

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos  
à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura**

**Milena Martinelli Watanuki**

Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestre em Ciência. Área de concentração:  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Milena Martinelli Watanuki**

**Médica Veterinária**

**Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura**

Orientador:

Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciência. Área de concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**

**2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Watanuki, Milena Martinelli

Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura / Milena Martinelli Watanuki. - - Piracicaba, 2008.

93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.  
Bibliografia.

1. Bacillaceae 2. Esporos bacterianos 3. Germinação 4. Leite 5. Microbiologia de alimentos I. Título

CDD 637.1277  
W324d

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**OFEREÇO . . .**

*Aos meus pais,  
que se dedicaram inteiros e  
renunciaram aos seus sonhos  
para que muitas vezes,  
pudessem realizar os meus.*

*Ao meu marido Israel,  
pelo companheirismo,  
pelo amor, pela paciência, pelo apoio  
...sempre presente em todos os momentos...*

**DEDICO . . .**

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao UNIVERSO, que, pela força infinita, sempre guiou meus passos e me ajudou a finalizar este trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela oportunidade, orientação, paciência e ensinamentos dispensados durante todo o mestrado.*

*Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões e pela atenção dispensada.*

*Ao meu irmão Hugo que sempre me socorreu, principalmente, nos momentos de apuro de informática.*

*A minha irmã Marisol, que mesmo inconscientemente, sempre me ajudou do seu jeitinho.*

*À Manú, que acompanhou quase que diariamente, toda a minha jornada para escrever esta dissertação, pela paciência e compreensão nos momentos atribulados.*

*Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ-USP pela contribuição com os materiais utilizados.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pelo auxílio nas análises estatísticas.*

*Às técnicas do Laboratório de Microbiologia: Rose, Cleomar e Cecília pelo auxílio nas análises microbiológicas.*

*À bibliotecária Bia pelo auxílio na revisão bibliográfica.*

*Às amigas da Pós-Graduação, especialmente: Ana Cláudia Rossi, Cíntia Zanão, Geórgia Vilela e Ingridy Cabral, pelo carinho e amizade.*

*À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP especialmente o Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela oportunidade.*

*Enfim, a todos que exerceram influências sobre minha formação e realização dessa dissertação.*

*“Eu pedi forças... e Deus deu-me dificuldades para fazer-me forte.*

Eu pedi sabedoria.... e Deus deu-me problemas para resolver.

Eu pedi prosperidade...e Deus deu-me cérebro e músculos para trabalhar.

Eu pedi coragem.... e Deus deu-me obstáculos para superar.

Eu pedi amor... e Deus deu-me pessoas com problemas para ajudar.

Eu pedi favores... e Deus deu-me oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi...

*mas eu recebi tudo de que precisava”.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Cadeia produtiva do leite.....	15
2.2 Considerações gerais sobre leite.....	18
2.3 Microbiota do leite.....	20
2.4 Tratamentos térmicos do leite .....	24
2.4.1 Fervura.....	25
2.4.2 Pasteurização.....	26
2.4.3 Ultrapasteurização.....	27
2.4.4 Esterilização.....	28
2.5 Classificação do leite.....	29
2.5.1 Leite cru.....	29
2.5.2 Leite pasteurizado Tipo A.....	29
2.5.3 Leite pasteurizado Tipo B.....	30
2.5.4 Leite pasteurizado Tipo C .....	30
2.5.5 Leite UAT.....	31
2.5.6 Leite esterilizado.....	32
2.6 Legislação.....	32
2.7 Características gerais do <i>Bacillus cereus</i> .....	33
2.8 Resistência térmica do <i>Bacillus cereus</i> .....	37
2.9 Patogenia do <i>Bacillus cereus</i> .....	38
2.9.1 Síndrome diarréica.....	39
2.9.2 Síndrome emética.....	42
2.10 Medidas preventivas.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47



3.1 Matéria-prima.....	47
3.2 Preparo das amostras.....	47
3.3 Tratamento das amostras.....	48
3.4 Metodologia.....	48
3.4.1 Contagem e caracterização de <i>Bacillus cereus</i> diretamente em amostras de leite.....	48
3.4.1.1 Plaqueamento direto: contagem em placa (teste presuntivo).....	48
3.4.1.2 Caracterização do <i>Bacillus cereus</i> .....	50
3.4.2 Contagem e caracterização de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de leite após sete tempos (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h) do processo de fervura (destruição de células vegetativas e ativação dos esporos) mantidas a temperatura ambiente e após quatro tempos (6h, 8h, 10h, 12h) mantidas sob refrigeração (7°C).....	52
3.5 Análise dos resultados.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Avaliação da ocorrência de <i>Bacillus cereus</i> .....	55
4.2 Avaliação da detecção do <i>Bacillus cereus</i> após 1h, 2h, 4h e 6h do processo de fervura com amostras de leite mantidas a temperatura ambiente (germinação de esporos e multiplicação das células vegetativas).....	63
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	80

## RESUMO

### **Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura**

A análise microbiológica atua como ferramenta fundamental para a obtenção de dados sobre a qualidade, sanidade, higiene e segurança na produção de alimentos; desta forma, tem sido adotada na indústria alimentícia para o controle de qualidade. Por sua composição completa e balanceada, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos. Com o objetivo de pesquisar bactérias da espécie *Bacillus cereus* em amostras de leite fluido, bem como a capacidade de germinação de esporos e a multiplicação dessa bactéria após processo de fervura, com manutenção das amostras à temperatura ambiente e à temperatura de refrigeração por períodos de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, foram analisadas 75 amostras de leite, conforme as metodologias recomendadas por Silva et al. (2007). Destas, 46 amostras (61,3%) mostraram-se com algum grau de contaminação pela bactéria antes de serem submetidas à fervura. Por sua vez, as amostras mantidas à temperatura ambiente após a fervura, tiveram suas contagens bacterianas, principalmente a partir da 8<sup>a</sup> hora, superiores à contagem inicial, inclusive atingindo níveis capazes de desencadear uma toxinfecção alimentar, demonstrando a ocorrência da germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas. Por outro lado, alíquotas dessas mesmas amostras mantidas sob refrigeração (7°C) não atingiram populações preocupantes, enfatizando, desse modo, a importância da necessidade da refrigeração do leite após a fervura.

Palavras-chave: Germinação; Esporos; Fervura; Leite; *Bacillus cereus*.

## ABSTRACT

### **Detection of *Bacillus cereus* in milk and evaluation of the germination of its spores to the ambient and refrigeration temperatures after process of boil**

The microbiological analysis acts as basic tool for the attainment of data on the quality, health, hygiene and security in the food production, in such a way, she has been adopted in the nourishing industry for the quality control. For its complete and balanced composition, milk is an ideal substratum for the development of diverse groups of microorganisms. With the objective to search cereus bacteria of the *Bacillus* species in fluid milk samples, as well as the capacity of germination of spores and the multiplication of this bacterium after boil process, with maintenance of the samples to the ambient temperature and the temperature of refrigeration for periods of 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours, 75 milk samples had been analyzed, as the methodologies recommended for Silva et al. (2007). Of these, 46 samples (61.3%) had revealed with some degree of contamination for the bacterium before being submitted to the boil. In turn, the samples kept to the ambient temperature after the boil, had its bacterial countings, mainly from 8<sup>a</sup> hour, superiors to the initial counting, also reaching levels capable to unchain an alimentary toxinfection, demonstrating to the occurrence of the germination of the spores and the multiplication of the vegetative cells. On the other hand, aliquot of these same samples kept under refrigeration (7°C) had not reached preoccupying populations, emphasizing, in this manner, the importance of the necessity of the refrigeration of milk after the boil.

Keywords: Germination; Spores; Boil; Milk; *Bacillus cereus*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção total de leite e produção sob inspeção (SIF) no Brasil, 1997-2007.....	17
Figura 2 - Esquema de análise para contagem de <i>B. cereus</i> em leite pelo método de plaqueamento direto e caracterização bioquímica da bactéria.....	49
Figura 3 - Esquema de alíquotas utilizadas durante o experimento.....	53
Figura 4 - Evolução da população média de <i>B. cereus</i> em amostras de leite cru após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração.....	74
Figura 5 - Evolução da população média de <i>B. cereus</i> em amostras de leite pasteurizado tipo A após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração.....	75
Figura 6 - Evolução da população média de <i>B. cereus</i> em amostras de leite pasteurizado tipo B após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração.....	75
Figura 7 - Evolução da população média de <i>B. cereus</i> em amostras de leite pasteurizado tipo C após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração.....	76
Figura 8 - Evolução da população média de <i>B. cereus</i> em amostras de leite UAT após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração.....	76
Figura 9 – Temperaturas médias de fervura e após 1h das amostras de leite mantidas à temperatura ambiente.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de toxinfecção por <i>Bacillus cereus</i> .....	43
Tabela 2 - Ocorrência de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de leites crus, pasteurizados e UAT coletados no comércio da região de Piracicaba/SP, durante os meses de janeiro a junho de 2007.....	55
Tabela 3 - Contagem total de <i>B. cereus</i> em leite cru (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise.....	56
Tabela 4 - Contagem total de <i>B. cereus</i> em leite pasteurizado tipo A (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise.....	56
Tabela 5 - Contagem total de <i>B. cereus</i> em leite pasteurizado tipo B (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise.....	57
Tabela 6 - Contagem total de <i>B. cereus</i> em leite pasteurizado tipo C (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise.....	58
Tabela 7 - Contagem total de <i>B. cereus</i> em leite UAT (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise.....	60
Tabela 8 - Incidência de <i>B. cereus</i> nas amostras de leite analisadas.....	60
Tabela 9 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite cru após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente.....	63
Tabela 10 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo A após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente.....	64
Tabela 11 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo B após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente.....	64
Tabela 12 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo C após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente.....	65
Tabela 13 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite UAT após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente.....	65
Tabela 14 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite cru após 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração.....	66

Tabela 15 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo A após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração.....	67
Tabela 16 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo B após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração.....	68
Tabela 17 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo C após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração.....	69
Tabela 18 - Contagem total de <i>B. cereus</i> (UFC/mL) em amostras de leite UAT após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração.....	71
Tabela 19 - Médias das contagens de <i>B. cereus</i> , temperaturas e pH para cada tempo para os diferentes tipos de leite analisados.....	72
Tabela 20 - Médias das contagens de <i>B. cereus</i> , temperaturas e pH para os tempos 6h, 8h, 10h e 12h para os diferentes tipos de leite analisados sob refrigeração.....	73
Tabela 21 - Temperaturas médias de fervura e após 1 hora das amostras mantidas sob temperatura ambiente.....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O leite apresenta um excepcional valor nutritivo, atribuído à presença de proteínas, carboidratos, gordura, sais minerais e vitaminas em teores adequados, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (JENNESS, 1999; SOUZA, 2007). É um dos alimentos mais completos, mas sua composição química e a microbiota que o acompanha o tornam um produto altamente perecível, necessitando para sua conservação de adequados tratamentos higiênicos e tecnológicos (BARTOSZEWICZ; HANSEN; SWIECICKA, 2008).

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto, causam modificações físico-químicas e organolépticas, que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de representarem problemas econômicos e de saúde pública (FREITAS; OLIVEIRA; GALINDO, 2005).

Os perigos potenciais dos produtos lácteos à saúde humana estão normalmente relacionados às falhas no processo de pasteurização, consumo de leites crus ou de produtos fabricados sem tratamento térmico, contaminação dos produtos lácteos por patógenos resistentes aos processamentos usuais, contaminações químicas ou ainda doenças dos animais transmitidas aos homens (RUEGG, 2003). Enfim, a qualidade de todos os produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima (LANDGRAF, 2006), das condições do processamento, e da contaminação pós-pasteurização (BARTOSZEWICZ; HANSEN; SWIECICKA, 2008; RICHER; VEDAMUHU, 2001).

Tendo em vista a importância do leite e por ser consumido por todas as faixas etárias, torna-se necessário que sua qualidade seja garantida (TAVARES, 1996). Por esse motivo, a qualidade desse produto tem merecido a atenção de inúmeros pesquisadores e autoridades ligadas à área de saúde e tecnologia de alimentos, principalmente pelos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores (QUINTANA; CARNEIRO, 2006).

Dentre os vários microrganismos que podem chegar ao leite “in natura” através das fezes e camas dos animais, poeira, equipamentos e utensílios deficientemente higienizados, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, especialmente o *Bacillus cereus*. São bactérias comuns do solo que estão frequentemente presentes no leite cru (BARTOSZEWICZ; HANSEN; SWIECICKA, 2008; CHRISTIANSSON; BERTTISSON; SVENSSON, 1998; ROSSLAND et

al., 2003;), onde a resistência ao calor é uma característica comum, pelo fato delas esporularem (SCHOKEN-ITURRINO; FILHO; DIMENSTEIN, 1996).

A presença do *Bacillus cereus* no leite é uma das maiores preocupações na indústria de laticínios (LIN et al., 1998). Esse microrganismo pode causar alterações sensoriais no leite (BECKER et al., 1994; LIN et al., 1998; MÄNTYNEN; LINDSTRÖM, 1998), além de ser responsável por surtos de intoxicação alimentar.

Desta forma, em doenças de origem alimentar causada por *B. cereus*, duas síndromes distintas são conhecidas, uma de natureza diarréica devido ao consumo de leite e seus derivados, produtos cárneos, molhos, sopas e vegetais, e outra emética associada à ingestão da toxina produzida em arroz frito e cozido, massas e macarrões. Ambas são autolimitantes e a recuperação ocorre dentro de 24 horas (AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002; ROSSLAND et al., 2003).

Nestes tipos de enfermidade, o alimento implicado geralmente foi tratado com calor, e os esporos sobreviventes são a origem das síndromes. O tratamento térmico inicia a germinação dos esporos e, na ausência da microbiota competitiva, tem condições de se proliferar no produto. Nos últimos anos, o aparecimento de cepas psicrotóficas na indústria leiteira tem conduzido a uma vigilância aumentada do *B. cereus* (GRANUM, 1997).

Como objetivo de pesquisa, o presente trabalho procurou detectar *Bacillus cereus* em amostras de leite cru, pasteurizado (A, B e C) e UAT (ultra-alta temperatura) disponíveis no mercado, bem como avaliar a germinação de esporos e a multiplicação dessa bactéria logo após o processo de fervura, com manutenção das amostras à temperatura ambiente e sob refrigeração por períodos de uma hora a doze horas. Ao realizar estes procedimentos, os quais são semelhantes aos executados normalmente pelos consumidores, pretendeu-se analisar e avaliar os riscos que tais processos representam à saúde pública.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cadeia produtiva do leite**

As empresas de laticínios representam um mercado que movimentava bilhões de dólares no mundo inteiro. Segundo a EMBRAPA – Gado de Leite (2007a), a produção de leite, no mundo, passou de 468 milhões de toneladas, em 1996, para 549 milhões de toneladas, em 2006. A Europa é o maior produtor de leite, seguido da América do Norte, Ásia, América do Sul, Oceania, África e América Central.

De acordo com a classificação mundial dos principais países produtores de leite, o Brasil ocupa o sexto lugar, perfazendo 25 milhões de toneladas de leite em 2006 (EMBRAPA, 2007b; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2007). O Estado de São Paulo produziu 1,7 milhões de litros de leite em 2004, ocupando o quinto lugar, de acordo com o ranking da produção anual de leite por Estado elaborado pela Embrapa Gado de Leite (EMBRAPA, 2006).

As maiores regiões produtoras do Estado de São Paulo em ordem de importância, considerando a produção de 2004, foram: São José do Rio Preto (1.074 mil litros/dia), Vale do Paraíba (556 mil litros/dia), Ribeirão Preto (518 mil litros/dia) e Campinas (502 mil litros/dia) (ROSOLEN, 2006).

Tanto no Estado de São Paulo, como em outros estados brasileiros, fatores de natureza higiênica, sanitária e tecnológica têm marcante influência na qualidade do leite produzido, e conseqüentemente, na qualidade do leite exposto ao consumo (FREITAS; OLIVEIRA; GALINDO, 2005).

A fim de melhorar a qualidade do leite produzido no país foi aprovada em 2002 a Instrução Normativa nº51 (IN-51) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002), que constitui parte do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PMNQL), a qual atualizou a legislação brasileira de qualidade do leite. A implementação de programas de pagamento por qualidade realizada pela indústria laticinista também foi uma alteração sofrida pela pecuária de leite (AMARAL, 2007). Dentre os aspectos mais significativos desta nova legislação destacam-se: qualidade microbiológica do leite (tornando o antigo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem

Animal- R.I.I.S.P.O.A., datado de 1952, mais rígido), e Contagem de Células Somáticas (CCS), que não constava no regulamento anterior, além de determinações envolvendo resíduos de antibióticos e resfriamento do leite na fazenda (SANTOS; FONSECA, 2003).

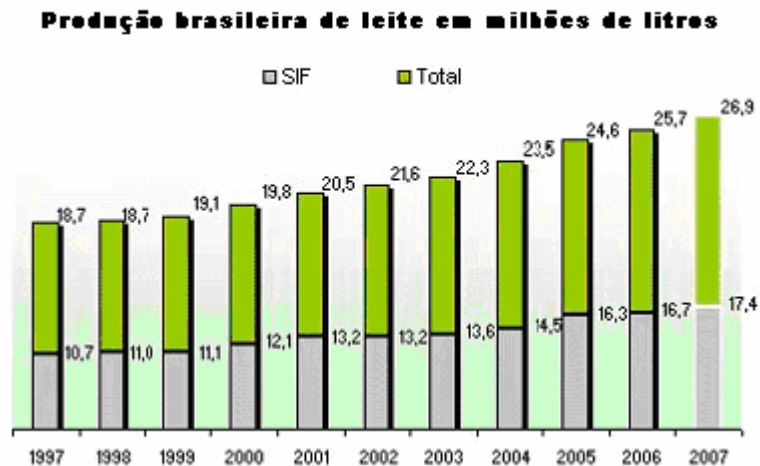
Nos últimos anos, o mercado de leite no Brasil, tem mostrado uma direção para o aumento cada vez maior da oferta e consumo de leite UAT. Hoje o mercado consumidor é superior a 70% desse produto em relação ao leite fluido comercializado no país. Mesmo com essa tendência não se pode esquecer de outras alternativas tecnológicas para o leite fluido no mercado (BUSANI, 2005).

Estima-se que 30 a 40% do leite distribuído à população brasileira não seja pasteurizado, sendo distribuído na forma de leite cru. Uma das possíveis razões para que isso aconteça talvez seja a falta de alternativas simples e econômicas para a realização da pasteurização, antes da distribuição do produto aos consumidores (BUSANI, 2005).

O consumo brasileiro de leite fluido no ano de 2004 foi totalizado em 5.993 milhões de litros divididos em leite UAT com consumo de 4.403 milhões de litros (73,4%), leite tipo A com um consumo de 55 milhões de litros (0,91%), leite tipo B com 460 milhões de litros (7,7%) e leite tipo C, com um consumo de 1.075 milhões de litros (18,0%) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA- ABLV, 2007, 2008a ).

A cadeia produtiva brasileira do leite emprega, anualmente, cerca de 3,5 milhões de pessoas, dos quais um milhão e 300 mil são produtores, sendo aproximadamente 320 mil produtores comerciais e acima de 100 empresas, entre centrais, cooperativas e usinas que industrializam e comercializam produtos lácteos (BOTEGA, 2005).

Existem dois tipos de mercado de lácteos no Brasil: o mercado formal e o mercado informal, ambos de grande relevância. A diferença entre eles é o mercado formal estar sob inspeção sanitária e higiênica do governo, já o mercado informal não estar sob nenhuma inspeção. A comercialização do mercado formal é feita por meio de cooperativas, ou indústrias particulares que, em geral, estão sob fiscalização dos governos. O mercado informal não é fiscalizado e sua comercialização é feita desde a venda de leite cru à domicílio e derivados, como queijo fresco, mussarelas, iogurtes, e outros (BOTEGA, 2005). A Figura 1 mostra a produção leiteira total do país acompanhada da produção sujeita ao Serviço de Inspeção Federal (SIF).



Fonte: EMBRAPA, 2007c.

Figura 1 – Produção total de leite e produção sob inspeção (SIF) no Brasil, 1997-2007

A década analisada (1997-2007) mostrou que a produção de leite não submetida ao SIF ainda é grande, sendo obtida principalmente por pequenos produtores.

Quanto à contribuição dos produtores, a assimetria da produção é uma característica marcante da produção de leite no Brasil.

Segundo Gomes (2004), existem grandes diferenças entre o sistema de produção de pequenos, médios e grandes produtores de leite. As características básicas da grande maioria dos produtores são baixo nível de informação, pequenos volumes de produção, produção não especializada e baixa produtividade. A maioria dos produtores, cerca de 80%, é responsável por apenas 20% da produção, enquanto os grandes produtores, cerca de 20%, são responsáveis por cerca de 80% da produção de leite.

Existem produtores com diferentes graus de especialização na atividade leiteira, desde os mais modernos, usando tecnologias avançadas e produzindo 40 mil litros por dia, até os de subsistência, com técnicas rudimentares e produção diária menor que dez litros (CARVALHO, 2004).

