,0	0,3306	5,59	0,3457	5,75	0,3533	6,13	0,3818	5,75	0,3425	6,01
660	23,5	0,3139	5,64	0,3291	5,80	0,3370	6,19	0,3644	5,81	0,3235	6,07
670	23,5	0,3139	5,69	0,3291	5,86	0,3370	6,25	0,3644	5,87	0,3235	6,13
680	23,0	0,2974	5,75	0,3127	5,91	0,3209	6,30	0,3470	5,93	0,3047	6,18
690	22,5	0,2811	5,80	0,2966	5,97	0,3051	6,36	0,3295	5,99	0,2862	6,23
700	22,5	0,2811	5,84	0,2966	6,01	0,3051	6,41	0,3295	6,05	0,2862	6,28
710	22,0	0,2650	5,89	0,2806	6,06	0,2896	6,46	0,3122	6,10	0,2681	6,33
720	21,5	0,2492	5,93	0,2649	6,11	0,2744	6,51	0,2949	6,15	0,2503	6,37
730	21,5	0,2492	5,98	0,2649	6,15	0,2744	6,55	0,2949	6,20	0,2503	6,41
740	21,0	0,2338	6,02	0,2496	6,20	0,2596	6,60	0,2777	6,25	0,2329	6,45
750	21,0	0,2338	6,06	0,2496	6,24	0,2596	6,64	0,2777	6,30	0,2329	6,49
760	20,5	0,2186	6,09	0,2345	6,28	0,2451	6,69	0,2607	6,34	0,2160	6,53
770	20,0	0,2039	6,13	0,2197	6,32	0,2309	6,73	0,2440	6,39	0,1996	6,57
780	20,0	0,2039	6,17	0,2197	6,36	0,2309	6,77	0,2440	6,43	0,1996	6,60
790	20,0	0,2039	6,20	0,2197	6,39	0,2309	6,80	0,2440	6,47	0,1996	6,63
800	19,5	0,1895	6,23	0,2054	6,43	0,2171	6,84	0,2274	6,51	0,1836	6,67
810	19,5	0,1895	6,26	0,2054	6,47	0,2171	6,88	0,2274	6,55	0,1836	6,70
820	19,5	0,1895	6,30	0,2054	6,50	0,2171	6,91	0,2274	6,59	0,1836	6,73
830	19,0	0,1755	6,33	0,1913	6,53	0,2037	6,95	0,2112	6,62	0,1682	6,76
840	19,0	0,1755	6,36	0,1913	6,57	0,2037	6,98	0,2112	6,66	0,1682	6,79
850	19,0	0,1755	6,39	0,1913	6,60	0,2037	7,02	0,2112	6,69	0,1682	6,82
860	19,0	0,1755	6,42	0,1913	6,63	0,2037	7,05	0,2112	6,73	0,1682	6,84