OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM ALGUNS MACARRÕES
INDUSTRIALIZADOS. ESTUDO DE SUA MULTIPLICAÇÃO DURANTE
O PROCESSAMENTO E PREPARO PARA O CONSUMO

IVANA CRISTINA SPOLIDÓRIO McKNIGHT
Engenheira-agrônoma

Orientador: Dr. MAURO FABER DE FREITAS LEITÃO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Ciência e Tecnolo-
gia de Alimentos.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

McKnight, Ivana Cristina Spolidório

K69o Ocorrência de Bacillus cereus em alguns macarrões
industrializados; estudo de sua multiplicação duran-
te o processamento e preparo para o consumo. Pira-
cicaba, 1989.

65p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Bactéria patogênica em macarrão - Ocorrência
2. Bactéria patogênica em macarrão - Propagação 3.
Macarrão - Bacteriologia 4. Macarrão - Contaminação
bacteriana 5. Macarrão - Tecnologia I. Escola Supe-
rior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 664.755

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM ALGUNS MACARRÕES INDUSTRIALIZADOS. ESTUDO DE SUA MULTIPLICAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO E PREPARO PARA O CONSUMO

IVANA CRISTINA SPOLIDÓRIO McKNIGHT

Aprovada em: 19/12/1989

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Jorge Horii

ESALQ/USP

Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

ITAL/CPA

Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Orientador

Ao meu esposo Newtinho

meu filho Marcelo

Aos meus pais Idivan e Marilene

e meu irmão Idivan Luís

Com carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela orientação competente, atenção e apoio prestados na realização deste trabalho.

À Dr. Mirtha N.U. Eiroa, Chefe da Seção de Microbiologia - ITAL e demais funcionários da seção, pela atenção e auxílio oferecidos durante o desenvolvimento da parte experimental desta dissertação.

Ao Dr. Renato Ferreira de Freitas Leitão, pesquisador da seção de Farinhas - ITAL, pelo importante auxílio em-prestado nos trabalhos de processamento industrial de macarrão.

À Diretoria do ITAL, pela atenção e apoio que propiciaram a realização deste trabalho experimental nas suas dependências.

Às pesquisadoras Léa Mariza de Oliveira e Raquel Zoega Martins da Silva, do ITAL, pelo auxílio nas determinações de atividade de água das amostras de macarrões.

Ao Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ/USP, que possibilitou a nossa participação no curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Es-

tado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsas de pós-graduação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Caracterização Morfológica, Fisiológica e Bioquímica de <i>Bacillus cereus</i>	4
2.2. Patologia de <i>Bacillus cereus</i>	8
2.3. Ocorrência e Epidemiologia.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Avaliação da Ocorrência de <i>Bacillus cereus</i> em Macarrões Produzidos Comercialmente.....	19
3.1.1. Materiais.....	19
3.1.2. Isolamento e Identificação de <i>Bacil-</i> <i>lus cereus</i>	19
3.2. Avaliação da Multiplicação de <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> Durante o Preparo Industrial do Ma- carrão	21
3.2.1. Materiais.....	21
3.2.2. Procedimento Experimental	24

3.3. Avaliação da Multiplicação de <i>Bacillus cereus</i> Durante o Preparo do Macarrão para Consumo e Armazenamento do Alimento já Preparado	25
3.3.1. Cocção e preparo do macarrão pré-inoculado durante o processamento...	26
3.3.2. Inoculação do macarrão após cocção..	27
3.3.3. Inoculação do macarrão já processado seguido de cocção e preparo.....	27
3.3.4. Presença de <i>Bacillus cereus</i> na água drenada após cocção do macarrão.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Avaliação da Ocorrência de <i>Bacillus cereus</i> em Macarrões Produzidos Comercialmente.....	29
4.2. Avaliação da Multiplicação de <i>Bacillus cereus</i> Durante o Preparo Industrial do Macarrão.....	34
4.3. Avaliação da Multiplicação de <i>Bacillus cereus</i> Durante o Preparo do Macarrão para Consumo e Armazenamento do Alimento já Preparado	45
4.3.1. Experimento de cocção e preparo de macarrão com massa inoculada experimentalmente com aproximadamente $1,0 \cdot 10^3$ esporos de <i>Bacillus cereus</i> /g....	45

4.3.2. Experimento de cocção e preparo .. de macarrão seguido de inoculação de esporos de <i>Bacillus cereus</i> , na proporção aproximada de 10^3 esporos/g.....	47
4.3.3. Experimento de inoculação do macarrão e secagem da amostra inoculada, seguido de cocção, preparo e armazenamento.....	51
4.3.4. Avaliação da presença de esporos na água drenada após a cocção do macarrão	52
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fluxograma básico de processamento do macarrão com e sem ovos	23
Figura 2: Relação entre umidade absoluta e atividade de água durante a secagem do macarrão (Ensaio 1)	42
Figura 3: Relação entre umidade absoluta e atividade de água durante a secagem do macarrão (Ensaio 2)	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características de toxinfecção por <i>Bacillus cereus</i>	14
Tabela 2: Toxinfecções provocadas por <i>Bacillus cereus</i> , relacionadas com tipo de alimento e sintomatologia	15
Tabela 3: Alguns dados sobre a presença de <i>Bacillus cereus</i> em alimentos no Brasil.....	17
Tabela 4: Incidência de <i>Bacillus cereus</i> em macarrões produzidos comercialmente.....	29
Tabela 5: Distribuição da microbiota de <i>Bacillus cereus</i> em amostras de macarrão comercial.	32
Tabela 6: Reações bioquímicas observadas em 199 cepas caracterizadas presuntivamente como <i>Bacillus cereus</i>	33
Tabela 7: Microbiota de <i>Bacillus cereus</i> , inoculado experimentalmente em macarrão sem ovos, nas várias etapas do processamento industrial	35
Tabela 8: Microbiota de <i>Bacillus cereus</i> , inoculado experimentalmente em macarrão com ovos,	

nas várias etapas do processamento industrial	36
Tabela 9: Variação nos teores de umidade e atividade de água (Aa) em macarrão sem ovos, nas várias etapas do processamento industrial	39
Tabela 10: Variação nos teores de umidade e atividade de água em macarrão com ovos, nas várias etapas do processamento industrial	40
Tabela 11: Microbiota de <i>Bacillus cereus</i> em macarrão inoculado, após cocção e armazenamento a 30°C	46
Tabela 12: Multiplicação de <i>Bacillus cereus</i> em macarrão cozido e resfriado, inoculado experimentalmente com suspensão de esporos e armazenado a 30°C	48
Tabela 13: Relação entre grau de contaminação inicial e período de armazenamento do macarrão a 30°C, necessário para se atingir populações de <i>Bacillus cereus</i> de 10 ⁷ UFC/g	50

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM ALGUNS MACARRÕES
INDUSTRIALIZADOS. ESTUDO DE SUA MULTIPLICAÇÃO DURANTE
O PROCESSAMENTO E PREPARO PARA O CONSUMO

Autora: IVANA CRISTINA SPOLIDÓRIO McKNIGHT
Orientador: Dr. MAURO FABER DE FREITAS LEITÃO

RESUMO

Foram avaliados os níveis de contaminação por *Bacillus cereus* em macarrões comerciais, com e sem ovos, constatando-se índices médios de 70,9%, oscilando entre 58,3 e 87,5% nas amostras com e sem ovos, respectivamente. A microbiota contaminante foi variável com 52,1% das amostras evidenciando populações na faixa entre 10^1 e 10^2 UFC/g e 20,1% no intervalo entre 10^2 e 10^3 UFC/g.

Os estudos experimentais da capacidade de multiplicação de *Bacillus cereus* durante o processamento industrial revelaram a ausência de desenvolvimento da bactéria, independente dos níveis de inoculação (10^2 e 10^4 UFC/g) e do uso de ovos nas formulações. Constatou-se que os valores de atividade de água (Aa) inferiores a 0,92 e limitantes para a multiplicação eram atingidos no início da operação de secagem, após 3 horas de processo. A esta ativi

dade de água crítica correspondiam níveis de umidade variáveis de 17,5 a 19,0% para macarrões sem e com ovos, respectivamente.