O aumento da participação do grande produtor significa que a produção do leite está se concentrando. Muitos dos pequenos produtores estão sendo expulsos do mercado formal e estão indo para o mercado informal, daí o crescimento desse mercado.

É importante ressaltar que, mediante a proibição legal imposta à comercialização de leite cru no Brasil, todo o leite produzido, para ser comercializado diretamente ao consumidor deve ser pasteurizado (BRASIL, 2002). É importante analisar um produto altamente perecível que está sendo comercializado fora dos parâmetros normativos vigentes, uma vez que este produto sem pasteurização pode transmitir inúmeras enfermidades ao homem, causadas por vários microrganismos patogênicos. Além da problemática da comercialização do leite cru, não há uma seriedade e frequência na realização das análises físico-químicas, enzimáticas e microbiológicas com o intuito de produzir um produto com um mínimo de qualidade exigido pela legislação, agravando ainda mais o comércio informal de leite, o qual é uma grande ameaça à saúde pública. A este respeito, a Organização Mundial de Saúde (OMS) comprovou a existência de sete enfermidades viróticas e de dezesseis bacterianas veiculadas por este produto, dentre elas, as gastroenterites, conseqüentes da baixa qualidade do leite (AGNESE, 2002).

## **2.2 Considerações gerais sobre leite**

O leite é considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios de vida, quando se constitui em alimento exclusivo (OLIVEIRA, 2003).

Por definição, leite é uma complexa dispersão aquosa contendo lipídios em estado emulsificado (glóbulos de gordura com alguns micrômetros de diâmetro), proteínas em estado coloidal (micelas de caseína com 0,05-0,5 $\mu$ m) ou molecularmente dispersas (proteínas do soro) e substâncias orgânicas ou inorgânicas solubilizadas (sais e lactose, incluindo vitaminas hidrossolúveis e compostos nitrogenados não-protéicos). O leite fresco é ligeiramente ácido, com pH variando entre 6,5 a 6,7. Dentro de uma mesma espécie a composição do leite depende de uma série de fatores, como: raça, estágio de lactação, frequência de ordenha, tipo de alimento e método de alimentação (FROEDER, 1985; LARSON, 1985).

As porcentagens médias dos componentes do leite são: 87,3% de umidade; 4,8% de lactose; 3,7% de matérias gordurosas em estado de emulsão, 3,3% de proteínas (caseína e albumina); cálcio, 123 mg; cloretos, 103 mg; magnésio, 12 mg; fósforo total, 96 mg; fósforo inorgânico, 80 mg; nitrogênio não protéico, 32 mg; vitamina C, 6 mg; vitamina E, 0,06 mg; vitamina A, 146 mg; vitamina D, 2,4 mg; biotina, 3,5  $\mu$ g; ácido nicotínico, 85  $\mu$ g; piridoxina, 48

µg; ácido pantotênico, 0,35 µg; vitamina B2, 157 µg; vitamina B1, 42 µg; vitamina B12, 0,56 µg e vitamina K (Dam) 100 µg, para cada 100 mL de leite (HILGENBERG et al., 2005).

A gordura é o principal componente energético do leite e consiste predominantemente de triglicerídeos (acima de 95%) em todos os mamíferos, mas o teor de gordura varia amplamente entre as espécies (GAMA; ALMEIDA, 2004), sendo que o teor médio no leite de vaca é de 3,5%.

O conteúdo de proteína e sua composição são os fatores mais importantes na determinação da qualidade do produto lácteo final (PEREIRA et al., 1997). O teor médio de proteína no leite da vaca é de 3,1%.

A lactose, principal carboidrato do leite normalmente conhecida como “açúcar do leite”, é encontrada no leite de vacas sadias com valor médio de 4,8 a 4,9% (AMARAL, 2007).

Devido a estes elementos nutricionais e as suas características intrínsecas, como alta atividade de água e pH próximo ao neutro, o leite é um excelente substrato para o crescimento de microrganismos (BARTOSZEWICZ; HANSEN; SWIECICKA, 2008; LANDGRAF, 2006). Por estes motivos, o leite deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até a ocasião de seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (OLIVEIRA, 2003).

Quando obtido ou processado em más condições higiênico-sanitárias, pode tornar-se importante veículo de transmissão de microrganismos patogênicos ao homem (VIDAL-MARTINS; ROSSI; REZENDE-LAGO, 2005).

A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, porém, as principais fontes de contaminação são os equipamentos utilizados durante a manipulação, o transporte, o processamento e o armazenamento (LANDGRAF, 2006).

A produção higiênica do leite, tanto na fazenda quanto no laticínio, é um fator indispensável, tanto do ponto de vista de saúde pública, como na obtenção de seus derivados. Mas, por melhor que seja esta obtenção do produto, microrganismos normalmente encontram-se como contaminantes do leite. Alguns deles são totalmente inofensivos à saúde, porém existem outros capazes de causar vários tipos de doenças. Desta forma, a aplicação de tratamentos térmicos ao leite, visando eliminar microrganismos patogênicos eventualmente presentes, é extremamente importante no sentido de assegurar ao consumidor um produto de alta qualidade sanitária, além de propiciar um aumento da vida útil do leite pela eliminação da maioria dos microrganismos presentes (OLIVEIRA; GALLO; CARVALHO, 1994).

### 2.3 Microbiota do leite

A síntese e a secreção do leite nos alvéolos mamários é um processo que ocorre de maneira praticamente isenta de microrganismos em animais saudáveis (SPEXOTO, 2003). Em animais com boa saúde da glândula mamária, a cisterna, o canal e a extremidade do teto podem ser colonizados por uma ampla variedade de microrganismos, entretanto, a presença destes microrganismos não é considerada uma fonte importante de contaminação do leite em animais saudáveis (AMARAL, 2007). Porém, após a saída do interior do úbere, o leite está sujeito à contaminação por microrganismos oriundos de diversas fontes: microrganismos presentes na pele dos tetos antes da ordenha (lama, esterco), da mão de ordenhadores, superfícies internas de equipamento de ordenha, do tanque de expansão, dos latões para transporte e da água empregada na limpeza dos equipamentos e utensílios de ordenha, além da própria glândula mamária de vacas com mastite (AMARAL, 2007; SOUZA, 2007).

O leite é um meio ideal para o desenvolvimento de bactérias, sendo sua microbiota natural constituída por cerca de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/mL, proveniente dos canais de saída, do úbere, dos equipamentos de ordenha utilizados durante a produção e das mãos dos ordenhadores (BUSANI, 2005).

Mesmo que o leite recém-ordenhado possa conter inibidores microbianos naturais, como as lactoferrinas e o sistema de lactoperoxidase (LP), sua eficiência antimicrobiana diminuiu durante a estocagem (FRANK, 1997), favorecendo, portanto, a multiplicação tanto dos microrganismos que constituem a microbiota normal e que não chega a alterar a qualidade do leite, quanto daqueles que são agentes deteriorantes. Entre os principais grupos de bactérias deterioradoras presentes no leite, destacam-se as bactérias lácticas, coliformes, psicrófilas e termofílicas.

Além disso, o leite pode ser veículo de bactérias potencialmente patogênicas, particularmente enterobactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shigella* (FRANK, 1997; PELCZAR; REID, CHAN 1997). Jayarao e Henning (2001) relataram que os microrganismos patogênicos mais comumente encontrados em amostras de leite cru são: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de shigatoxina 1 e 2.

Bactérias como *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e outras, também assumem importância na qualidade do leite, pois podem ser transmitidas ao homem pelo consumo de leite cru causando doenças, ou ainda são responsáveis por mudanças na cor, sabor e aroma, nos teores de gordura, lactose e proteína (BUSANI, 2005).

Os grupos de bactérias comumente presentes no leite são: bactérias lácticas, coliformes e outros microrganismos Gram-negativos, associados às práticas de produção e processamento não higiênicas; bactérias termofílicas, capazes de resistir ao processo de pasteurização; esporos, formas de resistência de alguns microrganismos; bactérias causadoras de mastite, que podem contaminar o leite de animais com mastite subclínica; bolores e leveduras diversas; e bactérias psicrófilas, que se multiplicam em temperaturas inferiores a 7°C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (BRAMLEY et al., 1984).

Coliformes são bactérias Gram-negativas, fermentadoras de lactose e produtoras de ácido e gás. Os principais gêneros de coliformes encontrados no leite são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (JAY, 2000).

Segundo Cousin (1982), os microrganismos psicrófilos encontrados no leite são na maioria Gram-negativos, podendo os Gram-positivos estarem presentes em menor quantidade. Os principais gêneros de bactérias psicrófilas encontrados no leite são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (Gram-negativos) e *Bacillus* e *Clostridium* (Gram-positivos). Essas bactérias são eliminadas pela pasteurização, mas algumas enzimas, produzidas pelas bactérias Gram-negativas, e os esporos, produzidos pelas Gram-positivas, são termorresistentes e podem causar grandes danos aos derivados lácteos (CHAMPAGNE et al., 1994; SANTOS; FONSECA, 2003; SORHAUG, STEPANIAK, 1997).

Segundo Brito e Brito (1998), os dois grupos de enzimas mais importantes produzidos pelas bactérias psicrófilas são as proteases e as lipases, que podem atuar no leite cru estocado e também no leite pasteurizado e seus derivados. Estas enzimas comprometem a qualidade destes produtos quando as contagens de psicrófilos atingem  $10^6$  UFC/mL, de modo a provocar alterações do sabor e odor do leite, bem como a perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelatinização do leite longa vida (COUSIN, 1982).

Alguns estudos têm evidenciado altas contagens de psicrófilos, na ordem de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/mL em leite cru refrigerado (MENDONÇA, 2001).

Grande parte dos testes de predição de vida útil de produtos lácteos é baseada na detecção de psicrotróficos, pois estes microrganismos e suas enzimas são também os principais causadores da redução da vida de prateleira destes produtos (PEREIRA JÚNIOR, 2001).

As proteases são as enzimas que causam maior impacto econômico negativo na industrialização do leite, por atuar diretamente sobre a caseína e causar sabor amargo no leite ou nos derivados lácteos. As lipases produzem cadeias médias e curtas de ácidos graxos que conferem ao leite sabor e aroma rançoso (BRITO; BRITO, 1998; FORSYTHE, 2002).

Segundo Soares e Prata (2004), a alta correlação entre a contagem de psicrotróficos e a contagem total de microrganismos mostra que a imensa maioria dos psicrotróficos enumerados com característica proteolítica é, na verdade, composta por microrganismos mesófilos que se adaptaram à condição oferecida pelos tanques de refrigeração. Tal fato pode estar relacionado à negligência nos procedimentos de higiene de ordenha, que leva à contaminação do leite com uma microbiota diversa, capaz de se adaptar às condições encontradas nos tanques de refrigeração e pelo longo tempo de armazenamento do leite cru em tanques mal higienizados, que favorece ainda mais essa condição.

O resfriamento é a principal forma de conservação do leite após a ordenha. A refrigeração impede a multiplicação exagerada da maioria dos microrganismos do leite, entretanto não impede a multiplicação dos microrganismos psicrotróficos (ZALL, 1990).

As bactérias aeróbias mesófilas são capazes de se multiplicarem em temperaturas entre 20 e 45°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é em torno de 32°C. Países de clima tropical apresentam temperaturas ambientes mais elevadas, proporcionando ótimas condições para o rápido desenvolvimento deste grupo de microrganismos (LANDGRAF, 2006). A importância deste grupo de bactérias se deve ao fato de compreender a maioria dos contaminantes comuns do leite, tanto deteriorantes quanto patógenos, desta forma, sua contagem é considerada um bom indicador da qualidade microbiológica do leite (JAY, 1996). Em situações de higiene deficiente na ordenha e ausência de resfriamento do leite as bactérias aeróbias mesófilas são comumente predominantes (SPEXOTO, 2003).

As contagens microbianas elevadas no leite pasteurizado podem indicar alta carga bacteriana na matéria-prima ou a permanência do produto em temperatura inadequada (não refrigeração, refrigeração deficiente ou baixa taxa de refrigeração), manipulação inadequada,



equipamentos e plantas de processamento não sanitizados ou sanitizados inadequadamente, e pasteurização deficiente (SANVIGO, 2007).

As bactérias mesófilas fermentam a lactose, principal carboidrato do leite, produzindo principalmente ácido láctico e reduzindo o valor comercial do leite. Em situações extremas, o aumento da acidez e a diminuição do pH até valores próximos ao ponto isoelétrico da caseína resultam na desestabilização da micela seguida da sua coagulação, resultando na não aceitação do produto e seu descarte (SPEXOTO, 2003).

Algumas bactérias, entre elas o *Mycobacterium lactium*, estreptococos termófilos e algumas espécies de micrococcos, são capazes de suportar o tratamento térmico convencional (pasteurização) mesmo sem formar esporos. Tratamentos térmicos acima de 80°C por 20 segundos os destroem (WALSTRA, 1999).

Estes microrganismos, capazes de sobreviver ao tratamento térmico, são chamados de termodúricos. Os termodúricos proliferam preferencialmente em locais onde os competidores não se adaptam. O equipamento de ordenha, devido às altas temperaturas utilizadas em seu processo de limpeza, inibe o crescimento de bactérias lácticas, e, em função disso, torna-se a principal fonte de contaminação do leite por microrganismos termodúricos (WALSTRA, 1999).

Entre os microrganismos termodúricos destacam-se os formadores de esporos. As bactérias esporuladas são capazes de alterarem sua forma vegetativa para uma forma de resistência (esporo), visando sobreviver às condições extremas do meio ambiente em que se encontra. Mesmo quando submetidas ao tratamento de ultra alta temperatura (UAT ou UHT, do inglês, Ultra High Temperature), capaz de eliminar totalmente as formas vegetativas de microrganismos presentes no leite, as formas esporuladas, altamente resistentes ao calor (Highly Heat Resistant Spores – HHRS), poderão estar presentes no produto, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria-prima (SCHOCKEN-ITURRINO; FILHO; DIMENSTEIN, 1996).

Algumas das espécies de bacilos esporulados, isolados frequentemente do leite, como o *B. cereus*, *B. coagulans* e *B. megaterium* entre outros, causam deterioração devido à produção de lipases e proteases. Algumas cepas (*B. cereus*, *B. licheniformes*, *B.adius*, *B. subtilis* e *B. pumilus*) podem representar também risco à saúde dos consumidores por produzirem enterotoxinas e causarem surtos de toxinfecção (BLAKE, WEIMER, 1997).

Apesar de o leite ser submetido a tratamentos térmicos, formas esporuladas altamente resistentes ao calor (highly heat resistant spores – HHRS), poderão estar presentes no produto, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria-prima. As principais bactérias esporuladas, as mais resistentes ao calor e de importância na microbiologia alimentar, pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (VIDAL-MARTINS; ROSSI; REZENDE-LAGO, 2005).

Entre as espécies do gênero *Bacillus*, uma das mais importantes na indústria de alimentos é o *Bacillus cereus*, tendo em vista sua capacidade de produzir toxinas, responsáveis por toxinfecções alimentares, enzimas extracelulares, que determinam o potencial de deterioração, e esporos, que podem resistir aos tratamentos térmicos, inclusive o UAT. Desta forma, através da germinação dos esporos e livres da competição com outras células vegetativas, o *Bacillus cereus* é capaz de se desenvolver facilmente no produto (CRONIN; WILKINSON, 2008; GRANUM, 1997).

Em leite e derivados, os estudos sobre a ocorrência de *B. cereus* têm adquirido importância devido ao isolamento de cepas psicrófilas produtoras de toxinas e às propriedades de adesão e termorresistência dos esporos (CHRISTIANSSON et al., 1989; DUFRENNE et al., 1994; VAN NETTEN et al., 1990). Além destes aspectos, *B. cereus* pode provocar fenômenos indesejáveis em laticínios, como a agregação da camada lipídica em leite pasteurizado (bitty cream) e a coagulação da caseína sem redução do pH (sweet curdling), ambos causados por ação das lecitinas produzidas pelo microrganismo (ANDERSSON; RONNER; GRANUM, 1995; LARSEN; JORGENSEN, 1997).

## **2.4 Tratamentos térmicos do leite**

O emprego de altas temperaturas na conservação do leite está fundamentado nos efeitos deletérios que o calor tem sobre os microrganismos. Temperaturas elevadas causam a desnaturação de proteínas e a inativação de enzimas necessárias ao metabolismo microbiano. O controle do crescimento microbiano visa eliminar riscos à saúde do consumidor, e prevenir ou retardar as alterações indesejáveis no leite, aumentando seu prazo de validade (SANCHEZ, 2005).

O tratamento térmico necessário para destruir os microrganismos ou seus esporos varia com o tipo de microrganismo, a forma em que o microrganismo se encontra e o ambiente durante o tratamento (LANDGRAF, 2006).

O tratamento térmico é relevante na evolução da tecnologia alimentar (BASTOS, 1999). Ele é eficiente se for respeitado o binômio tempo  $\times$  temperatura, para que sejam eliminados os microrganismos e preservadas as características sensoriais e o valor nutricional do produto. No mercado, são encontrados leites tratados pelo calor, como é o caso do leite pasteurizado e o leite submetido a ultra-alta temperatura (UAT) ou longa vida (PRATA, 1998).

A aplicação de altas temperaturas para a conservação do leite pode ser conseguida através de vários processos: pasteurização, ultrapasteurização, esterilização, concentração, desidratação e evaporação. Sanchez (2005) e ABLV (2008b) citam que, dentre estes, os três primeiros são os mais comumente aplicados no leite de consumo. A diferença entre a pasteurização e a ultrapasteurização está na temperatura e no tempo de processamento. Essas diferenças de processamento resultam em qualidade do produto semelhante, mas em tempos de armazenamento muito diferentes (SANCHEZ, 2005). A fervura também é considerada um tratamento térmico, porém aplicado em nível domiciliar.

#### **2.4.1 Fervura**

Consiste em um tratamento térmico caseiro, onde o leite é submetido a uma temperatura de 100°C, ou seja, até a sua “subida” no interior de um recipiente, sendo então, a fonte de calor desligada. Justifica-se a fervura como medida para reduzir ainda mais a contagem de microrganismos no leite pasteurizado e de estender um pouco mais sua vida útil (WOLFSCHOON-POMBO, 1984).

A fervura doméstica do leite, assim como outros processos térmicos, é importante para a preservação de suas qualidades higiênicas, eliminando-se, desta forma, microrganismos patogênicos, sendo recomendada na impossibilidade de aplicação de outros processamentos térmicos (PÓVOA; MORAES-SANTOS, 1982). Enquanto não seja demonstrado que um tratamento térmico excessivo implique em efeitos toxicológicos, a fervura doméstica deverá ser praticada no Brasil como meio de reduzir a carga microbiana do leite (WOLFSCHOON-POMBO, 1984).

### 2.4.2 Pasteurização

Segundo o artigo 517 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (R.I.I.S.P.O.A.), do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 1952), entende-se como pasteurização o emprego conveniente do calor com o fim de destruir totalmente a microbiota patogênica, sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais.

As relações entre tempo e temperatura de pasteurização foram originalmente determinadas para o *Mycobacterium tuberculosis*, por ser considerado, entre os patógenos em potencial encontrados no leite, o mais resistente ao calor. Esta bactéria é destruída quando exposta a uma temperatura de 60°C durante 10 minutos. Por segurança, a temperatura de pasteurização foi fixada em 61,6° por 30 minutos. Mais tarde foi descoberto que a *Coxiella burnetti*, agente etiológico da febre Q, transmissível pelo leite, pode sobreviver no leite aquecido a 61,6° durante 30 minutos. Consequentemente, ela se tornou a bactéria alvo da pasteurização, ou seja, se ela for destruída, todas as outras patogênicas também o serão. Como resultado desse achado foi estabelecido as atuais temperaturas de pasteurização em níveis mais elevados (ABREU, 1999; PELCZAR; REID; CHAN, 1997).

O principal objetivo da pasteurização é a total destruição dos microrganismos patogênicos não formadores de esporos, além de todas as leveduras, bolores, bactérias Gram-negativas e muitas Gram-positivas, porém, não afetando, entretanto, os termófilos, termodúricos, esporos e certas toxinas produzidas por algumas espécies de microrganismos. Sua importância está relacionada com a redução da carga microbiana total, bem como o aumento do tempo de conservação do leite e proteção à saúde pública. A pasteurização não dispensa, entretanto, a conservação do leite pasteurizado sob refrigeração (ABREU, 1999; CAMARGO et al., 1984; LANDGRAF, 2006).

Comercialmente, permitem-se dois processos de pasteurização do leite. Estes processos são conhecidos como pasteurização lenta (baixa temperatura/ longo tempo – LTLT) e rápida (alta temperatura/ curto tempo - HTST). No primeiro caso, o leite é submetido ao aquecimento a 62-63°C por trinta minutos, sob agitação mecânica lenta em aparelhagem própria. Este processo é intermitente e utilizado em pequenas instalações de processamento. O processo de pasteurização

rápida consiste no aquecimento do leite por 15- 20 segundos à 72-75°C, sendo o mais utilizado quando grandes volumes têm de ser beneficiados ou industrializados diariamente (BRASIL, 1952; PELCZAR; CHAN; REID, 1997). O produto pode ser armazenado por até 72 horas, desde que mantido e transportado em temperaturas inferiores a 10°C até chegar ao consumidor final (BRASIL, 1952).