Os estudos sobre o comportamento do *Bacillus cereus* durante o preparo do macarrão para o consumo final, revelaram ser este alimento um ótimo substrato para a bactéria, que evidenciou um tempo de geração (g) médio de 45,9 min., possibilitando que se alcançassem populações potencialmente tóxicas após 12,80; 7,60 e 2,55 horas de armazenamento, para contaminações iniciais de 10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/g, respectivamente.

Em amostras de macarrões contaminadas por *Bacillus cereus*, os procedimentos de cocção e preparo para o consumo (20 min. de aquecimento à temperatura de ebulição da água) revelaram-se prejudiciais e letais à bactéria, reduzindo, portanto, o risco de toxinfecções decorrentes da ingestão deste alimento.

THE OCCURRENCE OF *Bacillus cereus* IN SOME COMMERCIAL
MACARONIS. THE STUDY OF THEIR MULTIPLICATION DURING
THE PROCESS AND PREPARATION FOR CONSUMPTION.

Author: IVANA CRISTINA SPOLIDÓRIO McKNIGHT

Adviser: Dr. MAURO FABER DE DREITAS LEITÃO

SUMMARY

The presence of *Bacillus cereus* was evaluated in commercial macaroni samples, made with and without eggs. The average contamination level was 70.9%, varying between 58.3% and 87.5% in samples with and without eggs, respectively.

The contaminant microflora was varied, with 52.1% of the samples showing populations between 10^1 and 10^2 CFU/g and 20.1% between 10^2 and 10^3 CFU/g.

The experimental studies related to the growing capacity of *Bacillus cereus* during industrial macaroni processing showed that there was no growth of the bacteria, independent of inocula levels (10^2 and 10^4 CFU/g) and of the use of eggs in the formulation. It was detected that water activity (A_w) levels below 0.92 and the limitation of *Bacillus cereus* growth were reached in the beginning of the dehydration process after 3 h drying. A moisture level va-

rying between 17.5 and 19.0% for macaroni without and with eggs, respectively, corresponded to this A_w level.

The experiments evaluating *Bacillus cereus* behavior during macaroni preparation for final consumption showed that this food was an adequate substrate for bacterial multiplication, with a generation time (g) of 45.9 min., permitting that potentially toxic populations were reached after 12.8, 7.6 and 2.55 h of storage, for initial contamination levels of 10^2 , 10^4 and 10^6 CFU/g, respectively.

However, in naturally contaminated macaroni samples the cooking procedures for final consumption (20 min. in boiling water) showed a lethal effect on *Bacillus cereus*, reducing the risks of food intoxication due to ingestion of this kind of food.

1. INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma bactéria incluída na família *Bacillaceae*, aeróbia, esporogênica, com habitat no solo e vegetais.

Esta bactéria tem sido relatada como responsável por casos e surtos de toxinfecções de origem alimentar, decorrentes do consumo de alimentos altamente contaminados pela mesma.

A patologia provocada pelo *Bacillus cereus* pode ser consequência da ingestão da toxina produzida no alimento, ou então devida à ingestão de células viáveis da bactéria. O processo patológico somente é evidenciado quando a bactéria tem a oportunidade de se multiplicar no alimento, atingindo números variáveis entre 10^6 - 10^7 /g (JOHNSON, 1984). Ele se manifesta sob duas formas distintas: a denominada síndrome diarréica e a síndrome emética. A sintomatologia da primeira é bastante semelhante à provocada por *Clostridium perfringens*, ao passo que a da emética é semelhante àquela causada por *Staphylococcus aureus*.

Na condição de bacilo esporogênico, tendo co-

no habitat principal o solo, *Bacillus cereus* é amplamente disseminado no ambiente natural, o que contribui para que seja encontrado em diversos tipos de alimentos.

Dados relativos à incidência da bactéria em alimentos são relativamente esparsos. MOSSEL et alii (1967) na Noruega, KIM & GOEPFERT (1970) e JOHNSON (1984) nos Estados Unidos relataram seu isolamento a partir de diferentes alimentos, entre eles, vegetais, carnes, produtos desidratados, arroz, produtos de panificação, sendo que as massas alimentícias revelaram elevados índices de contaminação.

Em nossas condições, LEITÃO et alii (1973/74), UBOLDI EIROA et alii (1975) e DELAZARI et alii (1978) constataram a ocorrência de *Bacillus cereus* em todas as amostras analisadas de produtos desidratados consumidos comercialmente no Brasil.

Bacillus cereus tem sido responsável por surtos de toxinfecções alimentares relatados em vários países como o Canadá, Holanda e Reino Unido, sendo que massas alimentícias como macarrão, pizza e produtos de panificação foram veículos de uma parcela significativa destes surtos (TODD, 1985 e BECKERS, 1985).

No Brasil, o consumo de massas alimentícias ganhou impulso graças à influência dos imigrantes europeus, principalmente os italianos. Atualmente elas podem ser con-

sideradas como um dos itens do hábito alimentar brasileiro, nas mais diversas regiões e em todas as classes sociais.

Estas considerações deixam evidente a importância do estudo das massas alimentícias como eventuais veículos de *Bacillus cereus* e seu envolvimento em casos ou surtos de toxinfecções de origem alimentar. Assim sendo, a presente pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos básicos:

- Avaliação dos níveis de contaminação por *Bacillus cereus* em massas alimentícias de diferentes tipos e produzidas comercialmente.

- Estudo experimental da capacidade de desenvolvimento de *Bacillus cereus* durante o processamento industrial de macarrões com e sem ovos.

- Avaliação da influência da atividade de água e temperatura das massas alimentícias na velocidade de multiplicação de *Bacillus cereus*.

- Estimativa do potencial de multiplicação de *Bacillus cereus* durante o preparo das massas alimentícias para o consumo final.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização Morfológica, Fisiológica e Bioquímica de *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* foi originalmente isolado e descrito por Frankland e Frankland em 1887, segundo GOEPFERT et alii. (1972). É uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e suas células vegetativas possuem um comprimento variando de 1,0 - 1,2 μm até 3,0 - 5,0 μm (GOEPFERT, 1976), sendo que o citoplasma possui grandes vacúolos e glóbulos de lipídeos (IVERS & POTTER, 1977).

É uma bactéria esporogênica, sendo seus esporos bastante resistentes ao calor, acreditando-se que sua destruição não seja logarítmica, sendo que aproximadamente um esporo em 10^7 a 10^8 possui uma alta resistência térmica (FRANKLIM, 1970). O mesmo autor relatou que os esporos de *Bacillus cereus* sobrevivem ao tratamento térmico a 64°C durante 30 minutos e nem os esporos e nem a toxina produzida são destruídos pelo congelamento e reaquecimento dos alimentos. Em alguns casos, o reaquecimento do alimento pode até ativar a germinação dos esporos e se o alimento for mantido a uma temperatura ótima, poderá ocorrer o desenvol-

vimento e a multiplicação da bactéria no mesmo (PARRY & GILBERT, 1980).

STEELE & STILER (1981) demonstraram que um esporo em 10^5 a 10^6 sobrevivia a um tratamento térmico de 135°C durante 4 horas. Também JOHNSON et alii (1982) observaram a resistência térmica dos esporos e obtiveram curvas de sobrevivência, tanto na forma linear como na não linear.

JOHNSON et alii (1983) relataram que os esporos do *Bacillus cereus* não dilatam o esporângio e podem ser centrais, elipsoidais ou paracentrais.

GILBERT et alii (1974) e PARRY & GILBERT (1980), calculando o " D_{95} " constataram resultados que iam de uma faixa de 2,5 a 36,2 minutos e 5,0 a 36,0 minutos, respectivamente. JOHNSON et alii (1982) encontraram valores " D_{95} " variando de 1,2 a 20,2 minutos para diferentes linhagens, sendo o valor " z " obtido de $9,2^{\circ}\text{C}$. Acredita-se, portanto, que o *Bacillus cereus* possui uma resistência térmica semelhante aos outros mesófilos da família *Bacillaceae* (JOHNSON, 1984).

A influência da temperatura na germinação dos esporos e subsequente crescimento do *Bacillus cereus* foi estudada por diversos autores. GILBERT et alii (1974) observaram que o crescimento do *Bacillus cereus* em arroz ocorria entre 15°C e 43°C , sendo a temperatura ótima ao redor de $30-37^{\circ}\text{C}$. MORTA e WOODBURN (1977) também avaliaram o crescimento do *Bacillus cereus* em relação à temperatura e constataram que

em arroz cozido enriquecido com proteínas de carne, galinha e ovos, alcançou-se uma população de 10^5 células de *Bacillus cereus*/g do alimento, a 23°C , em um intervalo de 7 a 20 horas e em 3 a 9 horas a 43°C . PARRY & GILBERT (1980) descreveram que a mais rápida germinação de *Bacillus cereus* ocorria a 30°C , ao passo que JOHNSON et alii (1983) observaram que o crescimento em caldo tripticase-soja ocorria entre 15 e 50°C , a temperatura ótima na faixa de $35-40^{\circ}\text{C}$ e a germinação ocorrendo entre $5-50^{\circ}\text{C}$, sendo mais rápida a 30°C .

Em relação ao efeito do pH no crescimento do *Bacillus cereus*, KIM & GILBERT (1971) relataram o valor de pH 4,35 como o mínimo permitindo o crescimento. Acredita-se que ele não se desenvolva em pH superior a 9,3 (RAEVUORI & GENEIGEORGIS, 1975).

A atividade de água mínima limitante para o crescimento é de 0,95 (BANWART, 1979).

No que diz respeito ao efeito de conservantes e antibióticos na inibição de *Bacillus cereus*, RAEVUORI & GENEIGEORGIS (1975) constatarem os seguintes resultados: inibição por ácido sórbico 0,20%, 0,40% de sorbato de potássio e antibióticos como aureomicina, terramicina, dihidroxi-streptomicina, bac-trim, oxitetraciclina, cloranfenicol e gentamicina; uma ligeira inibição foi observada com neomicina e ampicilina. De acordo com JOHNSON (1984), não foi observada a inibição de *Bacillus* em presença de penicilina e polimixina, constatando a produção de lactamase, capaz de degradar a penicilina.

Em relação às suas características bioquímicas, o *Bacillus cereus* é capaz de utilizar glicose, frutose e trealose, porém xilose, arabinose, galactose, sorbose, sorbitol, manitol e dulcitol não são utilizados, sendo que alguns açúcares, como a sacarose, maltose, manose e lactose são utilizados por algumas cepas, mas não por todos os membros da espécie (KIM & GOEPFERT, 1971).

JOHNSON (1984) observou que o *Bacillus cereus* não fermenta o manitol e tem um sistema fosfolipase (lecitinase) muito ativo, sendo estas características frequentemente utilizadas em meios seletivos e diferenciais para o isolamento do organismo.

A enzima urease é produzida por poucas cepas, porém a produção de acetil-metil-carbinol é característica da maioria das cepas de *Bacillus cereus* (SEENAPA & KIMPTON, 1981). O nitrato é reduzido a nitrito, porém cepas de nitrato redutase negativas têm sido isoladas. Uma característica importante é que a maioria das cepas utiliza o amido, porém a existência de mutantes que não o fazem tem sido descrita.

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

2.2. Patologia de *Bacillus cereus*

GOEPFERT (1976) menciona que um dos mais importantes aspectos bioquímicos do *Bacillus cereus* é a capacidade de síntese e excreção de certas toxinas, sendo que no mínimo três importantes toxinas extracelulares são produzidas.

A produção de lecitinase por *Bacillus cereus* foi observada por IVERS & POTTER (1977), que constataram que filtrados de cultura de *Bacillus cereus* possuíam atividades hemolítica, dermonecrótica e letal (para camundongos). Esta lecitinase tem um peso molecular de 20.000 dáltons e seu ponto isoelétrico é de 8,0, requerendo o íon Zn para sua atividade enzimática. Esta enzima é formada e secretada pelas células no final da fase exponencial de crescimento (SPIRA & SILVERMAN, 1979). Durante esta fase, o *Bacillus cereus* elabora produtos extracelulares, como proteases, B-lactamases, antibióticos peptídicos, fosfolipases, hemolisinas e toxina letal para camundongo, sendo que a toxina letal e a fosfolipase são entidades separadas e podem ser diferenciadas por propriedades físicas (GILBERT, 1979). Acredita-se que a hemolisina e a fosfolipase também podem ser diferenciadas com base na estabilidade térmica (SHARMA & DOGRA, 1983).

Existem evidências de que mais de uma enzima fosfolipase é produzida pelo *Bacillus cereus*, de acordo com JOHNSON (1984), que relatou a separação de duas enzimas em

colunas de DEAE-celulose. Estas enzimas diferenciam-se em relação à digestão da tripsina, estabilidade térmica e especificidade de substrato.

A hemolisina produzida pelo *Bacillus cereus* é associada à virulência, acreditando-se que seja semelhante à produzida pelo *Clostridium perfringens* e podendo ser separada em dois componentes distintos: uma fração hemolítica e outra não-hemolítica; a primeira foi considerada como de natureza protéica, ao passo que a última é uma glicoproteína (KAMAT, 1987).

O *Bacillus cereus* produz também uma enterotoxina, a qual tem características antigênicas, é sensível à tripsina, instável a extremos de temperatura e pH, sendo mais estável a pH 5,0-10,0 e com características termolábeis (BONVENTRE & JOHNSON, 1970). SPIRA & GOEPFERT (1972) observaram que esta enterotoxina causava a morte de camundongos, quando injetada de forma intravenosa, induzindo o acúmulo de fluidos, alteração na permeabilidade vascular e necrose na pele de cobaias.

Existe uma outra enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*, sendo esta mais estável a extremos de pH e temperatura (GOEPFERT et alii, 1973).

Estas enterotoxinas são responsáveis pela patologia de *Bacillus cereus* e tanto podem ser sintetizadas no intestino do hospedeiro, como também há evidências de que

sejam pré-elaborados no alimento contaminado (GORINA et alii, 1975).

A patogenia do *Bacillus cereus* é caracterizada por duas síndromes distintas, uma diarréica e outra eméti-ca, sendo que os sintomas a elas associados são provoca-dos por duas toxinas distintas (ICMSF, 1978).

A síndrome diarréica é causada por toxina elabo-rada no interior do hospedeiro: portanto, é necessária a presença de um número elevado de células no alimento e a ingestão de células viáveis (DELAZARI et alii, 1978).

Segundo GILBERT (1979), o primeiro surto relata-do envolvendo a enterotoxina diarréica foi descrito por Hauge em 1950, na Noruega, envolvendo aproximadamente 600 pessoas. Ocorreu em um hospital, atingindo tanto pacientes como funcionários que consumiram num jantar carne com legu-mes e, de sobremesa, pudim de chocolate com creme de bauni-lha. O creme de baunilha foi preparado no dia anterior ao consumo e foi mantido à temperatura ambiente. Os sintomas começaram a ocorrer entre 10 e 12 horas após o consumo dos alimentos e consistiram em dores abdominais, diarréia aquo-sa, espasmos, náuseas com vômitos esporádicos e febre. Os sintomas não duraram mais que 12 horas. O creme de baunilha, que fora preparado no dia anterior, foi o responsável pelo surto. As amostras analisadas deste creme apresentaram de $2,5 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^8$ *Bacillus cereus*/ml. No amido de milho utilizado na elaboração do creme, foi observado um número

elevado de esporos de *Bacillus cereus*, cerca de 10^4 /g, não se constatando nenhuma alteração nas características organolépticas do alimento. A partir de 1950, vários outros surtos envolvendo o *Bacillus cereus* foram reportados em outros países, como Dinamarca, Polônia, Hungria etc. (JOHNSON, 1984).