Como a pasteurização não destrói a totalidade dos microrganismos, faz-se necessário resfriar o leite imediatamente após esse tratamento térmico, com a finalidade de criar um ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento (ABREU, 1999).

No Brasil, a legislação determina que o leite fluido seja pasteurizado, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluida, na faixa de temperatura de 72 a 75°C/15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termoregistrador e termoregulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002).

### **2.4.3 Ultrapasteurização**

Este tipo de tratamento térmico é aplicado nos leites denominados UAT ou longa vida.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT da Portaria nº 370 de 4 de setembro de 1997, entende-se por leite UAT (ultra alta temperatura), o leite homogeneizado submetido durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130°C a 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Este processo consegue eliminar todas as formas vegetativas de bactérias, porém algumas formas esporuladas podem, eventualmente, sobreviver. Sua principal vantagem é a capacidade de conservação prolongada (quatro meses) e não requer refrigeração, podendo ser armazenada em temperatura ambiente. Sanchez (2005) cita que existem dois tipos de equipamentos para este fim: aquecimento direto (o leite é aquecido em contato direto com o vapor) e aquecimento indireto (o leite é aquecido pela troca indireta de calor com vapor).

O sistema “UltraFresh” é uma tecnologia recente desenvolvida no Brasil para ser aplicada no leite longa vida, sendo uma nova opção de tecnologia de ultrapasteurização. Neste caso, o leite pré-aquecido é submetido a um tratamento físico e hermético de centrifugação, para a redução de bactérias e células somáticas, e térmico, de injeção direta de vapor. Na área de aquecimento de injeção de vapor, o leite é tratado termicamente a 138°C por alguns segundos, para eliminação dos microrganismos remanescentes. Em seguida, o leite é homogeneizado e resfriado à temperatura ambiente e depois envasado em embalagens assépticas (TETRA PAK, 2004).

A melhoria proporcionada pelo UltraFresh foi avaliada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Dos consumidores pesquisados, 94% deram preferência ao leite submetido ao novo processo. Outra pesquisa realizada com provadores especializados, revelou que 70% deles identificaram diferenças entre o produto que passou pelo UltraFresh e o que foi processado no sistema tradicional. Este resultado deve-se ao fato deste sistema utilizar uma temperatura menor, possibilitando que o produto atinja um nível de lactulose até 25% inferior ao obtido nos processos convencionais, conferindo um produto mais saboroso, cremoso e consistente (TETRA PAK, 2004).

#### **2.4.4 Esterilização**

As condições do processo de pasteurização embora efetivamente eliminem a totalidade dos microrganismos potencialmente patogênicos, não são suficientes para bactérias termorresistentes, especialmente as formadoras de esporos. Isso é conseguido através da esterilização (ABREU, 1999). Em alimentos, emprega-se o termo “esterilização comercial” para indicar que nenhum microrganismo viável pode ser detectado pelos métodos usuais de semeadura ou ainda que o número de sobreviventes seja tão baixo que nessas condições de envasamento e armazenamento é insignificante (LANDGRAF, 2006).

O leite esterilizado é pré-aquecido a 70°C em fluxo contínuo, embalado e em seguida esterilizado na própria embalagem à temperatura de 109 a 120°C, de 20 a 40 minutos, sofrendo resfriamento numa temperatura de 20 a 35°C (ABLV, 2008a). Este processo elimina todas as formas de microrganismos, inclusive esporos. Jullien et al. (2003) cita processos entre 109°C a 115° por 20 a 40 minutos necessários para completa inativação enzimática (exceto para lipases e

proteases termorresistentes advindas da contaminação por *Pseudomonas*) e microbiológica (exceto esporos termoresistentes como de *B. stearothermophilus*).

Há também o processo de esterilização pós-envase, onde a faixa de temperatura permanece à 110 a 115°C durante 10 a 20 minutos, na qual o produto recebe o tratamento térmico após ser acondicionado em sua embalagem final (FOX, McSEENEY, 1998).

No Brasil não há uma legislação específica para leite esterilizado.

## **2.5 Classificação do leite**

### **2.5.1 Leite cru**

É o leite sem tratamento térmico, produzido nas propriedades rurais do território nacional e destinado à obtenção de leite pasteurizado para consumo humano direto ou para transformação em derivados lácteos em todos os estabelecimentos de laticínios submetidos a inspeção sanitária oficial. O leite cru refrigerado é mantido no máximo à 7°C na propriedade rural e/ou tanque comunitário e à 10°C no estabelecimento processador. É transportado em carro-tanque isotérmico da propriedade rural para um Posto de Refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado (BRASIL, 2002).

O leite cru refrigerado tem como requisito de matéria gorda o teor original com o mínimo de 3,0g/100g, sendo proibida a realização de padronização ou desnate na propriedade rural (BRASIL, 2002).

### **2.5.2 Leite Pasteurizado tipo A**

O estabelecimento destinado à produção, refrigeração, pasteurização e envase de leite pasteurizado tipo A para o consumo humano denomina-se granja leiteira (BRASIL, 1952).

De acordo com o teor de gordura, este tipo de leite pode ser classificado em (BRASIL, 2002):

- Leite Pasteurizado tipo A integral (teor original);
- Leite Pasteurizado tipo A padronizado (3,0g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo A semidesnatado (0,6 – 2,9g/100g);

- Leite Pasteurizado tipo A desnatado (máximo de 0,5g/100g).

Pode estar acondicionado em sacos plásticos ou garrafas de 1 litro, onde a cor predominante da embalagem é a azul.

### **2.5.3 Leite Pasteurizado tipo B**

O estabelecimento destinado à produção e refrigeração de leite pasteurizado tipo B para o consumo humano denomina-se estábulo leiteiro (BRASIL, 1952). O produto pode permanecer na propriedade por um período máximo de 48 horas à temperatura igual ou inferior à 4°C, a qual deve ser atingida no máximo até três horas após o término da ordenha. Em seguida, é transportado para o estabelecimento industrial, para ser processado, onde deve apresentar, no momento do seu recebimento, temperatura igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 2002).

De acordo com o teor de gordura, este tipo de leite pode ser classificado em (BRASIL, 2002):

- Leite Cru Refrigerado tipo B (mínimo 3,0g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo B integral (teor original);
- Leite Pasteurizado tipo B padronizado (3,0g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo B semidesnatado (0,6 – 2,9g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo B desnatado (máximo de 0,5g/100g).

É acondicionado em sacos plásticos de 1 litro, onde a cor predominante da embalagem é verde.

### **2.5.4 Leite Pasteurizado tipo C**

O estabelecimento destinado à produção de leite pasteurizado tipo C para o consumo humano denomina-se fazenda leiteira (BRASIL, 1952). Este produto não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico na propriedade, sendo transportado em vasilhame adequado e individual de capacidade até 50 litros e entregue em estabelecimento industrial adequado ou Posto de Refrigeração de leite até as 10:00 h do dia de sua obtenção, em temperatura ambiente. É, então, refrigerado e mantido em temperatura igual ou inferior a 4°C por no máximo 24 h, sendo remetido, posteriormente, ao estabelecimento beneficiador. Dentro de um período de no máximo



12 horas, o leite é transportado para outra indústria, visando processamento final, onde deve apresentar, no momento do seu recebimento, temperatura igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 2002).

De acordo com o teor de gordura, este tipo de leite pode ser classificado em (BRASIL, 2002):

- Leite Cru tipo C (mínimo 3,0g/100g);
- Leite Cru Refrigerado tipo C (mínimo 3,0g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo C integral (teor original);
- Leite Pasteurizado tipo C padronizado (3,0g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo C semidesnatado (0,6 – 2,9g/100g);
- Leite Pasteurizado tipo C desnatado (máximo 0,5g/100g).

É acondicionado em sacos plásticos de 1 litro, onde a cor predominante da embalagem é cinza.

### **2.5.5 Leite UAT**

O que se denomina leite longa vida é o leite ultrapasteurizado e não o leite esterilizado, como muitas vezes é confundido. A denominação correta do processamento, no Brasil, é o tratamento UHT-Ultra High Temperature, que traduzido seria UAT - Ultra Alta Temperatura. Pode ser vendido com denominação: leite UHT (UAT) integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado ou desnatado de acordo com a classificação. Além de poder ser acrescentadas as expressões longa vida e/ou homogeneizado (BRASIL, 1997).

É acondicionado em embalagens cartonadas (Tetra Brik) composta de seis camadas de materiais. As duas primeiras camadas mais internas são de polietileno, um plástico inerte, que evita o contato do alimento com as demais camadas da embalagem. A terceira camada é de alumínio, cuja função é evitar a passagem de oxigênio, luz e microrganismos. Após esta, segue mais uma camada de polietileno que faz a adesão da camada de alumínio com a quinta camada, de papel. A camada de papel é quem confere a resistência à embalagem, além das características gráficas; esta é seguida finalmente pela última camada, também de polietileno (ABLV, 2008a).

ABLV (2008b) cita que existem hoje no mercado vários tipos de Leite Longa Vida. As diferenças entre eles podem ser:

- quanto ao teor de gordura:

- Integral (mínimo de 3,0g/100g);
- Semi-desnatado ou parcialmente desnatado (0,6 - 2,9g/100g);
- Desnatado (máximo de 0,5g/100g).

- quanto aos ingredientes adicionados ao leite:

- Leites com vitaminas;
- Leite com Ferro;
- Leite com cálcio;
- Leite com ômega;
- Leite com baixo teor de lactose;
- Leite com fibras;
- Leite Homogeneizado.

### **2.5.6 Leite Esterilizado**

O leite esterilizado pode ser classificado em integral ou desnatado. No Brasil, a venda deste tipo de leite não tem expressão comercial (ABLV, 2008b).

## **2.6 Legislação**

A necessidade de transformação do setor frente à abertura comercial deu início a uma série de ações que culminaram, em 2002, com a publicação da Instrução Normativa Nº 51 (publicada no Diário Oficial da União em 20/09/2002, seção 1, páginas 13 a 22), do MAPA, aprovando os novos Regulamentos Técnicos para a Produção, Identidade e Qualidade dos leites tipos A, B e C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado, bem como o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002).

As principais ações que viabilizaram a publicação da Instrução Normativa Nº 51, em setembro de 2002 foram: a elaboração do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) por representantes do MAPA, EMBRAPA e de universidades brasileiras, em 1997; a

criação do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL), em 1998; a publicação da portaria Nº 56 do MAPA, para consulta pública, apresentando os Regulamentos Técnicos para a Produção, Identidade e Qualidade do leite, em dezembro de 1999; a publicação da Instrução Normativa Nº 37, que instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), em agosto de 2002; a publicação da Instrução Normativa Nº 48 do MAPA, apresentando os Regulamentos Técnicos para equipamentos de ordenha, em agosto de 2002; e finalmente, a publicação da Instrução Normativa Nº 53 do MAPA regulamentando a fabricação, o funcionamento e a eficiência de tanques refrigeradores de leite a granel, em 2002.

No que diz respeito aos padrões que refletem a qualidade higiênica do leite cru, ou seja, as contagens padrão em placas (CPP), também conhecida como contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios (CT), e a contagem de células somáticas (CCS), a Instrução Normativa Nº 51 estabeleceu padrões que prevêm a melhoria progressiva da qualidade. Para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste as CPP devem ser de no máximo 1.000.000 UFC/mL (de 01/07/2005 a 01/07/2008), de 750.000 UFC/mL (de 01/07/2008 a 01/07/2011) e de 100.000 UFC/mL a partir de 01/07/2011. Para os mesmos períodos a CCS máxima permitida é de 1.000.000, de 750.000 e 400.000 células/mL, respectivamente. Além disso, esta instrução estabelece a obrigatoriedade do resfriamento do produto nas propriedades produtoras. O padrão de temperaturas máximo a que o leite deve ser mantido na propriedade rural é de 7°C em tanques individuais e de 10°C em tanques comunitários (FERREIRA, 2007; SANVIDO, 2007).

## **2.7 Características gerais do *Bacillus cereus***

O *Bacillus cereus* foi originalmente isolado e descrito por Frankland e Frankland em 1887, segundo International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF (1996) e atualmente está incluído na família *Bacillaceae*. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* compreendem um grande número de espécies, estando relatadas, até o momento, 48 espécies diferentes (FRANCO, LANDGRAF, 2006).

A designação “*cereus*” - que significa em latim, ceroso – descreve bem a aparência de suas colônias em meios de ágar (CLAUS; BERKELEY, 1986).

*Bacillus* spp. são os maiores responsáveis pela deterioração de alimentos, como leite e seus derivados. Dentre as espécies relevantes é importante citar *Bacillus cereus*, pois além de ser

um organismo patogênico para o consumidor, causando intoxicações ou toxinfecções, sua incidência em leite tem sido reportada desde 1916, já que é um contaminante comum do leite cru (SANCHEZ, 2005).

Trata-se de um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, mesófilo, com flagelos peritríquios, em forma de bastonete longo e produtor de esporos que podem ser centrais ou subterminais. Cepas de *B. cereus* são catalase positiva e oxidase variável (ANDERSSON; GRANUM; RONNER, 1998; CLAUS; BERKELEY, 1986; FRANCO; LANDGRAF, 2006; HAJDENWURCEL, 2004). Suas células vegetativas possuem um comprimento de 1,0 – 1,2 µm até 3,0 a 5,0 µm e 1,0 µm de largura (CLAUS; BERKELEY, 1986).

Silva Júnior (2005a) considera o valor de pH 4,35 como o mínimo permitindo o crescimento, por outro lado não se desenvolve em meio com pH superior a 9,3. De acordo com ICMSF (1996), o pH mínimo para o crescimento do *B. cereus* é de 5,0 e o máximo de 8,8, sendo que a faixa ótima encontra-se entre 6,0-7,0.

O efeito da atividade de água ( $a_w$ ) não está plenamente documentado, devido às diferenças observadas entre as cepas e à diversidade de substâncias químicas adicionadas aos substratos, tais como cloreto de sódio, ácido ascórbico, sorbato de potássio entre outros; mesmo assim, tem-se a  $a_w$  mínima como 0,93 (GERMANO; GERMANO, 2003; ICMSF, 1996). No entanto, conforme observações de Sinigaglia et al.(2002), estirpes típicas de *B. cereus* crescem em alimentos com  $a_w$  igual ou superior a 0,95.

Quanto à temperatura, *B. cereus* multiplica-se entre 10°C e 48°C, apresentando um ótimo de temperatura entre 28°C e 35°C (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Silva Júnior (2005a), assim como Germano e Germano (2003) e ICMSF (1996) citam que este patógeno de origem alimentar têm como temperaturas limitantes de crescimento 5 e 50°C, sendo ótima a temperatura de 30°C. Mäntynen e Lindström (1998), relatam que cepas de *B. cereus* podem crescer entre 4 e 37°C, e cepas psicrótróficas deste mesmo microrganismo produzem a enterotoxina, tanto aerobicamente como anaerobicamente.

Os esporos de *B. cereus* germinam entre 5°C e 50°C (JOHNSON, 1984; SILVA JÚNIOR, 2005), e o tempo de geração varia entre 26 e 57 minutos (JOHNSON, 1984).

A influência da temperatura na germinação dos esporos e subsequente crescimento do *B. cereus* foi estudada por diversos autores. Em caldo tripticase-soja, Johnson, Nelson e Busta

(1983) observaram que o crescimento ocorria entre 15°C e 50°C, sendo a temperatura ótima na faixa de 35 a 40°C e a germinação ocorrendo entre 5 e 50°C, porém sendo mais rápida a 30°C.

Em relação às suas características bioquímicas, cepas de *B. cereus* são capazes de utilizar vários carboidratos: glicose, frutose, trealose, sacarose, salicina, manose, m-inositol e lactose (FRANCO; LANDGRAF, 2006), embora alguns açúcares não sejam utilizados por todos os membros da espécie. São capazes de hidrolisar amido, caseína e gelatina (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Segundo Johnson, Nelson e Busta (1983), o *B. cereus* não possui a capacidade de fermentar manitol e tem um sistema fosfolipase (lecitinase) muito ativo, sendo estas características, freqüentemente, utilizadas em meios seletivos e diferenciais para o isolamento do microrganismo.

A produção de lecitinase por *B. cereus* foi observada por Ivers e Potter (1977), que constataram que filtrados de cultura de *B. cereus* possuíam atividades hemolítica, dermonecrótica e letal para camundongos. Esta enzima é formada e secretada pelas células no final da fase exponencial de crescimento (COLLADO et al., 2003). Durante esta fase, o *B. cereus* elabora produtos extracelulares, como proteases,  $\beta$ -lactamases, antibióticos peptídicos, fosfolipases, hemolisinas e toxina letal para camundongo (GHELARDI et al.; 2002).

Diversos métodos têm sido descritos para detectar *B. cereus*. A maioria dos procedimentos para o isolamento e enumeração do *B. cereus* é feita pelo método do plaqueamento direto, que envolve o espalhamento de superfície em meio de cultura constituído por ágar, manitol, gema de ovo e polimixina (MYP) (MANTYNEN; LINDSTROM, 1998; PENG et al., 2001; SILVA et al, 2007). Este meio de cultura seletivo e diferencial combina a polimixina, como agente seletivo, inibindo a flora acompanhante e a gema de ovo e o manitol, como agentes diferenciais. A produção de colônias com uma forte reação de gema de ovo (atividade de lecitinase), caracterizada por um grande halo de precipitação, é típica dos bacilos do grupo *B. cereus*. A não fermentação do manitol confere ao halo em volta da colônia uma coloração rósea leitosa (FDA, 2006; HAJDENWURCEL, 2004; SILVA et al., 2007).

Geralmente todas as cepas de *B. cereus* produzem a enzima penicilinase, o que torna possível o crescimento deste microrganismo em meios contendo 10 Unidades Internacionais de Penicilina, sendo esta propriedade utilizada na diferenciação entre *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis* (SEENAPA; KIMPTON, 1981).

No que diz respeito ao efeito de conservantes e antibióticos na inibição de *B. cereus*, Banerjee e Sarkar (2004) constataram os seguintes resultados: inibição por ácido sórbico 0,20%, 0,40% de sorbato de potássio e antibióticos como aureomicina, terramicina, dihidroxiestreptomicina, oxitetraciclina, cloranfenicol e gentamicina; uma ligeira inibição foi observada com neomicina e ampicilina.

É conhecido que esporos de *B. cereus* podem sobreviver a processos de pasteurização, pois sua resistência térmica é de 5,5 min a 100°C, mas sua sobrevivência a 145°C é muito rara. Existe apenas um relato na literatura de Franklin (1970) que cita o isolamento de uma cepa ultra resistente de *B. cereus* sobrevivendo em creme de leite processado a 140°C por 2 s. Este fato foi considerado surpreendente já que *B. cereus* genericamente apresenta baixa resistência térmica, fato que o exclui do grupo dos microrganismos com ultra resistência térmica (SANCHEZ, 2005)

Há a possibilidade de germinação e crescimento vegetativo pós-pasteurização, já que processos térmicos de pasteurização podem permitir a sobrevivência dos esporos com conseqüente crescimento pós-germinativo (SANCHEZ, 2005).

Dusmalisile, Witthuhn e Britz (2005) compararam a eficiência de quatro condições de tratamento térmico do leite (63°C/até 30 minutos; 72°C/até 10 minutos e 90°C/até 10 minutos seguido de envase; pasteurização pós-envase a 80°C/30 minutos) sobre a destruição de classes específicas de microrganismos (*Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Candida lipolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis*). Os resultados demonstraram que, excetuando-se o *Bacillus cereus*, todos os microrganismos foram destruídos pelos quatro tratamentos térmicos realizados antes do envase, entretanto, no tratamento térmico pós-envase os microrganismos *B. cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* permaneceram viáveis, sugerindo que este método de pasteurização não possui eficácia comparável aos demais métodos testados. Os resultados também demonstraram que cargas contaminantes iniciais maiores demoram mais tempo para serem destruídas em qualquer condição avaliada, indicando ser esta uma variável importante no processo de destruição de microrganismos.

Hanson, Wendorff e Houck (2005) avaliaram os efeitos de diferentes combinações de tempo e temperatura sobre a população microbiana do leite fluido. Amostras de leite foram

submetidas a diferentes tratamentos térmicos (63°C/30min, 72°C/15seg, 76°C/15seg, e 82°C/30min) e posteriormente armazenadas por 14 dias a 6 ou a 10°C. Os autores relataram que as amostras submetidas a 72 e 76°C apresentaram maior contaminação por *Bacillus ssp* quando comparadas as amostras submetidas à 63°C/30min. As amostras submetidas a 82°C/30min não apresentaram *Bacillus spp.* após a pasteurização, porém estes microrganismos estavam presentes após o período de estocagem, indicando que, mesmos após uma injúria severa, 14 dias são o suficiente para a recuperação destes microrganismos.