Vários termos têm sido empregados para caracterizar a toxina diarréica, tais como: agente diarréico, fator de acúmulo de fluidos, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, todos estes referindo-se a uma proteína com peso molecular de 50.000 dáltons e ponto isoelétrico igual a 4,9 (BONVENTRE & JOHNSON, 1970). A produção ocorre em pH de 6,0 a 8,5, sendo o ótimo na faixa de 7,0 a 7,5 e a toxicidade é perdida depois que é completada a fase exponencial (SPIRA & GOEPFERT, 1972). Segundo GOEPFERT et alii (1973) a lise da célula não é requerida para a liberação da toxina, sendo ela sensível à tripsina e pronase.

A toxina pode ser produzida entre 18° a 43°C, sendo inativada a 56°C durante 5 minutos (IVERS & POTTER, 1977). Acredita-se que seja composta por dois componentes, havendo a necessidade da presença de glicose para a sua formação (SPIRA & SILVERMAN, 1979).

Vários métodos têm sido utilizados para a sua detecção, sendo mais empregado o da alça ligada de coelho, onde filtrados de cultura são injetados no intestino do

coelho, sendo observado o acúmulo de fluido (JOHNSON et alii, 1982). Os mesmos autores revelam que o teste de permeabilidade vascular também é utilizado na caracterização da toxina, sendo executado pela injeção subcutânea de filtrado de cultura na pele de cobaias, seguido de aplicação do corante "Evans Blue"; quando a reação é positiva, pode-se observar manchas cinzas ou azuis na pele das cobaias inoculadas.

SHARMA & DOGRA (1983) constataram que a toxina diarréica estimula o sistema adenil-ciclase e pode contribuir para o acúmulo de fluidos no intestino.

A outra síndrome característica do *Bacillus cereus* é a denominada emética, sendo devida à produção de uma toxina no próprio alimento contaminado pelo *Bacillus cereus* (BONVENTRE & JOHNSON, 1970).

Principalmente no Reino Unido têm sido relatados surtos relacionados com a síndrome emética, particularmente nos meses de verão (KIM & GILBERT, 1971).

A toxina emética é resistente à tripsina e a pepsina, sendo extraída com clorofórmio, acreditando-se que tenha característica monopolar (SPIRA & GOEPFERT, 1972).

A maior parte dos surtos envolvendo a toxina emética foi ocasionada pelo consumo de arroz cozido, preparado segundo a culinária chinesa, sendo o *Bacillus cereus* isolado em números variáveis de 10^3 a 10^9 /g de alimen-

to, com média de 10^7 /g e números de 10^9 /g nas fezes dos pacientes (GILBERT, 1979). Nestes restaurantes, o arroz preparado é mantido à temperatura ambiente e quando necessário é aquecido ou frito rapidamente (MORITA & WOODBURN, 1977). Os esporos de *Bacillus cereus* podem sobreviver à fervura e à fritura se estas forem relativamente rápidas (PARRY & GILBERT, 1980).

Os sintomas mais frequentes são náuseas e vômitos, ocorrendo de 1 a 5 horas após a ingestão do alimento contaminado, não se constatando febre e a recuperação sendo mais rápida (WYATT & GUY, 1981).

A toxina emética, produzida no alimento, possui características diferentes da diarreica (SHARMA & DOGRA, 1983).

Ela tem peso molecular de 1.000 dâltons, é bastante estável a pH na faixa de 2 a 11, é estável a 126°C durante 90 minutos e a 4°C durante 2 meses (JOHNSON et alii, 1983).

A síndrome causada pela toxina emética é muito semelhante à intoxicação estafilocócica (*Staphylococcus aureus*), tanto pela sintomatologia como pelo período de incubação (KAUR, 1986).

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

Tabela 1. Características de toxinfecção por *Bacillus cereus*

	Síndrome diarréica	Síndrome emética
Período de incubação (h)	8 - 16	1 - 16
Duração (h)	12 - 24	12 - 24
Diarréia	muito comum	pouco comum
Vômitos	ocasionais	ocasionais
Dores abdominais	presentes	presentes
Alimentos responsáveis	carne, sopa, pudim, verdura, molho	arroz cozido ou frito, de restaurante chinês

Fonte: JOHNSON (1984).

2.3. Ocorrência e Epidemiologia

JOHNSON (1984) mencionou surtos de toxinfecção provocados por *Bacillus cereus*, procurando relacioná-los com o tipo de alimento e sintomatologia, conforme Tabela 2.

MOSSEL et alii (1967), na Noruega, constataram a ocorrência de *Bacillus cereus* principalmente em linguças, pratos com arroz, pudins e sopas. KIM & GOEPFERT (1971), nos Estados Unidos, isolaram *Bacillus cereus* de alimentos desidratados, como batatas, leite em pó, condimentos, temperos e molho de espaguete.

Tabela 2. Toxinfecções provocadas por *Bacillus cereus*, relacionadas com tipo de alimento e sintomatologia

Síndrome	Alimento	Sintomas	Período de incubação (h)	País de ocorrência
Emética	Arroz frito	V	2	Holanda
	Arroz cozido	V	0,5 - 4	Finlândia
	Lanches prontos	V	0,5 - 3	Japão
	Macarrão	N, C, V	1 - 3	?
	Pó para sorvetes	N, V	6	Canadá
Intermediária ou não-definida	Comida chinesa	N, V, D	2	Canadá
	Leite em pó maltado	N, V, D	6	Canadá
	Farinha de peixe	N, V, D	9 - 13	Canadá
	Atum em lata	N, V, D	6	Canadá
Diarréica	Creme de baunilha	N, V, D	12 - 13	Noruega
	Batatas, feijão, verdura	C, D	5 - 14	Reino Unido
	Broto de vegetais	C, D	6 - 15	Estados Unidos
	Pastelão de galinha	N, D	14	Estados Unidos

Fonte: JOHNSON (1984)

V = Vômito

N = Náusea

D = Diarréia

C = Cólicas

LEITÃO et alii (1973/74), pesquisando a microbiologia de alimentos desidratados produzidos comercialmente no Brasil, constataram a ocorrência de *Bacillus cereus* em todos os alimentos isolados, com uma incidência média de 26,9%.

UBOLDI EIROA et alii (1975), fazendo a caracterização microbiológica de farinhas e amidos, constataram que o *Bacillus cereus* foi o enteropatôgeno que ocorreu com maior frequência como contaminante, sendo que em alguns produtos a contagem média foi acima de 10^2 /g e a percentagem de contaminação situava-se entre 6,6% (para farinha de fubá) e 45% (para farinha de mandioca).

ROGERS (1978), nos Estados Unidos, caracterizou como *Bacillus cereus* 27,3% dos bacilos isolados a partir de farinha de trigo.

DELAZARI et alii (1978) analisando um total de 805 amostras de alimentos desidratados, produzidos no Brasil, como farinhas, sopas, leites e misturas enriquecidas à base de soja, constataram uma média de 20,4% de amostras contaminadas por *Bacillus cereus* em níveis variando de 11,9% (nas misturas enriquecidas) a 90% (na farinha de milho). Ainda DELAZARI et alii (1980), pesquisando a microbiologia de produtos institucionais (Gestal e produtos destinados à merenda escolar brasileira), constataram que dentre as bactérias potencialmente patogênicas, o *Bacillus cereus* foi a encontrada com maior incidência nas amostras analisadas.

Alguns dados sobre a presença de *Bacillus cereus* em alimentos no Brasil estão contidos na Tabela 3, segundo FURLANETTO (1982).

Tabela 3. Alguns dados sobre a presença de *Bacillus cereus* em alimentos no Brasil

Autor	Localidade	Alimento	Anostras examinadas	Positivas Número	Positivas %	Contagem/g Mínima Máxima
Delazari e Cols (1980)	Campinas	Merenda escolar - que necessita cocção - que não necessita cocção	35	34	97,0	10^2 10^3
			36	25	96,0	10^2 10^3
Furlanetto e Cols (1978)	São Paulo	Queijo fresco	30	10	33,3	10^2 3×10^3
Eirola e Cols (1980)	Campinas	Farinhas e amido	150	97	64,6	10^2 10^3
Leitão e Cols (1973/74)	Campinas	Produtos desidratados	359	107	29,8	10^2 10^3
Delazari e Cols (1978)	Campinas	Produtos desidratados	805	164	20,4	10^2 10^5
Cerqueira Campos (1980)	São Paulo	Carne moída	50	9	18,0	10^2 10^5

Fonte: FURLANETTO (1982).

Bacillus cereus também tem sido isolado com bastante frequência a partir de produtos de panificação (JOHNSON, 1984). RABINOVITCH et alii (1985) isolaram *Bacillus cereus* dos mais diversos tipos de alimentos, como frutas e hortaliças, carnes e produtos cárneos, leite e produtos de laticínios, cereais e derivados, condimentos, molhos preparados, produtos de confeitaria e produtos de panificação. KAUR (1986), na Inglaterra, examinando a incidência de *Bacillus cereus* em amostras de farinha de trigo coletadas nos anos de 1978 a 1981, constatou índices de contaminação oscilando de 16 a 33% e valores médios de 23,5%.

TODD (1985) relatando dados epidemiológicos do Canadá observou que o *Bacillus cereus* foi o terceiro agente patogênico responsável pelos surtos, num total de 10 ocorrências.

Na Holanda, BECKERS (1985) constatou que em 1979, o *Bacillus cereus* foi a quarta bactéria responsável por surtos de toxinfecção alimentar. No ano de 1980, o mesmo autor (BECKERS, 1985) relatou que naquele país ocorreram cerca de 53 incidentes devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos. O *Bacillus cereus* foi o responsável pela maioria dos incidentes (17), seguido por *Salmonella* (15), *Clostridium perfringens* (8), *Staphylococcus aureus* (6), *Campylobacter jejuni* (4), *Yersinia enterocolitica* (1), *Escherichia coli* (1) e *Vibrio* (1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Avaliação da Ocorrência de *Bacillus cereus* em Macarrões Produzidos Comercialmente

3.1.1. Material

Foram analisadas amostras de macarrões comerciais de quatro marcas diversas, sendo duas delas de massas com ovos e duas sem adição dos mesmos. As amostras de massas com ovos eram procedentes de indústrias de grande porte, ao passo que as sem ovos procediam de pequenas indústrias.

A partir de cada marca foi examinado um total de doze amostras, coletadas quinzenalmente e sempre em número de duas amostras por marca. Nestas condições, a cada quinze dias eram coletadas oito amostras diversas e, após três meses de estudo, (6 épocas de amostragem), um total de quarenta e oito amostras foram efetivamente examinadas.

3.1.2. Isolamento e Identificação de *Bacillus cereus*

Os exames dos macarrões foram efetuados com a separação de porções de 25 g das amostras, que foram imediatamente homogeneizados em liquidificador, com adição de 225 ml de solução salina peptonada (INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF).

A partir da diluição inicial (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais sucessivas no mesmo diluente, seguidas de inoculação superficial de placas de Petri, contendo o meio vermelho fenol - gema de ovo-manitol-polimixina, segundo Mossel (SPECK, 1978). Na diluição 10^{-1} foram inoculadas superficialmente três placas com porções de 0,3 ml e uma placa com 0,1 ml, ao passo que nas demais diluições foi feita apenas a inoculação de 0,1 ml/placa. O inóculo adicionado foi espalhado com auxílio de alça de Drigalski, seguido de incubação das placas a 30°C durante 48 horas (ICMSF, 1978).

Após a incubação, as placas preparadas nas várias diluições foram submetidas à contagem presuntiva de *Bacillus cereus*, que são caracterizados por formarem colônias opacas, planas, sem brilho, regulares ou ligeiramente irregulares, mas **sem** crescimento rizóide, circundadas por uma zona de precipitação opaca em virtude da produção de lecitinase e de coloração rósea, devido à reação alcalina pela ausência de fermentação do manitol (ICMSF, 1978). Em continuação, um número representativo destas colônias foi isolado em tubos de ágar nutriente inclinado, seguido de incubação a 30°C durante 24 horas. A seguir, estas colônias foram submetidas aos seguintes exames morfológicos e bioquímicos, visando confirmar a presença de *Bacillus cereus* (ICMSF, 1978): coloração de Gram, produção de esporos, motilidade (em gota pendente ou meio semi-sólido), cresci-

mento rizóide, fermentação anaeróbia de glicose, redução de nitrato, reação de Voges Proskauer e decomposição da tirosina. As culturas caracterizadas como bastonetes Gram-positivos, esporogênicos, móveis, sem crescimento rizóide, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido, reduzindo o nitrato a nitrito, reação de Voges-Proskauer positiva e decompondo a tirosina, foram confirmadas como típicas de *Bacillus cereus* (SPECK, 1976; ICMSF, 1978).

Com base na percentagem de culturas isoladas confirmadas como *Bacillus cereus* e nas contagens presuntivas nas diversas placas foi calculado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Bacillus cereus* por grama das amostras analisadas.

3.2. Avaliação da Multiplicação de *Bacillus cereus* Durante o Preparo Industrial de Macarrão

3.2.1. Materiais

O estudo foi conduzido mediante a inoculação experimental de suspensão de esporos de *Bacillus cereus* em massas alimentícias, acompanhando-se a evolução numérica desta bactéria ao longo do processo. A suspensão padrão foi preparada pelo cultivo de cepa de *Bacillus cereus* da coleção do ITAL em tubos contendo ágar nutriente inclinado; após incubação a 30°C durante 48 a 72 horas, foram adicionados 5 ml

de água destilada estéril a cada tubo, sendo o crescimento removido com auxílio de alça, preparando-se, assim, uma suspensão de esporos em água destilada estéril, contida em frasco Erlenmeyer com pérolas de vidro. Esta suspensão foi submetida à contagem do número de esporos (em placas e em câmara de Petroff-Houser) sendo que, antes da inoculação nas massas, ela recebia um choque térmico a 80°C durante 15 minutos, visando destruir as células vegetativas presentes e ativar os esporos para a germinação. Desta forma, foram preparadas suspensões de esporos com título final de 10^8 esporos/ml.

Os estudos foram conduzidos com 2 níveis de inoculação, a saber, 10^2 e 10^4 esporos/g de massa. Cabe acrescentar que a suspensão de esporos foi inoculada na água utilizada no preparo das massas, seguida de homogeneização intensa com a farinha, de forma a assegurar uma distribuição mais uniforme em todo o macarrão produzido.

Foi estudado o comportamento do *Bacillus cereus* em macarrões com e sem ovos, utilizando-se a planta piloto de massas alimentícias do ITAL no preparo dos mesmos e obedecendo ao fluxograma básico de processo que consta da Figura 1.

Figura 1. Fluxograma básico de processamento do macarrão com e sem ovos.

3.2.2. Procedimento Experimental

Foi acompanhada a evolução da população de *Bacillus cereus* inoculado na massa, mediante contagem de colônias nas seguintes fases do processo:

- Massa preparada, com amostragem de porções de 25 g na prensa extrusora.
- Macarrão imediatamente após trefilagem, com coleta de porções de 25 g nas peneiras de secagem.
- Macarrão após 3 horas de secagem (25 g de amostra).
- Macarrão após 6 horas de secagem (25 g de amostra).
- Produto final, após um total de 20 horas de secagem (25 g de amostra).

Todas as contagens foram calculadas em termos de matéria seca, corrigindo-se portanto os diferentes teores de umidade presentes nas várias amostras coletadas.

A contagem de *Bacillus cereus* foi efetuada em ágar vermelho fenol-gema de ovo-manitol-polimixina, com procedimento idêntico ao descrito em 3.1.2.

Ao lado dos ensaios com inoculação de suspensões de esporos, foram feitos, inicialmente, processamentos controle (sem inoculação), tanto para o macarrão sem ovos como naquele com ovos. Além disso, todos os ensaios envol-

vendo variações nos níveis de inoculação e adição ou não de ovos à massa foram feitos com duas repetições, espaçadas de aproximadamente 60 dias.