## **2.8 Resistência térmica do *Bacillus cereus***

A determinação da resistência térmica de células bacterianas é normalmente obtida pela sua taxa de morte durante o aquecimento. O procedimento é realizado através da exposição das respectivas células a ação de tempos programados de aquecimento, sob temperaturas fixas, com subsequente contagem dos organismos sobreviventes. Para um valor constante de D, o tempo para uma dada probabilidade de inativação é diretamente proporcional ao número inicial de microrganismos presentes. Enquanto o valor D é susceptível a variações das condições do ensaio, o valor z é razoavelmente mais constante para um determinado microrganismo numa faixa de condições de teste (WELT et al., 1997).

A resistência térmica microbiana é afetada por fatores como a temperatura de esporulação (BEAMAN; GERHARDT, 1986), o pH e a composição do meio de esporulação (Mazas et al., 1995) e o meio de aquecimento (SALA et al., 1994).

Parry e Gilbert (1980) reportaram valores D<sub>95°C</sub> entre 2,5 e 36,2 min, em tampão fosfato, para cepas de *B. cereus* isoladas de diversos alimentos que provocaram intoxicação emélica nos consumidores. Neste caso, ampla faixa de variação no valor D foi verificada atestando como a resistência térmica do microrganismo pode variar em função do alimento que contamina. Sob este mesmo enfoque, Johnson et al. (1982) encontraram valores D<sub>85°C</sub> entre 32,1 e 106 min com z variando entre 6,8 e 13,9°C.

Wang (1994) compilou os parâmetros cinéticos de resistência térmica dos principais organismos esporulados. Dentre eles reportou os valores D<sub>121°C</sub> de 3,8min e z de 35,9°C para *B. cereus* em leite fluido sem especificar a metodologia aplicada ou o sistema de processamento. Mazas et al. (1995) trabalharam com resistência térmica de esporos de *B. cereus* em resistômetro

e concluíram que o meio de esporulação influencia os valores D, mas não o valor z. Assim, para cada linhagem foi verificado um melhor meio de esporulação demonstrando a variabilidade e especificidade no bioquimismo de cada uma.

## **2.9 Patogenia do *Bacillus cereus***

Esporos e células vegetativas de *B. cereus* são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em solo, sedimentos, poeira, água, plantas, pêlos dos animais e em muitos tipos de alimentos, notadamente cereais e seus derivados, leite e laticínios, carnes e derivados, ervas, especiarias e outros produtos desidratados (BENNETT; BELAY, 2001; GUVEN; MUTLU; AVCI, 2006; JOHNSON, 1984; SVENSSON et al., 2006). Mäntynen e Lindström (1998) relatam que aproximadamente 50% dos condimentos, produtos lácteos e cárneos, contêm *B. cereus*, porém alguns produtos como cogumelos são livres deste microrganismo. Em circunstâncias normais, é comumente encontrado em baixas contagens nos alimentos ( $<10^2$  UFC/ g), as quais são consideradas aceitáveis (SOTO et al., 2005). Nestas quantidades, essa bactéria pode ser considerada inócua, já que se estima que a população mínima necessária para causar enfermidade é maior que  $10^5$  UFC/ g ou mL (ICMSF, 1996). Como consequência dessa distribuição ubíqua e em razão da sua capacidade de esporulação rápida, sobrevive facilmente nos ambientes e na passagem por intestinos de animais (NOTERMANS et al., 1997; SVENSSON et al., 2006).

*Bacillus cereus* por ser encontrado em um grande número de alimentos é uma importante causa de intoxicação gastrointestinal. A característica de formação de esporo assegura a sobrevivência na maioria dos processamentos, e a refrigeração inadequada de pratos são veículos comuns para a germinação dos esporos e proliferação do microrganismo (SALÁN, 2005).

O *B. cereus* está frequentemente envolvido em surtos alimentares e, é conseqüentemente, isolado em humanos. De acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), de 1993 a 1997, foram relatados 14 surtos e 691 casos de doenças provocados pelo *B. cereus* nos Estados Unidos (LANCIOTTI et al., 2001).

A presença de *B. cereus*, além de deteriorar alimentos, pode também ser indicativo da presença de suas toxinas (MÄNTYNEEN; LINDSTRÖM, 1998).

A capacidade do *B. cereus* em sintetizar e secretar certas toxinas é um dos mais importantes aspectos bioquímicos deste microrganismo. Sete toxinas diferentes produzidas por *B.*



*cereus* foram identificadas. Seis delas são produzidas durante o crescimento vegetativo no intestino e secretadas pelas células: duas hemolisinas, três fosfolipases-C e uma enterotoxina, esta última responsável pelo quadro de diarreia (GRANUM, 1994). A sétima toxina, a emética, é produzida durante o crescimento bacteriano no alimento a partir de componentes do meio (GRANUM, 1994).

*Bacillus cereus* pode produzir dois tipos de toxinas, aparentemente diferentes, quando contamina alimentos em concentrações maiores do que  $10^6$  UFC/g (FDA, 2006): o tipo emético (intoxicação) e o diarréico (toxinfecção).

A possibilidade de produção de toxina emética e diarréica por uma mesma cepa bacteriana tem sido considerada. A suspeita baseia-se na ocorrência, concomitante, de quadros clínicos característicos de ambas as síndromes em alguns indivíduos acometidos por doença alimentar causada por *B. cereus* (SOARES, 2004).

Recentemente, Pirhonen et al. (2005) estudaram isolados do microrganismo provenientes de um alimento implicado em enfermidade severa, quando as vítimas (duas pessoas) apresentaram vômito e diarreia concomitantes. A partir dos resultados obtidos em análises laboratoriais, os autores identificaram no alimento tanto cepas produtoras de toxina emética como outras, produtoras de toxina diarréica, revelando a existência de diversidade bioquímica e de produção de toxinas por *B. cereus*, em um mesmo alimento. Estes resultados corroboram o trabalho realizado por Agata, Ohta e Mori (1996), que mostraram que os sintomas eméticos são causados por uma classe específica de *B. cereus*.

### **2.9.1 Síndrome diarréica**

O *B. cereus* produz toxinas diarréicas durante o crescimento no intestino delgado humano, portanto, é necessária a presença de um número elevado de células no alimento e a ingestão de células viáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A toxina diarréica foi detectada pela primeira vez em 1950 na Noruega, quando foi relatado um surto envolvendo 600 pessoas. Desde as primeiras evidências de suas propriedades enteropatogênicas, *B. cereus* vêm sendo considerado um importante agente etiológico de doença de origem alimentar (GRANUM, 1994).

Uma ampla variedade de alimentos, incluindo carnes, leites, vegetais e peixes, foi associada ao tipo diarréico de intoxicação (GERMANO; GERMANO, 2003). Cerca da metade das cepas de *B. cereus* produzem a enterotoxina diarréica (MÄNTYNEN; LINDSTRÖM, 1998).

Os sintomas provocados pela enterotoxina são muito semelhantes com aqueles causados pelo *Clostridium perfringens*. A forma diarréica caracteriza-se por um quadro de diarréia intensa, tenesmos retais e cólicas abdominais entre 8 e 16 horas, após o consumo de alimento contaminado por grande número de *B. cereus*, freqüentemente, mais de  $10^5$  células/g ou mL. Raramente ocorrem náuseas e vômitos. A duração da doença é de 12 a 24 horas (AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002; BENNETT; BELAY, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2006; GRANUM, 1997).

Vários termos têm sido empregados para caracterizar a toxina diarréica devido às manifestações clínicas provocadas por ela: enterotoxina diarréica, agente diarréico, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, fator LRIL (*ligated rabbit ileal loop*) (FRANCO; LANDGRAF, 2006; GRANUM, 1997).

A toxina diarréica é uma proteína de alto peso molecular (38 Kda a 46 Kda), produzida entre 18° a 43°C e é inativada pelo calor a 56°C por 30 minutos (FORSYTHE, 2002; ICMSF, 1996) e estável a 45°C por 30 minutos (JOHNSON, 1984).

Algumas linhagens de *B. cereus* produzem a toxina quando submetidas a temperaturas de 4°C, outras entre 6 e 21°C. Se o alimento (milho, amido, batata, arroz, pudim...), é ingerido quando a célula vegetativa se lisa no intestino, a toxina é liberada. Neste caso, os sintomas da intoxicação são dores abdominais constantes e diarréia fraca após 4 a 16 horas da ingestão, permanecendo por até 24 horas, mas sem febre (JAY, 2000).

É produzida durante a fase de crescimento exponencial, onde a toxicidade é perdida depois que é completada esta fase, na faixa de pH entre 6,0 e 8,5, com produção ótima entre 7,0 e 7,5, e é sensível a tripsina e a pronase (JOHNSON, 1984).

A dose infectante para ocasionar a síndrome diarréica, segundo Granum (1997), está estimada entre  $10^4$  a  $10^5$  células viáveis. Entretanto, a maioria dos surtos e casos de intoxicação diarréica por *B. cereus* é relatada em associação com alimentos que apresentam contaminação entre  $10^5$  e  $10^8$  UFC/g ou mL. Intoxicações causadas por baixos números ( $10^3$  a  $10^5$ /g) são raramente encontradas (BECKER et al., 1994). Giannella e Brasile (1979) citados por Becker et al. (1994) relataram um caso de intoxicação, onde o alimento envolvido foi pão com peru

contendo  $1,2 \times 10^3$  UFC/g. Uma contaminação contendo  $6,0 \times 10^4$  UFC/g envolvendo frango foi descrita por Becker et al. (1994). Particularmente, crianças e idosos são pessoas comumente envolvidas nestes tipos de surtos. Os registros de surtos são associados, em sua maioria, a alimentos contaminados com populações maiores do que  $10^6$  UFC/g ou mL e não há menções quanto à quantidade de alimento cuja ingestão causaria os sintomas de diarreia (EHLING-SCHULTZ; FRICKER; SCHERER, 2004).

A toxina diarreica é uma enterotoxina de natureza protéica, termolábil que age estimulando o sistema adenilciclase da mucosa intestinal provocando acúmulo de sais e eletrólitos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), e interferindo na absorção de glicose e de aminoácidos (FRANCO; LANDGRAF, 2006; MÄNTYNEN; LINDSTRÖM, 1998).

A toxina é também fortemente necrótica. Estudos relativos a sua estrutura indicam que esta toxina é formada por três unidades protéicas, antigênicas, de peso molecular de 43000 daltons, 39000 daltons e 38000 daltons. A enterotoxina é produzida durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção da toxina diarreica, sendo mais usado o da alça ligada de coelho, em que filtrados de cultura são injetados no intestino, observando-se o acúmulo de fluidos. O teste de permeabilidade vascular também é utilizado na identificação da toxina, sendo efetivado pela injeção subcutânea de filtrado de cultura na pele de cobaias, seguido da aplicação de corante “Evans Blue”. O aparecimento de manchas cinzas ou azuis na pele da cobaia indica que a reação é positiva (JOHNSON; NELSON; BUSTA, 1983).

Atualmente, estão disponíveis dois kits comerciais para a detecção da toxina diarreica em alimentos ou cultura do microrganismo, baseados em métodos imunológicos ou imunoenzimáticos-ELISA.

O kit BCET-RPLA (Oxoid-TD 950) utiliza a técnica de aglutinação passiva reversa em látex e detecção de 1ng/mL (BEECHER; WONG, 1994).

O segundo kit é o *Bacillus* “Diarrhoeal Enterotoxin-Visual Immunoassay” (BDE-VIA) da Tecra™ (Bioenterprises Pty. Ltd. Roseville, NSW, Austrália), que utiliza o método de ELISA e foi desenvolvido para uso direto em amostras de alimentos, após simplificado o procedimento de extração e limite mínimo de detecção entre 2 a 5 ng/mL (BEECHER; WONG, 1994).

### 2.9.2 Síndrome emética

A síndrome emética é devida à produção pelo *B. cereus* de enterotoxinas termoestáveis no alimento, causando intoxicação alimentar típica (SILVA JÚNIOR, 2005a).

O tipo emético de intoxicação foi reconhecido pelo Public Health Laboratory Service, London, em 1972.

Os surtos do tipo emético são geralmente associados com produtos de arroz. No entanto, os outros alimentos ricos em amido, como batatas, massas e produtos de queijo, também foram implicados. As misturas para alimentos com molhos, pudins, sopas, massas folhadas e saladas são freqüentemente relacionadas a surtos alimentares (FRANCO; LANDGRAF, 2006; JAY, 2000).

Este tipo de gastroenterite é descrito como um quadro em que os sintomas predominantes são náuseas, vômitos e mal-estar geral, e em alguns casos diarreia com seis a 24 horas de duração. É caracterizada por um curto período de incubação de 1 a 6 horas, e duração quase sempre inferior a 24 horas (AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2006; GRANUM, 1994; SILVA JÚNIOR, 2005b; SVENSSON et al., 2006). Os sintomas da síndrome emética assemelham-se a intoxicação estafilocócica (*Staphylococcus aureus*) (EVANS, 2004).

Diversos incidentes foram relatados em países como Austrália, Canadá, Inglaterra e Holanda, envolvendo o consumo de arroz cozido preparado segundo a culinária chinesa. A predominância de episódios envolvendo restaurantes chineses foi atribuída à prática de deixar o arroz cozido no vapor à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, algumas horas ou de um dia para outro (GHELARDI et al.; 2002; GILMOUR; ROWE, 1990; JAY, 2000), e quando necessário é aquecido ou frito rapidamente, sendo o *B. cereus* isolado em números variáveis de  $10^3$  a  $10^9$  UFC/g de alimento (GHELARDI et al.; 2002). Os esporos de *B. cereus* podem sobreviver à fervura e à fritura se estas forem relativamente rápidas (PARRY; GILBERT, 1980).

Nestas condições, o aquecimento é insuficiente para destruir os esporos, que são comuns em cereais. Os esporos germinam e, devido à temperatura ambiente favorável, ocorre a multiplicação rápida das células vegetativas resultantes. A mistura do arroz preparado desta forma com outros ingredientes (carne, ovos, vegetais, frango), comum na comida oriental, agrava mais ainda o problema (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Durante a década de 70, as pesquisas se limitavam, quase que exclusivamente, a observações da produção da toxina emética em meios de arroz. Relatos posteriores permitiram concluir que essa produção não se fazia exclusivamente nesse alimento, ainda que fosse o predominante nos surtos (JOHNSON, 1984). É notório que, muitas vezes, o número de *B. cereus*, necessário a produção de toxina suficiente para induzir o vômito, resulta em deterioração perceptível das preparações de arroz, o que, provavelmente, leva ao seu descarte.

A temperatura entre 25°C e 30°C durante 18 horas é satisfatória para a produção da toxina emética em arroz. Já o crescimento vegetativo ocorre em temperaturas maiores, mas a produção de toxina é reduzida, segundo Gilmour e Rowe (1990).

A toxina emética difere bastante da toxina diarreica pela sua alta estabilidade em relação a temperatura, a enzimas proteolíticas e as variações de pH. A toxina emética é uma proteína pequena, provavelmente um peptídeo de peso molecular inferior a 10000 dáltons, estável na faixa de pH 2 a 11, e permanecendo inalterada a 126°C durante 90 minutos e a 4°C durante 02 meses, além de ser resistente à tripsina e pepsina (FRANCO; LANDGRAF, 2006; GILMOUR; ROWE, 1990; JOHNSON; NELSON; BUSTA, 1983; ICMSF, 1996;). Segundo Franco e Landgraf (2006), apresenta baixa ou nenhuma antigenicidade e sua produção ocorre na fase logarítmica final de crescimento, sendo liberada em grandes quantidades durante a lise celular. Alguns estudos sugerem que a produção desta toxina está relacionada com o processo de esporulação. A ação biológica da toxina ainda não é conhecida.

Na Tabela 1, pode-se observar as características da toxinfecção provocada por *Bacillus cereus*.

Tabela 1 - Características de toxinfecção por *Bacillus cereus*

	<b>Síndrome diarreica</b>	<b>Síndrome emética</b>
Período de incubação (h)	8 – 22	1 -16
Duração (h)	12 -24	12 – 24
Produção da toxina	No Intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada no alimento
Sintomas	Dores abdominais, diarreia aquosa e às vezes náuseas	Náuseas, vômitos e mal-estar
Alimentos responsáveis	Leite e derivados, carne, sopa, pudim, verdura, molho	Arroz cozido ou frito, massas

Fonte: adaptado de Granum (1997); Silva Júnior (2005b).

## 2.10 Medidas preventivas

Os alimentos, habitualmente, estão contaminados por *Bacillus cereus* devido a sua ampla distribuição no meio ambiente. Sua presença em pequenas quantidades (algumas centenas de células por grama) não constitui um problema, já que a ingestão dessas reduzidas populações não causará enfermidade (ICMSF, 1996).

A presença de um grande número de *Bacillus cereus* ( $>10^5$  organismos/g ou mL) em alimentos é indicativo do crescimento ativo e proliferação do microrganismo e é um perigo potencial à saúde (GERMANO; GERMANO, 2003). É durante a fase exponencial de multiplicação do microrganismo no alimento, que são produzidas as toxinas entérica e emética, além de fosfolipase e das hemolisinas (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Como o microrganismo se encontra por todo o meio ambiente, baixos números ocorrem comumente em alimentos. Por isso, o principal mecanismo de controle é a prevenção da germinação de esporos e a multiplicação em alimentos cozidos prontos para o consumo (GERMANO; GERMANO, 2003).

O controle do *Bacillus cereus* em alimentos fundamenta-se na prevenção de seu desenvolvimento, uma vez que é difícil, senão impossível, impedir-se por completo a sua presença nas matérias-primas. Nestas condições, é fundamental que, particularmente nos alimentos preparados e prontos para o consumo, a multiplicação intensa da bactéria seja inibida, quer pela refrigeração adequada ou pela manutenção dos alimentos em temperaturas acima de 55° C (GERMANO; GERMANO, 2003).

Nenhum produto que ofereça condições para a proliferação deste patógeno deverá ser mantido por períodos superiores a 2-3 horas em temperaturas na faixa de 15° a 60° C, que propiciam condições de desenvolvimento (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Os alimentos convenientemente cozidos, consumidos imediatamente após a cocção, são inócuos. A cocção à temperaturas de 100°C ou inferiores a esta permitirão a sobrevivência de alguns esporos.

A multiplicação celular durante o resfriamento inadequado de alimentos a base de cereais ou que contêm proteínas, é um tema importante. As condições que favorecem o crescimento de *B. cereus* nos alimentos incluem os procedimentos que ativam os esporos seguidos de um resfriamento lento e armazenamento de grandes quantidades de alimentos a temperaturas entre 10

e 50°C. Os alimentos que serão armazenados devem ser resfriados rapidamente até uma temperatura que impeça o crescimento de *B. cereus*. Os alimentos conservados no estado aquecido deverão ser mantidos a temperaturas superiores a 60°C (ICMSF, 1996).

As condições que favorecem o crescimento de *B. cereus*, nos alimentos a base de leite, incluem um procedimento que ative os esporos, por temperatura, pH, atividade de água e/ou outros fatores, induzindo a germinação e crescimento pós-germinativo, que ocorrerá se houver um esfriamento inadequado e/ou lento, bem como, estocagem de grandes volumes entre 10 e 50°C. Assim, para evitar a germinação de *B. cereus* seria interessante manter o produto em condições de temperatura abaixo de 10°C, em combinação com pH e atividade de água. É importante acrescentar que a toxina emética não é destruída pelo efeito térmico da cocção (ICMSF, 1996).

As condições higiênico-sanitárias adotadas durante a obtenção e transporte da matéria-prima são fatores de fundamental importância para a qualidade do leite e seus derivados. O emprego de uma matéria-prima de boa qualidade e a correta realização dos procedimentos industriais é capaz de garantir a conservação do produto por um período adequado, dependendo do tipo de leite.

Os produtos “in natura” devem ser constantemente monitorados para que se mantenha um padrão de boa qualidade nos alimentos processados. A capacidade dos esporos do *B. cereus* sobreviverem por longo período em alimentos e a sua resistência aos tratamentos térmicos utilizados na pasteurização ajudam a explicar a grande variedade de alimentos contaminados com este microrganismo, acarretando riscos de toxinfecções para o consumidor (COSTA; OLIVEIRA; BORGES, 2004). Boas ferramentas de diagnóstico são neste caso exigidas para assegurar a qualidade higiênica dos alimentos susceptíveis (MANTYNEN; LINDSTROM, 1998).

Para evitar linhagens psicotróficas de *B. cereus* que apresentem resistência térmica, Collins (1981) sugere manter o número destes organismos em menor concentração possível, selecionar agentes sanitizantes eficazes e suas concentrações para as superfícies em contato com o leite (50-110 ppm de clorados ou 25 ppm de iodoforados), monitorar os procedimentos de limpeza CIP (análise da água de enxágüe e remoção de biofilmes estacionários) e promover um rápido e eficiente resfriamento do leite cru, a temperaturas iguais ou inferiores a 4,4°C.

Segundo Doyle (1988), esporos de *B. cereus* em alimentos seriam destruídos pelo processamento de esterilização em autoclave (sob pressão), aplicação de tratamento térmico

equivalente ou irradiação. No entanto, alguns destes processos poderiam inviabilizar a comercialização dos produtos por alterações sensoriais; nestes casos, processos complementares seriam incluídos.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP, em Piracicaba-SP.