Paralelamente às contagens de *Bacillus cereus* e nas mesmas amostras coletadas para os exames microbiológicos, foram feitas determinações de unidade absoluta, segundo metodologia preconizada pela AACC (1973) e de atividade de água (Aa), com utilização do equipamento NOVASINA EEJA-3.

3.3. Avaliação da Multiplicação de *Bacillus cereus* Durante o Preparo do Macarrão para Consumo e Armazenamento do Alimento Já Preparado

A partir de amostras de macarrões, contendo níveis conhecidos de contaminação por *Bacillus cereus*, foi avaliado o potencial de multiplicação da bactéria no produto já preparado para o consumo. As amostras preparadas foram armazenadas a 30°C por períodos máximos de 10 horas, simulando-se, assim, condições possíveis de ocorrer em restaurantes industriais operando sob práticas higiênico-sanitárias deficientes.

Durante o período de armazenamento das amostras avaliou-se não apenas a evolução das contagens mas também procurou-se determinar a velocidade de multiplicação

de *Bacillus cereus* no substrato, calculando-se o tempo de geração (g) da bactéria, mediante as seguintes equações (STANIER et alii, 1976):

$$\mu = 2,303 \left(\frac{\log N - \log N_0}{t} \right) \quad \text{e} \quad \mu = \frac{0,693}{g}, \text{ em que}$$

μ = razão de crescimento (h^{-1})

N_0 = população inicial da bactéria

N = população após tempo t

t = período de incubação (minutos)

g = tempo de geração (h)

Com estes objetivos em consideração, foram realizados os seguintes experimentos, sempre com 2 repetições:

3.3.1. Cocção e preparo de amostras de macarrão contendo níveis conhecidos de contaminação ($1,0 \cdot 10^3$ esporos/g, inoculados na massa), seguidas de armazenamento a 30°C , com contagem nos tempos 0,5 e 10 horas de incubação.

Para tanto, foram separadas porções de 200 g de macarrão, seguidas de adição de 1.800 ml de água, com posterior cocção à temperatura de ebulição, durante 20 minutos. Posteriormente, o excesso de água foi drenado, o macarrão foi acondicionado em bandejas de vidro (Pirex), sendo as mesmas recobertas com filme plástico para evitar desidratação, seguidas de armazenamento a 30°C durante 10 h.

As contagens de *Bacillus cereus* foram feitas em ágar vermelho fenol-gema de ovo-manitol-polimixina, com procedimento idêntico ao descrito anteriormente em 3.1.2.

3.3.2. Inicialmente, cocção de amostras de macarrão, nas quantidades, proporções e procedimento de preparo idênticos aos descritos em 3.3.1. A seguir, no produto já pronto para o consumo e resfriado, foi feita a inoculação de esporos de *Bacillus cereus*, na proporção aproximada de 10^3 esporos/g, com posterior distribuição do macarrão em bandejas de vidro e armazenamento a 30°C durante 10 horas.

As contagens de *Bacillus cereus* foram efetuadas nos intervalos de 0,5 e 10 horas de incubação, conforme relatado em 3.1.2.

3.3.3. Neste experimento, foram inoculadas inicialmente porções de 200 g de macarrão com uma suspensão de esporos de *Bacillus cereus*, de forma a obter-se um nível de contaminação de aproximadamente 10^3 esporos/g. A seguir, o macarrão inoculado foi homogeneizado com auxílio de bastão de vidro, seguido de secagem à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em continuação, o produto inoculado foi submetido à cocção e preparo, com procedimento idêntico ao descrito em 3.3.1.

O produto final foi acondicionado em bandejas de vidro, seguido de armazenamento a 30°C durante 10 horas e contagem de esporos de *Bacillus cereus* conforme método citado em 3.1.2.

3.3.4. Neste experimento, o objetivo foi o de se avaliar a presença de esporos de *Bacillus cereus* na água drenada após a cocção e preparo do macarrão. Os procedimentos de inoculação do macarrão e cocção foram idênticos aos descritos em 3.3.3., exceto que a pesquisa e contagem de esporos na água procuraram avaliar o efeito físico de remoção dos esporos presentes no macarrão pelo contato com a água e agitação durante o processo de cocção.

Nestas condições, foram feitas contagens de esporos na água imediatamente após o término da cocção (20 min. em água à ebulição), com inoculação de 3 porções de 0,3 ml e 1 de 1,0 ml da amostra original, bem como 0,1 ml da diluição 10^{-1} da amostra, em placas contendo ágar vermelho fenol-gema de ovo-manitol-polimixina, seguidas de incubação a 30°C durante 48 horas, conforme descrito em 3.1.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da Ocorrência de *Bacillus cereus* em Macarrões Produzidos Comercialmente

Os resultados obtidos no levantamento da presença de *Bacillus cereus* em amostras de macarrões comerciais constam da Tabela 4.

Tabela 4. Incidência de *Bacillus cereus* em macarrões produzidos comercialmente

Tipo macarrão	Marcas	Nº de amostras examinadas	Amostras contaminadas com <i>Bacillus cereus</i>	
			nº	%
Com ovos	I	12	6	50,0
	II	12	8	66,7
Sem ovos	I	12	9	75,0
	II	12	12	100,0
Total	4	48	35	72,9

De início, pôde-se observar que a percentagem média de contaminação dos macarrões produzidos comercial-

mente foi maior nas amostras sem ovos, sendo que a II evidenciou a presença da bactéria em todas as amostras analisadas. Já nas amostras com ovos, a percentagem de contaminação foi menor, alcançando valores médios de 58,4%.

Cabe destacar que as amostras de macarrões com ovos eram procedentes de firmas de grande porte, reconhecidas pela qualidade de seus produtos, o que não ocorria nas amostras de macarrões sem ovos. Assim sendo, é possível que as variações nas condições higiênico-sanitárias de produção e o rigor no controle de qualidade das matérias-primas e ingredientes possam explicar parcialmente estas variações nos índices de contaminação.

Segundo LEITÃO (1987), as fases iniciais de processamento de massas alimentícias, onde o líquido (água + ovos) é adicionado à farinha, são particularmente críticas, uma vez que as condições de umidade e temperatura são favoráveis para a multiplicação das bactérias deterioradoras e patogênicas, incluindo o *Bacillus cereus*.

Dentre as matérias-primas utilizadas na elaboração das massas alimentícias, acredita-se que a farinha de trigo seja um dos principais veículos de *Bacillus cereus*. UBOLDI EIROA et alii (1975), fazendo a caracterização microbiológica de amostras de farinhas, constataram que o *Bacillus cereus* foi o enteropatógeno que ocorreu com maior frequência como contaminante, com uma percentagem de conta-

minação ao redor de 64,6%. Na Inglaterra, KAUR (1986), analisando a incidência de *Bacillus cereus* em amostras de farinha de trigo coletadas nos anos de 1978 a 1981, constatou índices de contaminação oscilando de 16 a 33%, com valores médios de 23,5%.

Na Tabela 5 pode-se observar a variação da microbiota de *Bacillus cereus* nas amostras de macarrão examinadas.

Os padrões microbiológicos fixados pela portaria 001 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL, de 27 de janeiro de 1987 estabelecem que para massas alimentícias secas, com ou sem ovos e sem recheio, é tolerável a contaminação máxima de *Bacillus cereus* de 10^3 UFC/g. Comparando este limite com os resultados constantes da Tabela 5, observa-se que 100% das amostras analisadas satisfazem à legislação vigente.

RABINOVITCH et alii (1985), numa avaliação da incidência e da toxicidade de cepas de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados no Rio de Janeiro, constataram a presença desta bactéria em massas alimentícias.

De acordo com LEITÃO (1987), os níveis de contaminação das massas alimentícias são extremamente variáveis, com índices relativamente elevados no que concerne

Tabela 5. Distribuição da microbiota de *Bacillus cereus* em amostras de macarrão comercial

Tipo de amostra	Marca comercial	Nº de amostras analisadas	Distribuição da microbiota de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)					
			<10 ¹		10 ¹		10 ²	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
Com ovos	I	12	6	50,0	4	33,3	2	16,7
	II	12	4	33,3	7	58,3	1	8,3
Sem ovos	I	12	3	25,0	7	58,3	2	16,7
	II	12	0	-	7	58,3	5	41,7
<hr/>								
Total	4	48	13	27,1	25	52,1	10	20,8

aos patógenos e deterioradores. Nos Estados Unidos da América, em levantamentos da contaminação microbiana em massas alimentícias secas, constatou-se a presença de bactérias totais em níveis variando de 10^3 a 7.10^7 UFC/g, sendo que aproximadamente 50% das amostras analisadas evidenciavam contaminação em níveis superiores a 10^5 UFC/g.

Em face à escassez de dados relativos à incidência do *Bacillus cereus* em massas alimentícias, torna-se difícil uma melhor comparação dos resultados obtidos na presente pesquisa com a casuística de outros pesquisadores.

Durante a primeira fase do projeto, foram isoladas 199 cepas, caracterizadas presuntivamente como *Bacillus cereus*. Estas cepas foram submetidas a diferentes testes bioquímicos para a confirmação da espécie, sendo que os resultados obtidos constam da Tabela 6.

Tabela 6. Reações bioquímicas observadas em 199 cepas caracterizadas presuntivamente como *Bacillus cereus*

Teste bioquímico	Reações			
	Positivas		Negativas	
	N	%	N	%
Fermentação anaeróbia da glicose	191	95,9	8	4,1
Redução do nitrato a nitrito	187	93,9	12	6,1
Teste de Voges-Proskauer	179	89,9	20	10,1
Decomposição da tirosina	162	81,4	37	18,6

A comparação dos dados relatados na Tabela 6 com as observações de outros autores revela resultados bastante semelhantes. Assim, GORDON (1977), CLAUS & BERKELEY (1984) e também GOEPFERT (1976), mencionam que de 90 a 100% das cepas de *Bacillus cereus* pesquisadas revelaram resultados positivos nos testes de redução de nitrato, Voges-Proskauer, fermentação anaeróbia da glicose e decomposição da tirosina. Já MURO (1988), estudando cepas de *Bacillus cereus* isoladas a partir de alimentos, constatou 100% de positividade nos testes acima mencionados.

Estas considerações sugerem, portanto, que os critérios de identificação e os valores qualitativos e quantitativos relatados na presente pesquisa refletem, efetivamente, a ocorrência e distribuição da microbiota de *Bacillus cereus* nas massas alimentícias analisadas.

4.2. Avaliação da Multiplicação de *Bacillus cereus* Durante o Preparo Industrial do Macarrão

Os resultados contidos nas Tabelas 7 e 8 explicitam a variação observada na microbiota de *Bacillus cereus*, inoculado experimentalmente na massa, durante as várias fases do processamento até a obtenção do produto final.

Tabela 7. Microbiota de *Bacillus cereus*, inoculado experimentalmente em macarrão sem ovos, nas várias etapas do processamento industrial (contagens calculadas na matéria seca).

Tratamento	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g) nas várias etapas do processamento									
	Massa preparada		Macarrão após trefilagem		Macarrão em início de secagem (3 horas)		Macarrão em secagem intermediária (6 horas)		Produto final	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle	< 10	< 10	< 10	$6,1.10^1$	< 10	$3,6.10^1$	< 10	< 10	< 10	< 10
Inoculação de 10^2 UFC/g	$8,1.10^1$	$1,0.10^2$	$2,8.10^1$	$1,8.10^2$	< 10	$7,2.10^1$	$1,1.10^1$	$4,3.10^1$	< 10	$4,4.10^1$
Inoculação de 10^4 UFC/g	$2,6.10^3$	$1,8.10^3$	$1,1.10^3$	$2,1.10^4$	$4,8.10^2$	$6,4.10^3$	< 10^2	$1,4.10^3$	< 10^2	$1,6.10^3$

Tabela 8. Microbiota de *Bacillus cereus*, inoculado experimentalmente em macarrão com ovos, nas várias etapas do processamento industrial (contagens calculadas na matéria seca).

Tratamento	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g) nas várias etapas do processamento							
	Massa preparada		Macarrão após trefilagem		Macarrão em início de secagem (3 horas)		Macarrão em secagem intermediária (6 horas)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle	<10	$1,4 \cdot 10^1$	< 10	$2,7 \cdot 10^1$	< 10	$8,2 \cdot 10^1$	< 10	< 10
Inoculação de 10^2 UFC/g	$7,3 \cdot 10^1$	$7,0 \cdot 10^1$	< 10	$1,4 \cdot 10^2$	< 10	$4,7 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$
Inoculação de 10^4 UFC/g	$3,3 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^2$	$5,4 \cdot 10^3$	< 10^2	$5,4 \cdot 10^3$	< 10^2	$2,7 \cdot 10^3$
							< 10^2	$1,5 \cdot 10^3$

De início é importante ressaltar que os tratamentos controle (macarrão não inoculado), tanto no produto sem ovos como naquele com adição de ovos revelaram a virtual ausência da contaminação por *Bacillus cereus*. Este dado é fundamental para a correta interpretação dos resultados obtidos nos tratamentos com inoculação, uma vez que em face ao processamento haver sido executado em escala semi-industrial, tornou-se virtualmente inviável um controle absoluto das condições higiênico-sanitárias de produção.

Este fato, acrescido da contaminação usual de farinhas e outros ingredientes, bem como de equipamentos, por esporos de *Bacillus cereus*, torna imperiosa a execução de tratamentos controle ao lado daqueles com inoculação, sob pena dos resultados finais obtidos serem erroneamente analisados e interpretados.

Com relação aos tratamentos com inoculações de suspensões de esporos de *Bacillus cereus*, os resultados experimentais demonstraram claramente a ausência de multiplicação da bactéria, independente dos níveis de contaminação inicial e da presença ou ausência de ovos na formulação dos macarrões.

Observou-se, inclusive, que mesmo nas fases iniciais do processo, nas etapas de preparo da massa e imediatamente após a trefilagem, em que as condições de temperatura e atividade de água ainda eram favoráveis, a micro-

biota de *Bacillus cereus* permaneceu estacionária ou com a-
crêscimo muito reduzido, conforme constatado em alguns dos
ensaios.

Duas hipóteses poderiam ser aventadas para
explicar tais observações:

- Algumas etapas do processo de secagem do
macarrão, particularmente na fase inicial, em que a ativi-
dade de água do produto é mais elevada, são conduzidas em
temperaturas relativamente altas, na faixa de 45° a 48°C.
Conforme relatado por GOEPFERT et alii (1972), a temperatu-
ra ótima para a multiplicação de *Bacillus cereus* oscila en-
tre 30 e 35°C, com máximo na faixa de 35 a 45°C. Nestas
condições, seria admissível supor uma multiplicação mui-
to lenta ou mesmo sua ausência durante as etapas iniciais
de secagem.

- As determinações de umidade absoluta e de
atividade de água, efetuadas ao longo do processamento in-
dustrial revelaram que níveis de atividade de água permi-
tindo a multiplicação de *Bacillus cereus* eram mantidos ape-
nas nas etapas iniciais do processo (preparo da massa e
macarrão imediatamente após trefilagem), com valores de Aa
oscilando entre 0,95 e 0,99. Por outro lado, logo após o
início da secagem, os valores de Aa eram iguais ou inferio-
res a 0,90. De acordo com o ICMSF (1980) valores de Aa limi-
tantes para a multiplicação de *Bacillus cereus* variam en-

tre 0,92 a 0,95, dependendo da cepa da bactéria e das condições de substrato e cultivo.

Os dados contidos nas Tabelas 9 e 10 permitem melhor avaliar as variações dos valores de Aa e umidade absoluta em macarrões sem e com ovos, ao longo do processamento industrial.