#### **3.1 Matéria-prima**

Foram coletadas em diversos estabelecimentos do comércio varejista da região de Piracicaba, Estado de São Paulo, 75 amostras de leite, incluindo-se leite “in natura” (cru), pasteurizado (A, B e C) e longa-vida (UAT – ultra-alta temperatura) para pesquisa do *Bacillus cereus*. As coletas foram realizadas semanalmente no período de janeiro a junho de 2007.

#### **3.2 Preparo das amostras**

Foram analisadas 10 amostras de leite cru, 10 amostras de leite pasteurizado tipo A, 25 amostras de leite pasteurizado tipo B, 25 amostras de leite pasteurizado tipo C e 5 amostras de leite UAT.

As amostras de leite cru foram coletadas diretamente da torneira do tanque de resfriamento em erlenmeyers de 1 litro previamente esterilizados em estufa 160°C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram transportadas armazenadas em caixa de isopor contendo pedras de gelo ao Laboratório de Microbiologia, sendo analisadas logo após a sua chegada.

As amostras de leite pasteurizado foram coletadas em suas embalagens plásticas originais de 1 litro e acondicionadas em caixas de isopor contendo pedras de gelo. As amostras de leite UAT foram transportadas ao laboratório em suas embalagens originais Tetra Brik® à temperatura ambiente. Ao chegarem ao laboratório foram homogeneizadas na própria embalagem para que os microrganismos se distribuíssem uniformemente.

No referido laboratório, após a homogeneização e cuidadosa limpeza da área externa das embalagens com etanol 70% para remoção dos contaminantes presentes, processou-se a abertura das mesmas com tesoura flambada e imediata transferência para béquers de 1 litro esterilizados, a fim de facilitar o preparo das diluições e o procedimento de fervura.

### **3.3 Tratamento das amostras**

Para todas as amostras foi realizada análise microbiológica para detecção do *Bacillus cereus*. Após a retirada da alíquota necessária para tal análise, procedeu-se a fervura do restante do leite de cada amostra. A fervura foi realizada em bico de Bunsen, onde a chama foi desligada após a subida do leite no interior do béquer. Aliás, procurou-se realizar este procedimento por ser semelhante ao executado pelos consumidores deste alimento em suas residências.

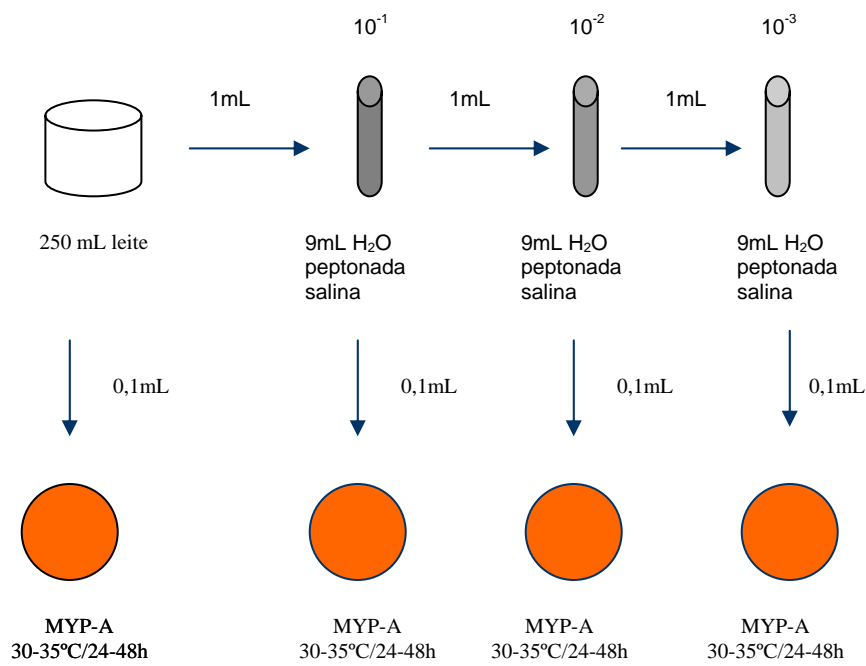
Após a fervura, as amostras foram novamente analisadas a procura do *B. cereus* nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Além da detecção do microrganismo nestes tempos, também foi aferida a temperatura e o pH das amostras. O pH foi determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente na amostra (Digimed).

### **3.4 Metodologia**

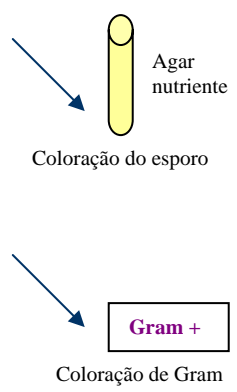
#### **3.4.1 Contagem e caracterização de *Bacillus cereus* diretamente em amostras de leite**

##### **3.4.1.1 Plaqueamento direto: contagem em placa (teste presuntivo)**

Para a contagem presuntiva de *Bacillus cereus* utilizou-se o método de contagem direta em placas, segundo SILVA et al. (2007). A partir de cada amostra de leite foram preparadas as diluições seriadas, no mínimo até  $10^{-3}$ . Para a diluição  $10^{-1}$ , pipetou-se 1 mL do béquer contendo 250 mL de cada amostra de leite e adicionando-o 9 mL de água salina peptonada esterilizada. Para o preparo das diluições seguintes, foi pipetado sempre 1 mL e transferido para 9 mL do referido diluente. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio Agar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina (MYP-A) através de alça de Drigalsky, espalhando-se 0,1mL do leite e de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 30°C/ 24-48 horas para a contagem das colônias típicas (colônias esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo róseo de precipitação, devido à reação com a gema de ovo), as quais foram submetidas às provas bioquímicas para a caracterização de *B. cereus* (Figura 2).



Placa com 04 colônias típicas de *B. cereus*



Fonte: Hajdenwurcel, 2004



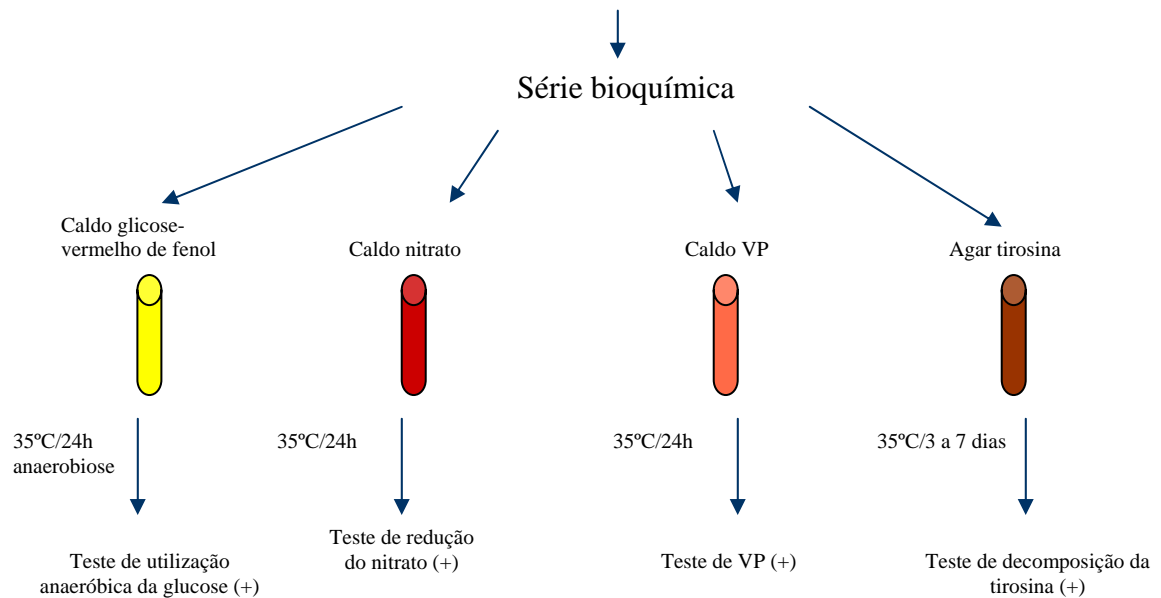


Figura 2 – Esquema de análise para contagem de *B. cereus* em leite pelo método de plaqueamento direto e caracterização bioquímica da bactéria (adaptado de SILVA et al., 2007)

### 3.4.1.2 Caracterização de *B. cereus*

A partir de placas preparadas com MYP-A as quais continham colônias típicas, foi selecionado um número representativo (pelo menos 05) e inoculadas em tubos de Ágar Nutriente (NA) inclinado, seguido de incubação a 30°C por 24 horas.

Posteriormente, estas colônias foram submetidas aos seguintes exames morfológicos e bioquímicos, visando confirmar a presença de *Bacillus cereus*:

- **Coloração de Gram** (bastonete Gram +);
- **Coloração de esporo** (presença de esporo central ou subterminal);
- **Teste de utilização anaeróbia da glicose:** inoculação da cultura no meio caldo vermelho de fenol 1% glicose previamente dasaerado. Foi adicionado óleo mineral ou vaselina líquida estéril e incubado à 35°C por 24 horas. A mudança de coloração do meio de laranja/avermelhado para amarelo indica teste positivo. As cepas de *B. cereus* utilizam a glicose anaerobicamente;
- **Teste de decomposição da tirosina:** estriamento da cultura na superfície de Ágar Tirosina inclinado e incubado à 35°C por 3 a 7 dias. A decomposição da tirosina caracteriza-se

pelo aparecimento de uma zona clara na região abaixo da rampa. As cepas de *B. cereus* decompõem a tirosina rapidamente, formando uma zona de 3-4 mm de profundidade em 48-72h. É comum o escurecimento do meio ao longo da região de crescimento, com desenvolvimento de uma coloração castanha;

- **Redução do nitrato:** inoculação da suspensão da cultura em tubos contendo Caldo Nitrato e incubado à 35°C por 24 horas. Posteriormente, adicionou-se 0,25ml (2 a 3 gotas) do reagente ácido sufanílico 0,8% e 0,25ml (2 a 3 gotas) de  $\alpha$ -naftilamina 0,5%. O aparecimento de coloração rosa indica positividade (redução de nitrato à nitrito). O resultado negativo deve ser confirmado pela adição de pó de zinco, deixando em repouso por dez minutos. Observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo) ou adquire uma coloração rósea-avermelhada (teste negativo). Cepas de *B. cereus* reduzem o nitrato;

- **Teste de Voges-Proskauer (caldo VP modificado):** inoculação da suspensão da cultura em tubos contendo Caldo VP modificado, e incubação à 35°C por 24-48 horas. Posteriormente à incubação, adicionou-se para cada 1,0 mL de cultura, 0,6 mL de solução de  $\alpha$ -naftol 5%, 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio 40% e uma pitada de cristais de creatina, na ordem indicada. Foi agitado e mantido em descanso. Foi observado o desenvolvimento de uma coloração vermelha após alguns minutos no meio de cultura, devido a produção de acetilmetilcarbinol a partir de glicose. A permanência do meio na cor amarelada dos reagentes indica teste negativo. As cepas de *B. cereus* são VP positivas.

São considerados como *B. cereus*, as colônias típicas que apresentarem bastonetes Gram-positivos, esporulados, móveis, capazes de fermentar a glicose anaerobicamente com produção de ácido, reduzindo o nitrato a nitrito, reação VP positiva e decomposição da tirosina (ICMSF, 1996).

Uma vez identificados, os isolados caracterizados como *B. cereus* tiveram suas contagens expressas como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) das amostras de leite examinadas. Foi calculado o número de UFC/ mL em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (SILVA et al., 2007).

### **3.4.2 Contagem e caracterização de *Bacillus cereus* em amostras de leite após sete tempos (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h) do processo de fervura (destruição das células vegetativas e ativação dos esporos) mantidas a temperatura ambiente e após quatro tempos (6h, 8h, 10h e 12h) mantidas sob refrigeração (7°C)**

Nesta etapa, paralelamente aos itens **3.4.1.1** e **3.4.1.2**, amostras do mesmo tipo de leite foram submetidas ao processo de fervura.

Na primeira metade desta etapa, após a fervura, os recipientes contendo as amostras permaneceram em repouso à temperatura ambiente e tampados. Decorrida 1h da fervura, as amostras foram analisadas para detecção do *B. cereus* conforme os itens **3.4.1.1** e **3.4.1.2**. Após 2h, 4h e 6h, as amostras foram analisadas da mesma maneira.

Porém, nesta etapa, após os tempos subseqüentes à fervura, não houve a detecção do microrganismo na maioria das análises, mesmo naquelas onde ocorreu a presença do *B. cereus* antes da fervura. Com isso, necessitou-se prolongar as análises até a 12<sup>a</sup> hora após a fervura. Portanto, na segunda metade do experimento, as análises ocorreram após 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h após a fervura.

No laboratório, as unidades de amostra foram repartidas assepticamente em béquers de 1 litro estéreis, em duas sub-unidades de amostras (até metade do experimento) e em três sub-unidades (restante do experimento) (Figura 3). Essa divisão em sub-unidades ocorreu pelos seguintes fatos:

- aferir a temperatura de fervura da amostra: para não contaminar a alíquota da amostra que seria submetida à análise para detecção do *B. cereus*, houve a necessidade de utilizar outra alíquota da mesma amostra para aferir a temperatura no momento da fervura, as temperaturas subseqüentes nos tempos pré-determinados e o pH;

- até a metade do experimento, as análises realizadas eram até a 6<sup>a</sup> hora após a fervura, porém como não havia uma detecção significativa do microrganismo em questão, optou-se em realizar as análises até a 12<sup>a</sup> hora após a fervura, havendo, por sua vez, um aumento no crescimento a partir da 8<sup>a</sup> hora. Com o objetivo de também analisar a função da refrigeração frente ao crescimento do *B. cereus*, a amostra foi dividida em três sub-unidades.

O procedimento de repetição das análises após o processo de fervura com diferentes tempos de resfriamento e permanência do produto à temperatura ambiente, teve o intuito de

avaliar os riscos de patogenicidade de leites contendo esporos de *B. cereus*, caso permaneçam após a fervura por períodos de tempo relativamente longos à temperatura ambiente. Desta forma, os esporos sobreviventes devem germinar e as células vegetativas se multiplicarem, podendo atingir níveis de contaminação que se constituam em dose infectiva, ou seja, capaz de desencadear o processo de toxinfecção.

As sub-unidades destinadas à refrigeração (250 mL) também foram submetidas à fervura. Estas alíquotas permaneceram à temperatura ambiente por 20 minutos, ou seja, até atingirem 32-34°C. Em seguida, foram armazenadas em estufa tipo B.O.D. à 7°C e analisadas quanto aos quesitos temperatura, pH e população de *B. cereus* às 6, 8, 10 e 12 horas após a fervura.

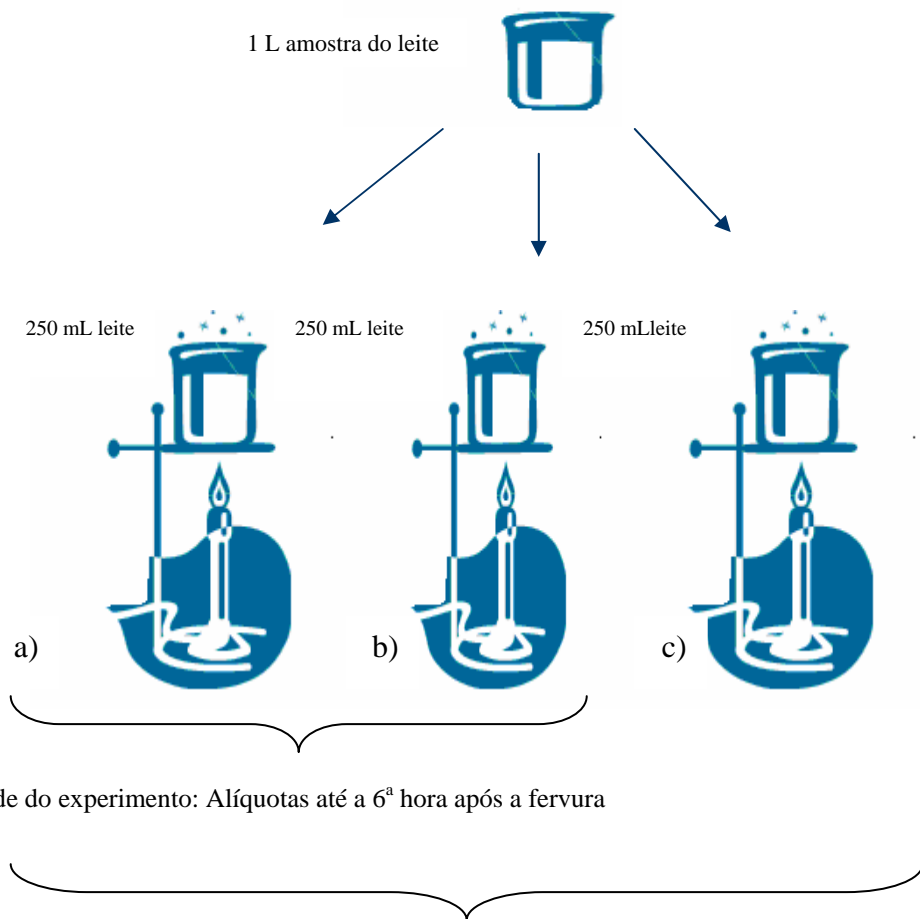


Figura 3 - Esquema de alíquotas utilizadas no experimento. a) Alíquota utilizada para a detecção de *B. cereus* à temperatura ambiente. b) Alíquota para aferição de temperatura e pH da amostra. c) Alíquota utilizada para a detecção de *B. cereus* à temperatura de refrigeração

### 3.5 Análise dos resultados

Para a análise gráfica dos resultados, as contagens de *Bacillus cereus* foram transformadas em logaritmo na base 10 ( $\log_{10} x + 2$ ). Os dados foram compilados em planilhas do programa Excel (Microsoft, Redmont, WA). Também foi feita a média das contagens para os tipos de leite analisados para melhor visualização gráfica dos dados.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da ocorrência de *Bacillus cereus*

A pesquisa realizada para *Bacillus cereus* revelou a presença deste patógeno em 46 das 75 amostras de leite analisadas (incidência de 61,33%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Ocorrência de *Bacillus cereus* em amostras de leites crus, pasteurizados e UAT coletados no comércio da região de Piracicaba/SP, durante os meses de janeiro a junho de 2007

Tipos de leite	Amostras analisadas	Amostras contaminadas	
		Nº	%
Cru	10	4	40
A	10	0	0
B	25	22	88
C	25	20	80
UAT	5	0	0
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>46</b>	<b>61,33</b>

Verifica-se uma variação acentuada na ocorrência desse microrganismo em função do tipo de leite, com as maiores incidências ocorrendo nos leites tipo B e C, que apresentaram, respectivamente, 88% e 80% das amostras contaminadas, valores superiores a porcentagem das amostras de leite cru (40%), que por sua vez, não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico a fim de diminuir sua população contaminante inicial. Não houve ocorrência do *B. cereus* nas amostras de leite pasteurizado tipo A e nas amostras de leite UAT analisadas.

Essas diferenças na ocorrência se devem, provavelmente, às melhores condições de higiene na ordenha e a refrigeração da matéria-prima, vigentes na produção de leite tipo A, o que contribui para a redução da contaminação e para o controle da multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes. Ao compararmos as diferenças das incidências das amostras de leite cru com as amostras de leites B e C, certamente, esta alta contaminação dos leites B e C sejam decorrentes de falhas no processo de pasteurização, contaminação pós-pasteurização e/ou esporos de *B. cereus* provenientes do leite cru (matéria-prima excessivamente contaminada).

As Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7 mostram as contagens totais de *B. cereus* em leite cru, pasteurizados tipos A, B e C e leite UAT.

Tabela 3 – Contagem total de *B. cereus* em leite cru (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
Cru 1	<10	23	6,24
Cru 2	7,0 x 10 <sup>3</sup>	28	6,33
Cru 3	1,0 x 10	19	6,12
Cru 4	1,0 x 10 <sup>2</sup>	22	6,35
Cru 5	<10	10	5,59
Cru 6	<10	19	5,66
Cru 7	<10	10	5,61
Cru 8	<10	15,5	6,56
Cru 9	<10	10	5,5
Cru 10	1,1 x 10 <sup>2</sup>	25	6,42
<b>Média</b>	7,2 x 10 <sup>2</sup>	18,15	6,03
<b>Desvio Padrão</b>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	6,58	0,40

Tabela 4 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo A (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

(continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
A 1	<10	18	6,10
A 2	<10	16	6,23
A 3	<10	16	6,31
A 4	<10	15	6,24
A 5	<10	11	6,16
A 6	<10	12	5,22

Tabela 4 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo A (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

(conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
A 7	<10	12	5,33
A 8	<10	17	5,98
A 9	<10	17	6,01
A 10	<10	12	6,14
<b>Média</b>	<10	14,6	5,97
<b>Desvio Padrão</b>	0	2,59	0,38

Tabela 5 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo B (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

(continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
B 1	4,0 x 10	16	5,95
B 2	3,0 x 10	20	6,45
B 3	2,5 x 10 <sup>3</sup>	17	6,47
B 4	2,4 x 10 <sup>2</sup>	19	6,31
B 5	3,2 x 10 <sup>2</sup>	17	6,52
B 6	2,0 x 10	19,5	6,57
B 7	2,5 x 10 <sup>3</sup>	18	6,48
B 8	6,0 x 10	12,5	6,62
B 9	1,0 x 10 <sup>4</sup>	15	6,46
B 10	1,5 x 10 <sup>2</sup>	18	6,22
B 11	<10	16	6,31
B 12	4,3 x 10 <sup>3</sup>	18	6,38
B 13	1,4 x 10 <sup>2</sup>	15	6,36
B 14	3,0 x 10	12	6,19
B 15	3,0 x 10	10,7	6,16

Tabela 5 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo B (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

(conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
B 16	<10	12,5	5,23
B 17	8,0 x 10	10	6,17
B 18	1,0 x 10	16	6,47
B 19	3,0 x 10	12	6,18
B 20	4,0 x 10	13	6,05
B 21	<10	16	6,38
B 22	1,0 x 10	15,5	6,51
B 23	3,0 x 10 <sup>2</sup>	14	6,24
B 24	2,2 x 10 <sup>3</sup>	11	6,17
B 25	2,5 x 10	13	6,08
<b>Média</b>	8,4 x 10 <sup>2</sup>	15,06	6,27
<b>Desvio Padrão</b>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	2,88	0,27

Tabela 6 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo C (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

(continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
C 1	1,1 x 10 <sup>2</sup>	13	5,8
C 2	4,0 x 10	14	6,5
C 3	1,2 x 10 <sup>3</sup>	14,5	6,53
C 4	1,8 x 10 <sup>2</sup>	17	6,33
C 5	2,0 x 10	18	6,38
C 6	5,0 x 10	14,5	6,42
C 7	2,4 x 10 <sup>5</sup>	18	6,36
C 8	1,7 x 10 <sup>4</sup>	12	6,56
C 9	7,0 x 10 <sup>4</sup>	15	6,31

Tabela 6 - Contagem total de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo C (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
C 10	<10	18	6,18
C 11	<10	13	6,18
C 12	3,0 x 10	16	6,39
C 13	2,1 x 10 <sup>2</sup>	17	6,15
C 14	1,3 x 10 <sup>2</sup>	15,5	6,27
C 15	1,0 x 10	18	6,39
C 16	<10	17	6,30
C 17	<10	12,5	6,21
C 18	2,0 x 10	12	6,07
C 19	8,0 x 10	15	6,23
C 20	8,3 x 10 <sup>2</sup>	16,5	6,32
C 21	<10	12	5,91
C 22	3,1 x 10 <sup>2</sup>	14	6,12
C 23	2,8 x 10 <sup>2</sup>	18	6,22
C 24	7,5 x 10	16	5,88
C 25	1,0 x 10	16	6,13
<b>Média</b>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	15,3	6,24
<b>Desvio Padrão</b>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	2,08	0,19

É interessante frisar que a temperatura observada nos refrigeradores dos pontos de comercialização onde as amostras de leite pasteurizado (A, B e C) foram obtidas, encontrava-se entre 10 e 12°C, portanto, acima da temperatura recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para leite e derivados, que deve ser de 7-8°C.

Tabela 7 - Contagem total de *B. cereus* em leite UAT (UFC/mL) com seus respectivos valores de temperatura e pH no momento da análise

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Total</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>
UAT 1	<10	27,5	5,92
UAT 2	<10	27	5,94
UAT 3	<10	27	6,06
UAT 4	<10	27,5	6,11
UAT 5	<10	27	6,05
<b>Média</b>	<10	27,2	6,01
<b>Desvio Padrão</b>	0	0,27	0,08

A Tabela 8 mostra os dados compilados da incidência de *B. cereus* com suas respectivas médias e desvio padrão para os diferentes tipos de leite.

Tabela 8 – Incidência de *B. cereus* nas amostras de leite analisadas

<b>Tipos de leite</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>
Cru	$7,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$
A	<10	0
B	$8,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$
C	$1,3 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
UAT	<10	0

Com relação aos valores encontrados, a maior incidência do microrganismo ocorreu principalmente nas amostras de leite pasteurizado tipo C, seguido pelas amostras de leite pasteurizado tipo B, cru, e finalmente, as amostras de leite A e UAT, nas quais não houve nenhuma ocorrência.

Os relatos de incidência de contaminação por *Bacillus* em leite têm despertado grande demanda por pesquisas neste sentido.

Ahmed, Moustafa e Marth (1983) estudando a ocorrência de *B. cereus* em leite e derivados, nos Estados Unidos, constataram que, de 100 amostras de leite pasteurizado

analisadas, 35 (35%) foram positivas para esse microrganismo. No Brasil, Silveira et al.(1989), analisando amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C na cidade de São Paulo, encontraram presença do *B. cereus* em 28,7% de 430 analisadas.

Já Griffiths (1992), no Canadá, avaliando a ocorrência de *Bacillus* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, constatou que, de 150 amostras analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*, sendo *B. cereus* detectado em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das de leite pasteurizado. Odumeru et al. (1997), também no Canadá, analisaram 43 amostras de leite pasteurizado e constataram a presença da bactéria em todas as amostras analisadas.

Granum, Brynstad e Kramer (1993) verificaram que, de 85 colônias de *B. cereus* isoladas de produtos lácteos (leite desnatado, leite semi-desnatado e creme de leite), 59% se revelaram enterotoxigênicas e 15% psicrotróficas.

Rangasamy, Iver e Roginski (1993), ao estudarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados em Vitória, Austrália, encontraram *B. cereus* em 26,4% das amostras analisadas, exceto em amostras de leite UAT. Em 1996, Schoken-Iturrino, Filho e Dimenstein analisaram 32 amostras de leite longa vida de quatro marcas diferentes na região de Ribeirão Preto, SP, onde evidenciaram a presença de bactérias do gênero *Bacillus* em 19 (59,37%). Seis (18,75%) amostras apresentaram contagens do gênero *Bacillus* que situaram-se entre 1 e 9 UFC/mL, cinco (15,65%) situaram-se entre 10 e 49 UFC/mL, seis (18,75%) entre 50 e 99 UFC/mL e 2 (6,25%) superiores a 100 UFC/mL. Como na Portaria nº01 de 28/01/1987, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL) da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, não havia menção de padrões nacionais específicos para o leite esterilizado, pasteurizado e cru para bactérias do gênero *Bacillus*, os autores confrontaram os resultados desta investigação com os padrões regulamentares que vigoravam na Inglaterra, concluindo que 2 (6,25%) amostras apresentaram contagens de bactérias do gênero *Bacillus* superiores às permitidas, ou seja, maiores que  $1 \times 10^2$ /mL (SCHOKEN-ITURRINO; FILHO; DIMENSTEIN, 1996).

Te Giffel *et al* (1997), investigaram 334 amostras de leite pasteurizado semi-desnatado, sendo encontrada, em 40% das amostras, a presença presuntiva de *B. cereus* em baixas contagens, variando de 50 a 5000 UFC/mL.

Lin *et al.* (1998) realizaram o procedimento de rastreamento de contaminação por *B. cereus* em usina de leite através de amostragem do leite em vários pontos durante o

processamento do mesmo, além de coleta de amostras de superfícies do ambiente através de *swab*. Os autores encontraram baixo número de células vegetativas de *B. cereus* no leite cru; encontrando, porém, esporos do microrganismo em altos números, na faixa de  $10^5$  UFC/mL. Essa contagem foi similar à das células vegetativas encontradas no leite pasteurizado. Os resultados obtidos sugerem que a maior fonte de contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado vem a ser os esporos de *B. cereus* do leite cru. A contaminação pós-pasteurização através das linhas de processamento ou ambiental teria pouca importância na contaminação do produto. Com o desenvolvimento das técnicas de caracterização molecular Svensson *et al.* (1999) utilizaram, com sucesso, a técnica de RAPD – PCR para uma prolongada investigação de fontes de contaminação em usina de leite. Grandes grupos (*clusters*) de isolados geneticamente relacionados foram encontrados no silo de armazenamento pré-pasteurização e no produto final durante os dois anos da duração da coleta, indicando um provável foco de contaminação persistente neste silo.

Rezende (1998) citado por Sanchez (2005) analisou 120 amostras de leite integral UAT produzidas no Brasil, na procura por espécies do grupo *cereus*. Seus resultados indicaram uma positividade em 34,17% do total de amostras analisadas, sugerindo a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas no processo térmico comercial do produto.

Estudo realizado por Cardoso (2000) revelou a presença do *B. cereus* em 48,3% de 240 amostras de leite A, B e C analisados na região de Campinas. Foram detectadas baixas populações, na faixa de  $10^2$  UFC/mL, com maior frequência no leite tipo C. Não houve detecção de cepas psicrófilas nas amostras analisadas. Para Cardoso (2000), esse resultado é compatível com aqueles obtidos por autores internacionais em que a presença de *B. cereus* em leite pasteurizado oscila entre 36% e 56%. Rezende, Rossi e Amaral (2000) ao analisarem 120 amostras de quatro diferentes marcas de leite UHT encontraram bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em 34,1% das amostras estudadas.

Bahout (2000), ao estudar 60 amostras de leite UHT no Egito, encontrou *Bacillus* sp. em 29,2% e *Bacillus cereus* em 18,3% delas. Segundo Bahout (2000) para a produção de leite UHT de boa qualidade, seriam necessários o controle microbiológico do leite cru, a adequada e eficiente limpeza dos equipamentos e o apropriado processo de tratamento térmico.

Vidal-Martins, Rossi e Rezende-Lago (2005), analisaram 110 amostras de 11 diferentes marcas de leite UHT para a pesquisa de bactérias do grupo do *Bacillus cereus*. Bactérias deste grupo foram verificadas em 13 (11,8%) amostras. Costa, Oliveira e Borges (2004) analisaram 75



amostras de leite em pó com o objetivo de pesquisar bactérias da espécie *Bacillus cereus*. Os resultados evidenciaram que 5 (6,66%) das amostras apresentaram células vegetativas e/ou esporos e 16 (21,33%) apresentaram somente esporos, sugestivas de estarem contaminadas por bactérias da espécie *Bacillus cereus*. Após a realização dos testes bioquímicos verificou-se que 13 (17,33%) das amostras foram positivas para bactérias do grupo *B. cereus* e 3 (4%) do total das amostras analisadas apresentaram contaminação acima do valor máximo permitido pela legislação, portanto inadequadas para o consumo. Estes achados sugerem um produto que apresenta riscos para a Saúde Pública.

Barros et al. (2006) analisaram 65 amostras de leite UAT procedentes de indústrias sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) de São Paulo, sendo isolado *Bacillus* spp em sete (10,76%) amostras, que apresentavam número de microrganismos acima de  $3,0 \times 10^3$  UFC/mL.

#### 4.2 Avaliação da detecção do *B. cereus* após 1h, 2h, 4h e 6h do processo de fervura com amostras de leite mantidas à temperatura ambiente (germinação de esporos e multiplicação das células vegetativas)

Nesta etapa procurou-se detectar a presença do microrganismo nas amostras de leite após terem sido submetidas ao tratamento térmico de fervura nos tempos 1h, 2h, 4h e 6h pós fervura. As tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 mostram as contagens totais até 6 horas após a fervura.

Tabela 9 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite cru após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
Cru 1	<10	<10	<10	<10
Cru 2	$1,9 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Cru 3	<10	<10	<10	<10
Cru 4	<10	<10	<10	<10
Cru 5	<10	<10	<10	<10
Cru 6	<10	<10	<10	<10
Cru 7	<10	<10	<10	$3,0 \times 10^2$
<b>Média</b>	$2,7 \times 10$	$5,0 \times 10$	$4,2 \times 10$	$5,7 \times 10$
<b>Desvio Padrão</b>	$7,2 \times 10$	$1,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$

Tabela 10 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo A após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
A1	<10	<10	<10	<10
A 2	<10	<10	<10	<10
A 3	<10	<10	<10	<10
<b>Média</b>	<10	<10	<10	<10
<b>Desvio Padrão</b>	0	0	0	0

Tabela 11 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo B após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
B 1	2,0 x 10	<10	1,1 x 10	5,5 x 10 <sup>2</sup>
B 2	3,0 x 10	<10	2,0 x 10 <sup>2</sup>	8,1 x 10 <sup>2</sup>
B3	6,5 x 10	<10	1,2 x 10 <sup>2</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>
B 4	7,0 x 10	3,8 x 10 <sup>2</sup>	6,0 x 10 <sup>2</sup>	4,1 x 10 <sup>3</sup>
B 5	<10	<10	<10	1,0 x 10 <sup>2</sup>
B 6	<10	<10	5,5 x 10	4,6 x 10 <sup>2</sup>
B 7	<10	1,0 x 10	1,1 x 10 <sup>2</sup>	3,2 x 10 <sup>2</sup>
B 8	<10	<10	8,0 x 10	3,8 x 10 <sup>3</sup>
B 9	<10	<10	1,0 x 10	7,7 x 10 <sup>2</sup>
B 10	2,0 x 10	<10	1,0 x 10	2,0 x 10 <sup>3</sup>
B 11	<10	<10	1,0 x 10	1,3 x 10 <sup>3</sup>
B 12	<10	<10	<10	8,0 x 10 <sup>2</sup>
B 13	6,0 x 10	1,0 x 10 <sup>2</sup>	9,9 x 10 <sup>2</sup>	3,8 x 10 <sup>3</sup>
B 14	<10	<10	2,0 x 10	8,5 x 10 <sup>2</sup>
B 15	2,0 x 10	<10	2,0 x 10	8,0 x 10 <sup>2</sup>
B 16	<10	<10	<10	8,9 x 10 <sup>3</sup>
<b>Média</b>	1,7 x 10	3,0 x 10	1,3 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>
<b>Desvio Padrão</b>	2,5 x 10	9,6 x 10	2,7 x 10 <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup>

Tabela 12 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo C após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
C 1	2,0 x 10	<10	1,3 x 10	3,1 x 10 <sup>2</sup>
C 2	1,0 x 10	<10	3,2 x 10	2,0 x 10 <sup>2</sup>
C 3	8,0 x 10	8,0 x 10	7,0 x 10	2,3 x 10 <sup>2</sup>
C 4	< 10	< 10	<10	2,2 x 10 <sup>2</sup>
C 5	<10	<10	<10	<10
C 6	<10	<10	<10	4,4 x 10 <sup>2</sup>
C 7	1,0 x 10	<10	<10	3,2 x 10 <sup>2</sup>
C 8	3,0 x 10	4,0 x 10	2,7 x 10 <sup>2</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup>
C 9	<10	<10	3,0 x 10	5,4 x 10 <sup>2</sup>
C 10	1,0 x 10	1,0 x 10	< 10	1,2 x 10 <sup>3</sup>
C 11	<10	1,0 x 10	7,5 x 10	2,3 x 10 <sup>3</sup>
C 12	<10	<10	<10	4,0 x 10
C 13	< 10	< 10	7,0 x 10	3,8 x 10 <sup>3</sup>
C 14	2,0 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10	8,0 x 10	5,9 x 10 <sup>3</sup>
C 15	< 10	<10	< 10	1,1 x 10 <sup>2</sup>
C 16	1,0 x 10	<10	5,0 x 10	8,8 x 10 <sup>2</sup>
<b>Média</b>	2,2 x 10	1,0 x 10	4,0 x 10	1,8 x 10 <sup>3</sup>
<b>Desvio Padrão</b>	5,1 x 10	2,0 x 10	6,8 x 10	3,3 x 10 <sup>3</sup>

Tabela 13 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite UAT após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente

(continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
UAT 1	<10	<10	<10	<10
UAT 2	<10	<10	<10	<10
UAT 3	<10	<10	<10	<10

Tabela 13 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite UAT após 1h, 2h, 4h e 6h após fervura e mantidas à temperatura ambiente (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>
UAT 4	<10	<10	<10	<10
UAT 5	<10	<10	<10	<10
<b>Média</b>	<10	<10	<10	<10
<b>Desvio Padrão</b>	0	0	0	0

Através da observação das tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, nota-se que, após as amostras serem submetidas à fervura, começou a haver um aumento significativo na população do microrganismo a partir da sexta hora (notadamente nos leites pasteurizados B e C), uma vez que com a fervura, os esporos sobreviventes germinaram, aumentando, conseqüentemente, o número de células vegetativas. Dessa forma, foi optado em prolongar as análises até a 12<sup>a</sup> após a fervura à procura de uma intensificação desta germinação e multiplicação da bactéria. Paralelamente, para verificar a importância da refrigeração, amostras analisadas a partir da 6<sup>a</sup> hora foram mantidas também sob refrigeração (7°C). As Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18 mostram os resultados encontrados.

Tabela 14 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite cru após 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
Cru 8	< 10	< 10	<10	3,1 x 10 <sup>2</sup> (9,0 x10)	1,3 x 10 <sup>3</sup> (6,0 x10)	1,8 x 10 <sup>4</sup> (1,3x10 <sup>2</sup> )	1,7 x 10 <sup>5</sup> (2,1 x 10 <sup>3</sup> )
Cru 9	< 10	< 10	<10	1,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	1,4 x 10 <sup>2</sup> (<10)	8,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	3,6 x 10 <sup>3</sup> (<10)
Cru 10	1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	7,0 x 10 <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>2</sup> (7,0 x10)	1,1 x 10 <sup>3</sup> (9,0 x10)	1,6 x 10 <sup>4</sup> (1,0x10 <sup>2</sup> )	2,7 x 10 <sup>4</sup> (1,1 x 10 <sup>2</sup> )

Tabela 14 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite cru após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
<b>Média</b>	3,3 x 10	3,3 x 10	2,3 x 10 <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>2</sup> (5,3 x 10)	8,4 x 10 <sup>2</sup> (5,0 x 10)	1,1 x 10 <sup>4</sup> (7,6 x 10)	6,6 x 10 <sup>4</sup> (7,3 x 10 <sup>2</sup> )
<b>Desvio Padrão</b>	0,5 x 10	0,5 x10	4,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup> (4,7 x 10)	6,2 x 10 <sup>2</sup> (4,5 x 10)	9,4 x 10 <sup>3</sup> (6,8 x 10)	9,0 x 10 <sup>4</sup> (1,1 x 10 <sup>3</sup> )

( ): Valores entre parênteses - contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) nas amostras refrigeradas

Tabela 15 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo A após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
A 4	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	4,8 x 10 <sup>2</sup> (<10)	2,4 x 10 <sup>4</sup> (<10)
A 5	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
A 6	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	8,0 x 10 (<10)	1,7 x 10 <sup>2</sup> (<10)
A 7	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	6,0 x 10 (<10)	1,7 x 10 <sup>2</sup> (<10)
A 8	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
A 9	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	2,1 x 10 <sup>2</sup> (<10)

Tabela 15 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo A após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
A10	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
<b>Média</b>	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	8,8 x 10 (<10)	3,5 x 10 <sup>3</sup> (<10)
<b>Desvio Padrão</b>	0	0	0	0 (0)	0 (0)	1,7 x 10 <sup>2</sup> (0)	9,0 x 10 <sup>3</sup> (0)

( ): Valores entre parênteses - contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) nas amostras refrigeradas

Tabela 16 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo B após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
B 17	<10	<10	5,0 x 10	2,3 x 10 <sup>3</sup> (<10)	3,6 x 10 <sup>4</sup> (<10)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )	3,3 x 10 <sup>5</sup> (1,1 x 10 <sup>2</sup> )
B 18	<10	<10	<10	7,0 x 10 (<10)	3,9 x 10 <sup>3</sup> (<10)	1,4 x 10 <sup>5</sup> (1,3 x 10 <sup>2</sup> )	3,1 x 10 <sup>5</sup> (1,7 x 10 <sup>2</sup> )
B 19	<10	<10	<10	2,9 x 10 <sup>2</sup> (<10)	1,1 x 10 <sup>4</sup> (<10)	1,5 x 10 <sup>5</sup> (2,0 x 10 <sup>2</sup> )	1,2 x 10 <sup>6</sup> (1,0 x 10 <sup>3</sup> )
B 20	<10	<10	<10	1,3 x 10 <sup>2</sup> (<10)	4,2 x 10 <sup>4</sup> (1,4 x 10)	2,5 x 10 <sup>5</sup> (1,4 x 10 <sup>3</sup> )	2,5 x 10 <sup>6</sup> (2,2 x 10 <sup>3</sup> )
B 21	<10	<10	<10	< 10 (<10)	6,5 x 10 <sup>2</sup> (<10)	1,1 x 10 <sup>4</sup> (2,1 x 10 <sup>2</sup> )	3,5 x 10 <sup>4</sup> (2,0 x 10 <sup>3</sup> )

Tabela 16 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo B após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
B 22	<10	<10	<10	2,2 x 10 <sup>2</sup> (<10)	3,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	7,0 x 10 <sup>3</sup> (1,1 x 10)	4,2 x 10 <sup>4</sup> (3,7 x 10 <sup>2</sup> )
B 23	<10	<10	<10	6,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	1,4 x 10 <sup>4</sup> (1,1 x 10)	1,9 x 10 <sup>5</sup> (5,2 x 10 <sup>2</sup> )	1,4 x 10 <sup>6</sup> (8,8 x 10 <sup>2</sup> )
B 24	3,0 x 10	5,5 x 10	<10	1,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	5,6 x 10 <sup>3</sup> (<10)	8,5 x 10 <sup>4</sup> (1,0 x 10)	6,8 x 10 <sup>5</sup> (2,1 x 10 <sup>2</sup> )
B 25	<10	<10	<10	1,3 x 10 <sup>2</sup> (<10)	3,1 x 10 <sup>3</sup> (<10)	1,0 x 10 <sup>5</sup> (2,0 x 10)	1,7 x 10 <sup>5</sup> (4,0 x 10 <sup>2</sup> )
<b>Média</b>	0,3 x 10	0,6 x 10	0,5 x 10	4,2 x 10 <sup>2</sup> (<10)	1,2 x 10 <sup>4</sup> (0,2 x 10)	1,2 x 10 <sup>5</sup> (2,8 x 10 <sup>2</sup> )	7,4 x 10 <sup>5</sup> (8,1 x 10 <sup>2</sup> )
<b>Desvio Padrão</b>	1,0 x 10	1,8 x 10	1,6 x 10	7,2 x 10 <sup>2</sup> (0)	1,5 x 10 <sup>4</sup> (0,5 x 10)	8,3 x 10 <sup>4</sup> (4,4 x 10 <sup>2</sup> )	7,7 x 10 <sup>5</sup> (7,9 x 10 <sup>2</sup> )

( ): Valores entre parênteses - contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) nas amostras refrigeradas

Tabela 17 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo C após 1h, 2h, 4h ,6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (continua)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
C 17	<10	<10	1,0 x 10	7,9 x 10 <sup>2</sup> (1,7 x 10)	1,6 x 10 <sup>4</sup> (2,1 x 10)	1,9 x 10 <sup>5</sup> (4,2 x 10 <sup>2</sup> )	2,4 x 10 <sup>5</sup> (4,2 x 10 <sup>2</sup> )
C 18	3,0 x 10	<10	<10	1,4 x 10 <sup>2</sup> (<10)	2,5 x 10 <sup>3</sup> (<10)	1,1 x 10 <sup>5</sup> (1,3 x 10 <sup>2</sup> )	8,0 x 10 <sup>5</sup> (1,4 x 10 <sup>2</sup> )

Tabela 17 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite pasteurizado tipo C após 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (conclusão)

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
C 19	<10	<10	<10	<10 (<10)	4,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	7,0 x 10 <sup>3</sup> (<10)	2,1 x 10 <sup>5</sup> (1,1 x 10 <sup>2</sup> )
C 20	<10	<10	1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>2</sup> (<10)	5,9 x 10 <sup>3</sup> (<10)	1,0 x 10 <sup>4</sup> (0,5 x 10)	2,5 x 10 <sup>5</sup> (1,3 x 10 <sup>2</sup> )
C 21	7,0 x 10	9,1 x 10	1,1 x 10 <sup>2</sup>	7,6 x 10 <sup>4</sup> (3,2 x 10)	1,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )	5,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )	2,1 x 10 <sup>6</sup> (4,0 x 10 <sup>2</sup> )
C 22	<10	<10	1,6 x 10	2,3 x 10 <sup>2</sup> (<10)	4,0 x 10 <sup>3</sup> (<10)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10)	1,1 x 10 <sup>6</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )
C 23	2,0 x 10	2,3 x 10	2,9 x 10	1,8 x 10 <sup>2</sup> (<10)	4,0 x 10 <sup>3</sup> (<10)	2,0 x 10 <sup>4</sup> (0,2 x 10)	1,3 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )
C 24	1,8 x 10	1,8 x 10	2,4 x 10	1,2 x 10 <sup>2</sup> (<10)	3,7 x 10 <sup>2</sup> (<10)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10)	2,6 x 10 <sup>5</sup> (1,1 x 10 <sup>2</sup> )
C 25	2,0 x 10	2,4 x 10	1,3 x 10	5,7 x 10 <sup>2</sup> (<10)	3,7 x 10 <sup>3</sup> (<10)	2,0 x 10 <sup>5</sup> (2,7 x 10)	3,0 x 10 <sup>5</sup> (1,0 x 10 <sup>2</sup> )
<b>Média</b>	1,7 x 10	1,7 x 10	1,4 x 10 <sup>2</sup>	8,6 x 10 <sup>3</sup> (0,5 x 10)	1,5 x 10 <sup>4</sup> (1,3 x 10)	1,5 x 10 <sup>5</sup> (7,8 x 10)	5,9 x 10 <sup>5</sup> (1,8 x 10 <sup>2</sup> )
<b>Desvio Padrão</b>	2,2 x 10	2,9 x 10	3,2 x 10 <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup> (1,1 x 10)	3,2 x 10 <sup>4</sup> (3,3 x 10)	1,5 x 10 <sup>5</sup> (1,3 x 10 <sup>2</sup> )	6,4 x 10 <sup>5</sup> (1,3 x 10 <sup>2</sup> )

( ): Valores entre parênteses - contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) nas amostras refrigeradas



Tabela 18 – Contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) em amostras de leite UAT após 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h após fervura e mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração

<b>Amostras analisadas</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
UAT 1	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
UAT 2	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
UAT 3	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (1,0 x 10)
UAT 4	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
UAT 5	<10	<10	<10	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (1,0 x 10)
<b>Média</b>	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0,3 x 10)
<b>Desvio Padrão</b>	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0,5 x 10)

( ): Valores entre parênteses - contagem total de *B. cereus* (UFC/mL) nas amostras refrigeradas

Analisando as tabelas 14, 15, 16, 17 e 18 nota-se que para os leites pasteurizados tipo B e C predominaram os tempos 10 e 12 horas após o processo de fervura e manutenção à temperatura ambiente como os tempos críticos, ou seja, com populações de *B. cereus* de  $10^4$ - $10^5$ - $10^6$  UFC/mL constituindo-se doses infectivas que poderiam levar a casos de toxinfecções pela ingestão do produto.

Também pode ser verificado que 66,7% das amostras de leite cru analisadas após o processo de fervura e com manutenção das mesmas à temperatura ambiente (10 e 12h) apresentaram contagens de *B. cereus* de  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL.

Das amostras de leite pasteurizado tipo A analisadas após a fervura e manutenção à temperatura ambiente por 10-12h, apenas 1 (14,3%), apresentou contagem de *B. cereus* de  $10^4$  após 12h à temperatura ambiente.

Em nenhuma das amostras de leite UAT analisadas após a fervura e manutenção das mesmas à temperatura ambiente até 12h, foi encontrado *B. cereus* (<10 UFC/mL).

Também pela observação dessas tabelas (14,15,16,17 e 18), fica evidente o benefício da manutenção das amostras de leite após a fervura, sob refrigeração, uma vez que em nenhuma das amostras analisadas, tanto de leite cru, pasteurizado tipo A, B e C e UAT, foram encontradas contagens de *B. cereus* acima de  $2,2 \times 10^3$  UFC/mL e, portanto, bem abaixo da dose infectiva.

A Tabela 19 mostra as médias das contagens de *B. cereus*, temperaturas e pH aferidos em todos os tempos das análises realizadas à temperatura ambiente. Observa-se que, as medidas aferidas não diferem muito para todos os tipos de leite e que a partir da 2ª hora após a fervura, a temperatura tende a se estabilizar. Também pode ser enfatizado que todas as temperaturas e pHs aferidos se encontram em faixa considerada adequada para o crescimento de *B. cereus*.

Tabela 19 – Médias das contagens de *B. cereus*, temperaturas e pH para cada tempo para os diferentes tipos de leite analisados (continua)

<b>Tipos de leite</b>	<b>Variável</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
<b>Cru</b>	UFC/mL	3,3x10	3,3x10	2,3x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	8,4x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>
	T(°C)	33,07	29,01	27,5	28,3	27,0	27,0	27,0
	pH	6,25	6,24	6,12	5,63	5,43	5,44	5,43
<b>A</b>	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	8,8x10	3,5x10 <sup>3</sup>
	T(°C)	31,12	29,0	28,83	28,8	28,12	27,25	26,75
	pH	6,23	6,23	6,20	5,93	5,8	5,95	5,76
<b>B</b>	UFC/mL	0,3x10	0,6x10	0,5x10	4,2x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>5</sup>
	T(°C)	30,9	29,3	30,0	29,5	28,0	27,0	26,66
	pH	6,37	6,38	6,47	6,3	6,23	6,21	6,21
<b>C</b>	UFC/mL	1,7x10	1,7x10	1,4x10 <sup>2</sup>	8,6x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	5,9x10 <sup>5</sup>
	T(°C)	30,85	29,37	27,87	27,75	27,75	26,85	26,0
	pH	6,44	6,44	6,31	6,1	6,00	5,95	5,95

Tabela 19 – Médias das contagens de *B. cereus*, temperaturas e pH para cada tempo para os diferentes tipos de leite analisados (conclusão)

<b>Tipos de leite</b>	<b>Variável</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>UAT</b>	T(°C)	32	30,83	30,6	31,03	30,5	29,33	29,0
	pH	5,85	5,85	5,87	5,85	5,86	5,89	5,94

Na Tabela 20 podem ser observadas as contagens médias de *B. cereus* com seus respectivos valores médios de temperatura e pH da 6<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> hora das amostras analisadas após a fervura e mantidas sob refrigeração à 7°C.

Tabela 20 - Médias das contagens de *B. cereus*, temperaturas e pH para os tempos 6h, 8h, 10h e 12h para os diferentes tipos de leite analisados sob refrigeração (continua)

<b>Tipos de leite</b>	<b>Variável</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
	UFC/mL	5,0 x 10	5,3 x 10	7,6 x 10	7,3 x 10 <sup>2</sup>
<b>Cru</b>	T(°C)	10,0	9,0	8,0	8,0
	pH	5,5	5,51	5,51	5,52
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10
<b>A</b>	T(°C)	10,2	10,0	9,4	9,0
	pH	5,48	5,56	5,54	5,57
	UFC/mL	<10	0,2 x 10	2,8 x 10 <sup>2</sup>	8,1 x 10 <sup>2</sup>
<b>B</b>	T(°C)	10,2	9,5	9,0	8,3
	pH	5,28	5,34	5,25	5,29
	UFC/mL	0,5 x 10	1,3 x 10	7,8 x 10	1,8 x 10 <sup>2</sup>
<b>C</b>	T(°C)	9,75	9,5	9,0	8,5
	pH	5,31	5,33	5,31	5,32

Tabela 20 - Médias das contagens de *B. cereus*, temperaturas e pH para os tempos 6h, 8h, 10h e 12h para os diferentes tipos de leite analisados sob refrigeração (conclusão)

Tipos de leite	Variável	6h	8h	10h	12h
UAT	UFC/mL	<10	<10	<10	0,3 x 10
	T(°C)	9	9	9	8
	pH	5,78	5,88	5,87	5,95

A seguir, nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8, estão ilustrados graficamente os resultados compilados das tabelas anteriores para uma melhor visualização dos dados. Todas estas figuras ilustram a evolução da população média de *B. cereus* em cada tipo de leite analisado ao longo do tempo. Os valores das contagens médias bacterianas estão expressos em logaritmo na base 10.

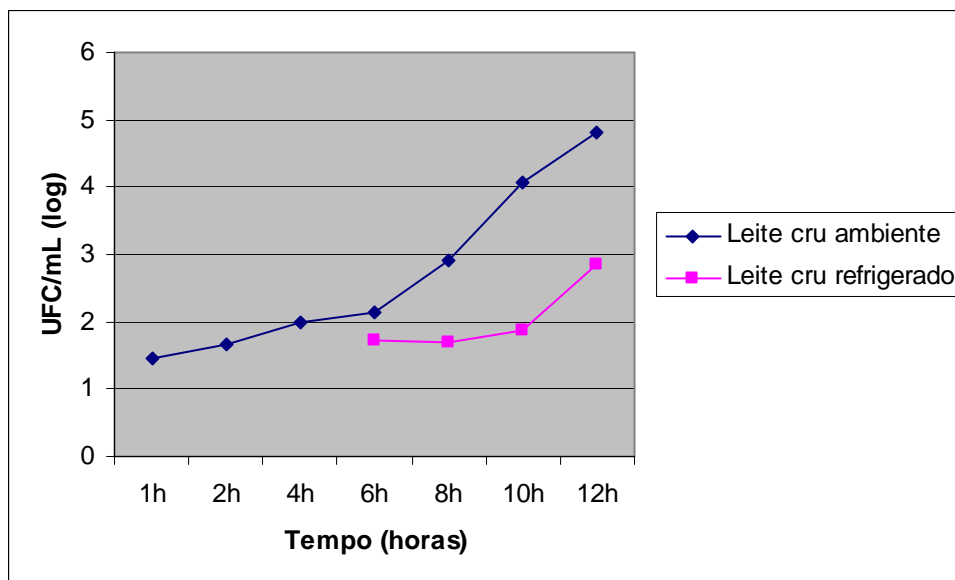


Figura 4 – Evolução da população média de *B. cereus* em amostras de leite cru após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração

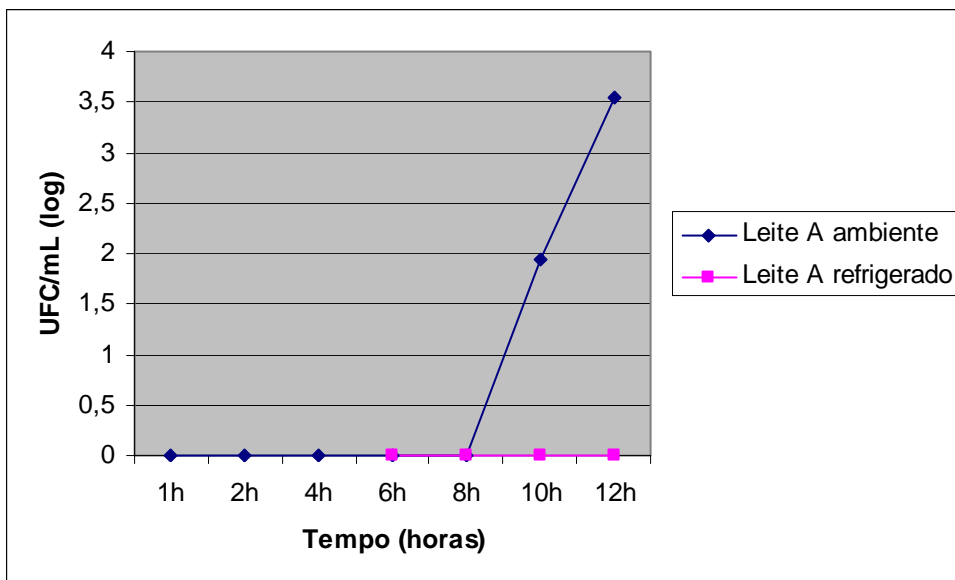


Figura 5 – Evolução da população média de *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado tipo A após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração

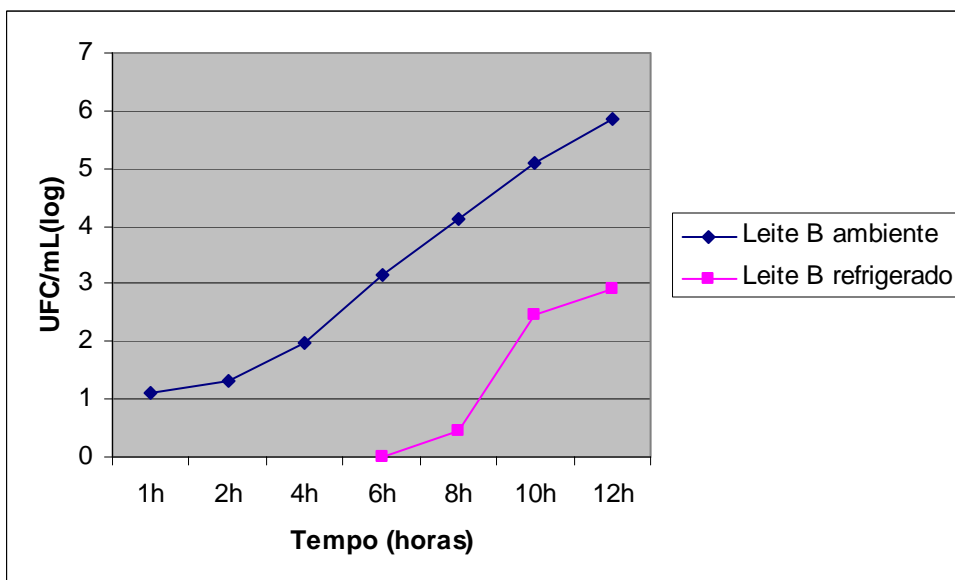


Figura 6 – Evolução da população média de *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado tipo B após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração

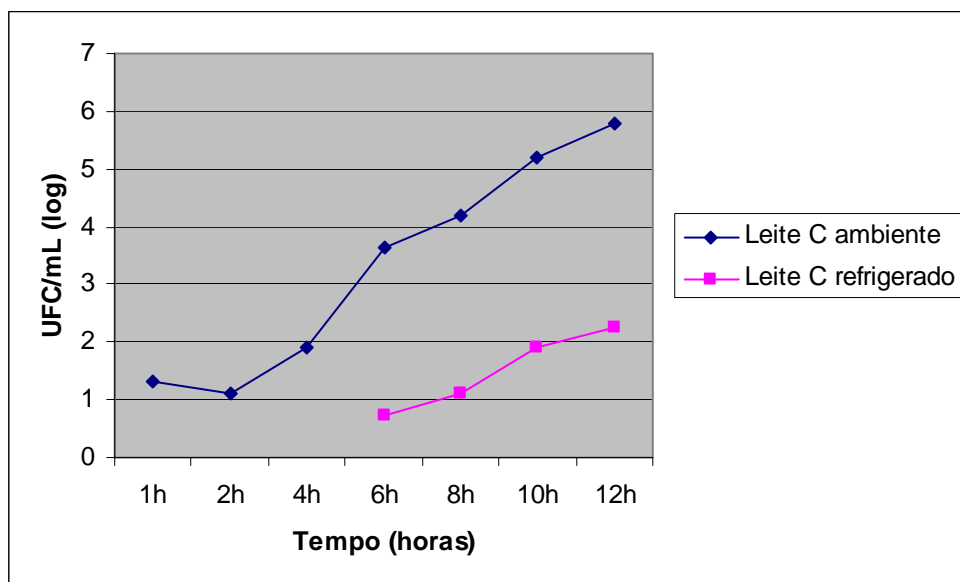


Figura 7 – Evolução da população média de *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado tipo C após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração

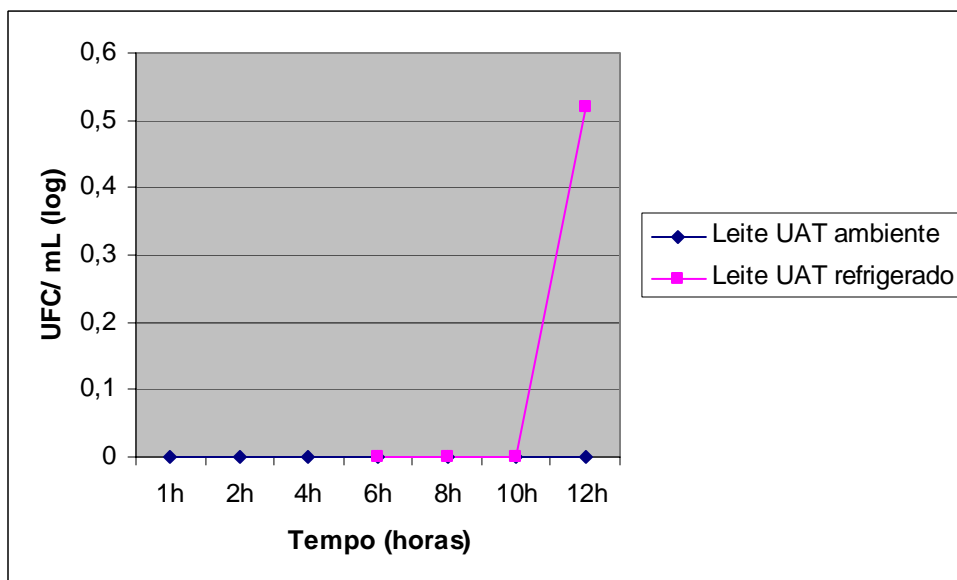


Figura 8 – Evolução da população média de *B. cereus* em amostras de leite UAT após fervura sob temperatura ambiente e sob refrigeração

A média da temperatura de fervura para todos os tipos de leite foi de 100,01°C e a temperatura das amostras mantidas à temperatura ambiente após 1 hora de fervura foi de 31,59°C, um pouco abaixo das temperaturas de fervura encontradas por Silva e Almeida (2006), onde a

temperatura média aferida foi de 102-104°C. A seguir, a Tabela 21 e Figura 9 mostram as médias das temperaturas de fervura para cada tipo de leite.

Tabela 21 - Temperaturas médias de fervura e após 1 hora das amostras mantidas sob temperatura ambiente

<b>Tipos de Leites</b>	<b>Temperatura de fervura (°C)</b>	<b>Temperatura após 1 hora de fervura (°C)</b>
Cru	100	33,07
A	99,08	31,12
B	100	30,90
C	100,5	30,85
UAT	100,5	32,00
<b>Média</b>	100,01	31,59

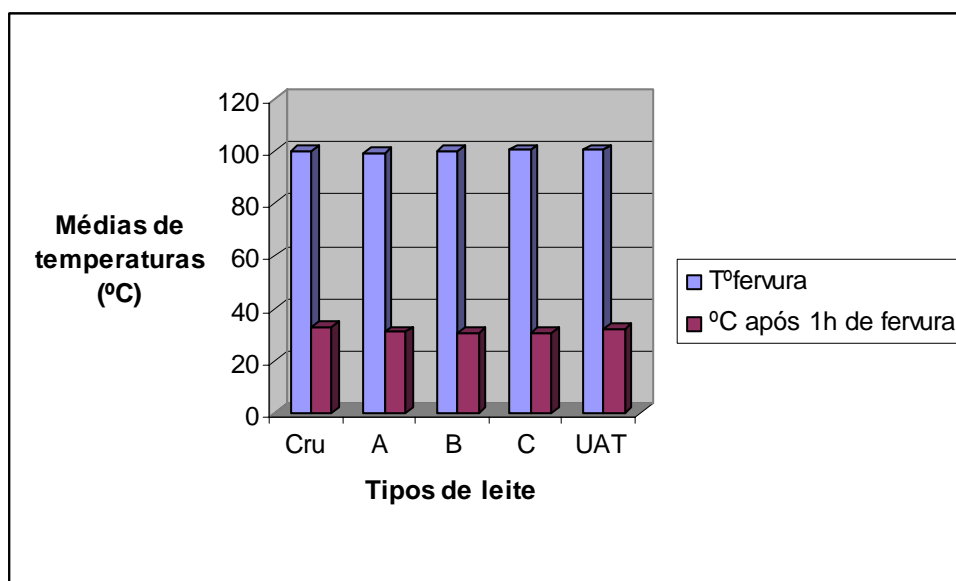


Figura 9 – Temperaturas médias de fervura e após 1 hora das amostras de leite mantidas à temperatura ambiente

Nota-se que a temperatura de fervura é praticamente a mesma, independente do tipo de leite. E após 1 hora do processo de fervura, a temperatura se estabiliza com a temperatura ambiente, que, aliás, é a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do *B. cereus*.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos permitem que sejam citadas as seguintes conclusões:

- Apesar da legislação brasileira atual não estabelecer padrões para a contagem de *Bacillus cereus* em leite fluido, 46 amostras (61,33%) das 75 analisadas apresentaram-se contaminadas pela bactéria, prevalecendo os leites pasteurizados tipos B e C com os maiores índices de contaminação, inclusive com algumas amostras atingindo populações de  $10^4$  UFC/mL e uma amostra com  $10^5$  UFC/mL. Este valor, como descrito na literatura, é considerado dose infectiva, a qual já seria suficiente para desencadear uma toxinfecção alimentar, caso o produto não seja submetido a um tratamento térmico adequado antes de ser ingerido.
- Dentre os tipos de leite analisados, o leite C foi o que se apresentou com maiores contagens de *B. cereus*.
- As amostras de leite pasteurizado tipo A e UAT foram as que apresentaram menores contaminações por *B. cereus*.
- Amostras de leite cru, pasteurizados tipos B e C mantidas à temperatura ambiente após a fervura atingiram números de *B. cereus* capazes de desencadear um quadro gastroentérico ( $10^5 - 10^6$  UFC/mL), mostrando que, embora a fervura do produto atinja temperaturas capazes de destruir as células de *B. cereus*, muitos esporos sobrevivem, germinam e levam à multiplicação das células vegetativas.
- A multiplicação bacteriana se tornou mais evidente a partir da 6<sup>a</sup> hora após a fervura e com manutenção das amostras a temperatura ambiente.
- A refrigeração é um meio eficaz para retardar o crescimento de *B. cereus* como pode ser verificado através das amostras mantidas à 7°C, onde a grande maioria das amostras analisadas de leite cru e pasteurizados tipos B e C, atingiu



contaminações máximas de  $10^2$  UFC/mL e algumas apenas com contagens de  $10^3$ UFC/mL.

- As amostras de leite UAT analisadas não se apresentaram contaminadas por *B. cereus*, nem diretamente analisadas (células vegetativas) nem após a fervura (germinação de esporos), quando mantidas à temperatura ambiente.
- Somente 2 amostras de leite UAT analisadas após o processo de fervura e mantidas sob refrigeração ( $7^{\circ}\text{C}$ ) apresentaram-se contaminadas por *B. cereus*, embora com contagens de apenas  $1,0 \times 10$  UFC/mL após 12h do processo de fervura.
- Como recomendação, em função dos resultados obtidos na presente pesquisa, deve ser enfatizada a necessidade de rápido resfriamento do leite após a fervura e manutenção do mesmo a temperatura de refrigeração, para evitar que esporos sobreviventes de *B. cereus* germinem levando a multiplicação das células vegetativas com riscos de toxinfecção alimentar.

## REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. Tratamentos do leite. In:\_\_\_\_\_. **Tecnologia de Leite e Derivados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. cap. 3, p. 25-27.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M. Production of emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, n. 1, p. 67-69, Jul. 1996.

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

AGNESE, A. P. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Soropédica-RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo v. 16. n.91, p. 58-61, mai/jun. 2002.

AHMED, A. A-H.; MOUSTAFA, M. K.; MARTH, E.; 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.

AMARAL, T. G. R. do. **Caracterização de propriedades leiteiras com relação ao conhecimento técnico, gestão administrativa e atendimento das necessidades humanas**. 2007. 169 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 145-155, Dec. 1995.

ANDERSSON, A.; GRANUM, P. E.; RÖNNER, U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be additional virulence mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 93-99, Jan. 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA - ABLV. **Brasil - Mercado total de leite fluido**. 2007. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/index.cfm?fuseaction=longavida>>. Acesso em: 6 mar. 2008.

\_\_\_\_\_. **Estatística**. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em: 9 mar. 2008a.

\_\_\_\_\_. **Tipos de leite longa vida**. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em: 9 mar. 2008b.

BAHOUT, A.A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. **Assiut Veterinary Medical Journal**, Assiut, v.42, n.1, p.47-53, 2000.

BANERJEE, M.; SARKAR, P. K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 3, p. 335-342, Jun. 2004.

BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C.; TELLES RAMOS, E. O.; VILLARREAL, L. Y. B.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Isolamento e identificação de *Bacillus cereus* de leite UHT: detecção de toxina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, p.72-78, 2006.

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat –treated milk. **Food Microbiology**, London, v. 25, n.2, p.1-9, Feb. 2008.

BASTOS, M.S.R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, p.32-36, 1999.

BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 1242-1246, 1986.

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

BEECHER, D. J.; WONG, A. 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, 1994.

BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. chap.32, p.311-316.

BLAKE, M.R.; WEIMER, B.C. Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, n.5, p.1643-1646, 1997.

BOTEGA, J. V. L. **Diagnóstico da automação na pecuária leiteira**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H.; STAKER, R.T.; SIMPKIN, D.L. The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. **Journal of Applied Microbiology**, Washington v.57, n.2, p.317-323, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº30691 de 29 de março de 1952 – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (R.I.I.S.P.O.A.). **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 jul. 1952. Seção 1, p.10785. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=14974>>. Acesso em: 12 set. 2007.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT). **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19700. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=1252>>. Acesso em: 8 mar. 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51 de 18 setembro de 2002 - Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002a. Seção 1, p. 13. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 8 mar. 2008.

BRITO, J.R.F.B.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998.17p.

BUSANI, S. F. B. **Estudo da viabilidade de tratamentos térmicos alternativos para leite pasteurizado e de vida de prateleira estendida**. 2005. 224 p. Tese (Doutorado e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CAMARGO, N. J.; SOUZA, I. L.; PUZYNA, I. P.; PESTANA, A.; NERVINO, C. V.; HIROOKA, E. Y.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no estado do Paraná entre 1978 e 1997. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia-SP, 1998. p. 67.

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

CARVALHO, L. A. **Sistemas de produção**. 2004. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 07 mar. 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.34, n.1, p.1-30, 1994.

CHRISTIANSSON, A.; BERTTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.82, p. 305-314, 1998.

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

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C. Genus *Bacillus*. In: HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2th ed. Baltimore: Williams Wilkins, 1986.

COLLADO, J.; FERNÁNDEZ, A.; RODRIGO, M.; CAMATS, J.; LOPEZ, A. M. Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, London, v.20, n.5, p. 545-548, Oct. 2003.

COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotropic organisms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p.157-160, 1981.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

CRONIN, U. P.; WILKINSON, M.G. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. **Food Microbiology**, London, n.25, p. 235-243, 2008.

DOYLE, M. P. *Bacillus cereus*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.199-200, 1988.

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, Sept. 1994.

DUSMALISILE, P.; WITTHUHN, R.C.; BRITZ, T.J. Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.2, p.74-82, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 2, p. 189-195, Mar. 2004.

EMBRAPA. **Ranking da produção anual leite por estado no Brasil, 2004**. Brasília, 2006. Disponível em:  
<<http://www.cnp.gl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela02.40.php>>. Acesso em: 6 mar. 2008.

\_\_\_\_\_. **Produção mundial de leite de vaca - 1996/2006**. Brasília, 2007a. Disponível em:  
<<http://www.cnp.gl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela02.11.php>>. Acesso em: 6 mar. 2008.

\_\_\_\_\_. **Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca – 2006.** Brasília, 2007b. Disponível em:  
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela02.12.php>. Acesso em: 6 mar. 2008.

\_\_\_\_\_. **Produção brasileira de leite (Total e SIF).** Brasília, 2007c. Disponível em:  
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/04industria/grafico04.01b.php>. Acesso em: 6 mar. 2008.

EVANS, J. A.; RUSSEL, S. L.; JAMES, C.; CORRY, J. E. L. Microbial contamination of food refrigeration equipment. **Journal of Food Engineering**, v.62, n. 3, p. 225-232, May 2004.  
FERREIRA, M. A. **Controle de qualidade físico-químico em leite fluido.** Brasília: UNB, 2007. 21 p. Dossiê Técnico.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA – Center for food safety and applied nutrition. The dangers of raw milk. 2006. Disponível em:  
< <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/rawmilk.html> >. Acesso em 03 sept. 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.

FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London:Blackie Academic & Professional, 1998. 478 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. cap. 4, p. 41-43.

FRANK, J. F. Milk and Dairy Products. In: DOYLE, M. P.; BEHAUT, L. R.; MONTVILLE, T. **Journal Food Microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington, DC: ASM Press, 1997, p. 101-116.

FRANKLIM, J. G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.33, n.1, p.180-91, 1970.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. de; GALINDO, G. A. R. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 264, n.2, p. 212-218, 2005.

FROEDER, E. **Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru da bacia leiteira de Viçosa, MG.** 1985. 54 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1985.

GAMA, M. A. S.; ALMEIDA, R. **Depressão da gordura no leite.** 2004. Disponível em:  
<<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso em: 07 mar. de 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: \_\_\_\_\_. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. São Paulo: Varela, 2003. cap.12, p.215-220.

GILMOUR, A.; ROWE, M.T. Microorganisms associated with milk. In: ROBINSON, R.K. 2th ed. **Dairy microbiology**: the microbiology of milk. London: Elsevier, 1990. v.1, p. 37-75.

GOMES, A.T. Contratos de compra e venda de leite. In: MARTINS, C. E.; CÓSER, A. C.; ALENCAR, C. A. B.; WENDLING, I. J.; FIGUEIREDO, J. L. B.; ALENCAR, W. L. B. **Sustentabilidade da pecuária de leite e de corte da região do leste Mineiro**. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2004. p.70-90.

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

\_\_\_\_\_. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P; BEUCHAT; L. R.; MONTVILLE, T. J. **Microbiología de los alimentos**: fundamentos y fronteras. Zaragoza: Acribia; 1997. c.17, p. 343-353.

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. 1993.

GRIFFITHS, M. W. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 275, p.36-39, 1992.

GUVEN, K.; MUTLU, M. B.; AVCI, O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meats products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety**, Westport, n. 26, p.30-40, 2006.

HAJDENWURCEL, J. R. Microrganismos patogênicos. In: \_\_\_\_\_. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2004. cap. 3, p. 35-57.

HANSON, M.L.; WENDORFF, W.L.; HOUCK, K.B. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n.7, p.1484-1486, 2005.

HILGENBERG, C.; SPERANÇA, E. R.; ROCHA, C.; LIMA, D. C. Avaliação do teste de fosfatase alcalina em leites pasteurizados. **Leite & Derivados**, São Paulo, n.86, ago. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. 2007. Disponível em:  
<[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impresao.php?id\\_noticia=1053](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1053)>. Acesso em: 07 mar. 2008.



INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. *Bacillus cereus*. In:\_\_\_\_. **Microrganismos de los Alimentos**: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. chap.2, p. 25-42.

IVERS, J. T.; POTTER, N. N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.1, p. 17-22, 1977.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5th ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661p.

\_\_\_\_\_. **Modern food microbiology**. 6th ed. Gaithersburg: Springer-Verlag, 2000. 767p.

JAYARAO, B.M; HENNING, D.R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.84, n.10, p.2157-2162, 2001.

JENNESS, R. Composition of milk. In: WONG, N. P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3th ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 1999. p.1-38.

JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* food-borne illness – an update. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 47, n.2. p. 145-153, 1984.

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

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, B; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, San Diego, v. 56, n. 1, p. 77-87, Jan. 2003.

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

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F.; VANINI, L. GUERZONI, M. E. Growth/ no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, London, v. 18, p.659-668, 2001.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. cap. 7, p. 109-148.

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, 1997.



\_\_\_\_\_. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 173-176, 1999.

LARSON, B. **Lactation**. Ames: Iowa State University Press, 1985, 276 p.

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

MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A Rapid PCR-Based DNA Test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.5, p. 1634-1639, May 1998.

MAZAS, M.; GONZALES, I.; LOPEZ, M.; GONZALES, J.; SARMIENTO, R. M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, Chester, v. 30, p.609-620, 1995.

MENDONÇA, A.H. et al. Qualidade microbiológica de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2001. p.282-288.

MINNARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n.10, p.1535-41, 2001.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M .S. Hábitos Alimentares do Consumidor de Leite Cru de Campo Mourão-PR. **Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 24. p. 21-26, 2003.

NOTERMAN, 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, 1997.

ODUMERU, J. A.; TONER, A. K.; MUCKLE, C. A.; GRIFFITHS, M. W.; LYNCH, J. A. Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 30, n.11, p.1391-1393, 1997.

OLIVEIRA, C. A. F. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 2 ed. São Paulo: Varela, 2003. c.5, p.91-102.

OLIVEIRA, A. J. de; GALLO, C. R.; CARVALHO, C. M. de. Tratamento térmico do leite acondicionado em filme plástico em banho-maria. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51 n.1 , p. 175-183, 1994.

OLIVEIRA, C.A.F., FONSECA, L.F.L., GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**. Piracicaba, 2005. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

PAN, T. M.; CHIOU, C. S.; HSU, S. Y.; HUANG, H. C.; WANG, T. K.; CHIU, S. I.; YEA, H. L.; LEE, C. L. Foodborne disease outbreaks in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipen, v. 95, n.5, p. 417-420, May 1996.

PANISELLO, P. J.; ROONEY, R.; QUANTICK, P. C.; STANWELL, S. R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n.3, p. 221-234, Sept. 2000.

PARRY, J .M.; GILBERT, J.R. Studies of the heat resistance of *B. cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. **Journal of Hygiene**, London, 84: 77-82, 1980.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia de Alimentos. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997. cap. 30, v. 2, p.380.

PENG, H.; FORD, V.; FRAMPTON, E. W.; RESTAINO, L. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 231-238, 2001.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G.; SILVA, L. V. F. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista dos Criadores**, São Paulo, n.807, p.19-21, 1997.

PEREIRA JÚNIOR, F.N. Comparação de métodos utilizados para a enumeração de microrganismos psicotróficos em leite cru. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, n.18, 2001, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2001. p.334-339.

PIRHONEN, T. I.; ANDERSSON, M. A.; JÄÄSKELÄINEN, E. L.; SALKINOJA-SALONEM, M. S.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JOHANSSON, T. M. -L. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. **Food Microbiology**, v. 22; n. 1; p. 87-91, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/07400020>>. Acesso em: 28 set. 07.

PÓVOA, M. E. B.; MORAES-SANTOS, T. Efeito do aquecimento sobre o leite bovino. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.37, n. 220, p. 3-6, 1982.

PRATA, L.F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, p.10-15, 1998.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n.3, p. 194-198, 2006.

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

REZENDE, N.C.M. **Ocorrência de bactérias do grupo *B. cereus* e de microrganismos indicadores em leite UHT integral**. 1998. 82 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

REZENDE, N. C. M.; ROSSI Jr., O. D.; AMARAL, L. A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.7, n.3, p. 162-166, 2000.

RICHER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. chap.47, p.483-495.

ROSOLEN, J. E. Mapa do leite no Estado de São Paulo. **Associação Leite Brasil**. 20 p., 2006 Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br/download/mapadoleitesp.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2008.

ROSSLAND, E.; ANDERSEN BORGE, G. I.; LANGSRUD, A.; SORHAUG, T. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.89, p 205-212, 2003.

RUEGG, P. L. Practical food safety intervention for dairy production. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.86, suppl. E1-E9, 2003.

SALA, F. J.; IBERZ, P.; PALOP, A.; RASO, J.; CÓNDON, S. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus subtilis* at different pH values. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, p.239-243, 1994.

SALÁN, E. O. **Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade – avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* e de *Staphylococcus aureus***. 2005. p.88. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

SANCHEZ, C. P. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT**. 2005. 255 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. da. Granelização e resfriamento do leite e seu impacto sobre a qualidade. **Leite & Derivados**, São Paulo, v.12, n.71, p. 35-45, jul. 2003.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; FILHO, A. N.; DIMENSTEIN, A. R. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n.42, p.25-27, 1996.

SEENAPA, M.; KIMPTON, A.G. A simple key for the identification of *Bacillus cereus* species common in foods. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.18, n.4, p. 131-132, 1981.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. **Estabilidade térmica do leite**. Trabalho realizado na EPAMIG – Centro Tecnológico/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Disponível em: <<http://www.atruius.com.br/download/estab.%20%E9rmica%20%20artigo.doc>>. Acesso em: 11 mai. 2006.

SILVA JÚNIOR, E. A. da S. Agentes de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). In:\_\_\_\_. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 2005a. cap.2, p. 54-61.

\_\_\_\_\_. Fatores que interferem no metabolismo dos microrganismos. In:\_\_\_\_. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 2005b. cap.1, p. 21-42..

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, A. R. *Bacillus cereus*. In: \_\_\_\_\_. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. cap. 11, p. 149-160.

SILVEIRA, V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M. A. B.; SARUWTARI, J. K.; CHICOUREL, E. L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 49, n.1, p.19-25, 1989.

SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R.; ALTIERI, C.; MASSA, S. Response surface model for effects of temperature, water activity and pH on germination of spores *Bacillus cereus*. **Journal of Food Safety**, Westport, n.22, p. 121-133, 2002.

SOARES, C. M. ***Bacillus cereus* produtores de toxinas diarreicas em serviços de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos**. Campinas, 2004. 150 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2004.

SOARES, P.V.; PRATA, L.F. Estimativa rápida da carga de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2004. 1 CD-ROM.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, London, v.8, n.2, p.35-41, 1997.

SOTO, F. R. M.; RISSETO, R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, A. M. G. Toxinfecção alimentar por *Bacillus cereus*: relato de caso. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19. n. 130, p.33-36, abri. 2005.

SOUZA, P. M. de. **Estudo comparativo da pasteurização de leite pelo método convencional e por microondas**. 2007. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SPEXOTO, A. A. **Aplicação do sistema de análises de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras**. 2003. 160 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

SVENSSON, B.; ENEROTH, Å.; BRENDEHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 903-912, Dec. 1999.

SVENSSON, B.; MONTHÁN, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M.; CHRISTIANSSON, A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**, Oxford, v.16, p. 740-746, 2006.

TAVARES, S. G. **Avaliação das condições microbiológicas de leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP**. Piracicaba, 1996. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1996.

TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 307-318, Mar., 1997.

TETRA PAK. **UltraFresh**. 2004. Disponível em: <<http://www.tetrapak.com.br>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

VAN NETTEN, P.; VAN DE MOOSDIJK, A. P.; VAN HOENSEL, P.; MOSSEL, D. A. A.; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriological**, Washington v. 69, p.73-79. 1990.

VIDAL-MARTINS, A. M. C., ROSSI, O.D., REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra-alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

WALSTRA, P. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WANG, O. K. Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 12, n.1, p. 451-454, 1994.

WELT, B. A.; TEIXEIRA, A. A.; BALABAN, M. O.; SMERAGE, G. H.; SAGE, D. S. Iterative method for kinetic parameter estimation from dynamic thermal treatments. **Journal of Food Science**, v.62, n.1, p. 8-14, 1997.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Considerações a respeito da fervura doméstica do leite. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, p.48-52, 1984.

ZALL, R.R. Control and destruction of microorganisms In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. 2th ed. London: Elsevier, 1990. v 1, p.115-161.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)