Tabela 9. Variação nos teores de umidade e atividade de água (Aa) em macarrão sem ovos, nas várias etapas do processamento industrial

Etapa do Processamento	Determinações			
	Umidade absoluta (%)		Atividade de água (Aa)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Massa preparada	38,18	32,09	0,99	0,96
Macarrão após trefilagem	29,40	26,45	0,99	0,95
Macarrão em secagem inicial (3 horas)	15,87	16,61	0,89	0,90
Macarrão em secagem intermediária (6 horas)	8,54	8,44	0,47	0,50
Produto final	8,54	8,44	0,47	0,50

Tabela 10. Variação nos teores de umidade e atividade de água (Aa) em macarrão com ovos, nas várias etapas do processamento industrial

Etapa do Processamento	Determinações			
	Umidade absoluta (%)		Atividade de água (Aa)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Massa preparada	31,04	29,03	0,98	0,97
Macarrão após trefilagem	29,63	25,00	0,99	0,96
Macarrão em secagem inicial (3 horas)	16,36	14,80	0,89	0,83
Macarrão em secagem intermediária (6 horas)	9,02	10,03	0,54	0,60
Produto final	8,31	8,71	0,45	0,49

Em conclusão, a virtual ausência de multiplicação de *Bacillus cereus* durante o processo poderia ser atribuída à conjugação dos dois fatores limitantes: o primeiro, de natureza extrínseca, caracterizado pela temperatura inadequada para a multiplicação, quando as condições de Aa ainda eram favoráveis; o segundo, de natureza intrínseca, representado pela Aa desfavorável à multiplicação, mesmo quando a temperatura ambiental de secagem permitia o desenvolvimento da bactéria.

Estas considerações deixam patente a importância da Aa como fator limitante da multiplicação bacteriana e

como parâmetro crucial no controle microbiológico da qualidade ao longo de um processamento.

Infelizmente, são relativamente poucos os laboratórios capacitados para a efetivação destas determinações, de custo relativamente elevado quando efetuadas através de equipamentos como o NOVASINA, ou muito demoradas, quando se utilizam dessecadores com soluções saturadas de sais. Por outro lado, a determinação da umidade absoluta, de pouco significado em termos biológicos, é de fácil e rápida execução. Assim sendo, é de bastante interesse relacionar, graficamente, os valores de umidade absoluta e Aa, permitindo, desta forma, por meio de determinação da umidade absoluta aquilatar-se a Aa correspondente.

As curvas contidas nas Figuras 2 e 3, traçadas em função dos dados experimentais de dois ensaios diversos, para macarrões com e sem ovos, permitem melhor avaliar o relacionamento entre estes parâmetros.

Ainda nestas figuras é possível determinar os valores de umidade absoluta correspondentes a uma Aa = 0,92, considerada a mínima capaz de permitir a multiplicação de *Bacillus cereus*. Estes valores oscilaram, nos vários ensaios, entre 17,5 e 18,0% para macarrões sem ovos e sem variação (19%), no caso do produto com ovos. Como fator de segurança, recomenda-se que os valores mínimos, 19,0 e 17,5% sejam adotados como os limites inferiores, abaixo dos quais

Figura 2. Relação entre umidade absoluta e Aa durante a secagem do macarrão (Ensaio 1)

Figura 3. Relação entre umidade absoluta e Aa durante a secagem do macarrão (Ensaio 2)

cessa, por completo, a multiplicação de *Bacillus cereus* no macarrão com e sem ovos, respectivamente.

Os dados contidos nas Tabelas 7 e 8 mereceriam uma análise frente às exigências contidas na Portaria 001 de 28/1/1987 (BRASIL, 1987) que estabeleceu os padrões microbiológicos para alimentos. A este respeito, no caso específico de "massas alimentícias secas, com ou sem ovos e sem recheio", os referidos padrões fixam um limite máximo de 10^3 UFC de *Bacillus cereus*/g.

Pela consulta aos resultados experimentais desta pesquisa, níveis ligeiramente superiores a este limite somente foram alcançados quando as massas foram inoculadas com 10^4 esporos/g; por outro lado, quando os níveis de inoculação inicial foram da ordem de 10^2 esporos/g, os valores máximos constatados no produto final foram de $4,4 \cdot 10^1$ UFC/g, portanto muito abaixo do limite legal.

Nestas condições, como recomendação prática, seria interessante que no processamento industrial de macarrões fossem fixadas especificações internas no sentido de se exigir contagens inferiores a 10^3 UFC/g nos macarrões em processamento, imediatamente após a operação de trefilagem; este procedimento, sem dúvida, iria assegurar um produto final atendendo aos limites estabelecidos na legislação em vigor no que concerne às contagens de *Bacillus cereus*.

4.3. Avaliação da Multiplicação de *Bacillus cereus* Durante o Preparo do Macarrão para Consumo e Armazenamento do Alimento Já Preparado

Conforme descrito em detalhes em 3.3, foi realizado um total de 4 experimentos diversos, procurando avaliar o efeito do processo de cocção e preparo do macarrão, bem como de seu armazenamento posterior, na microbiota de *Bacillus cereus* contaminante do alimento.

4.3.1. Experimento de cocção e preparo de macarrão, com massa inoculada experimentalmente com aproximadamente 10^4 esporos de *Bacillus cereus*/g

Os resultados obtidos nas duas repetições do experimento constam da Tabela 11.

Os resultados obtidos deixam evidente que o procedimento de cocção do macarrão à temperatura de ebulição durante aproximadamente 20 min. teve um efeito deletério sobre a microbiota de *Bacillus cereus* contaminante. É evidente que células vegetativas porventura presentes nas amostras seriam totalmente destruídas durante o processo de cocção, uma vez que elas não têm capacidade de sobrevivência prolongada em temperaturas acima de 65-70°C (STUMBO, 1973). Já os esporos de *Bacillus cereus* têm resistência

Tabela 11. Microbiota de *Bacillus cereus* em macarrão inoculado, após cocção e armazenamento à 30°C

Etapa do Processamento	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Macarrão seco, imediatamente		
antes da cocção	$5,9.10^2$	$6,7.10^2$
Macarrão imediatamente após		
cocção	< 10	< 10
Macarrão cozido, após 5 horas de		
armazenamento a 30°C	< 10	< 10
Idem, após 10 horas de armazena-		
mento a 30°C	$3,2.10^3$	$2,6.10^3$

mais acentuada, mas bastante variável em função das cepas e do substrato de aquecimento. Segundo STUMBO (1973), os valores D_{121} oscilam entre 0,03 e 2,37 min. com "z" variando de 7,9 a 9,9°C. De acordo com GILBERT et alii (1974) e PARRY & GOEPFERT (1980), os valores D_{95} são variáveis entre 2,5 a 36,2 min. e 5,0 a 36,0 min., respectivamente. Já JOHNSON et alii (1982) constataram valores menores, entre 1,2 a 20,2 min. a 95°C, com acentuada variação entre diferentes cepas da bactéria.

A menção destes dados evidencia claramente que

temperaturas na faixa de 100°C têm, definitivamente, um efeito letal sobre os esporos de *Bacillus cereus*, com intensidade variável em função da cepa em estudo. Assim sendo, os resultados obtidos e citados na Tabela 11 parecem coerentes com estas observações. Na verdade, a redução da população de esporos em 2 ciclos log (2 "D") já resultaria em uma população sobrevivente (5,9 e 6,7 esporos/g nos ensaios 1 e 2, respectivamente) impossível de ser detectada pela metodologia de contagem utilizada, que assegura a contagem de uma microbiota mínima de 10 UFC/g. Por outro lado, a obtenção de contagens após 10 horas de armazenamento evidencia que o processo de cocção, embora com efeito patente na redução dos esporos viáveis, não conduziu à destruição completa da microbiota contaminante.

No entanto, os resultados indicam que os riscos de intoxicação alimentar pelo consumo de macarrões contendo populações de esporos na faixa de 10^2 - 10^3 UFC/g são relativamente remotos, uma vez que mesmo após armazenamento durante 10 horas a 30°C populações potencialmente perigosas não foram alcançadas.

4.3.2. Experimento de cocção e preparo de macarrão seguido de inoculação de esporos de *Bacillus cereus*, na proporção aproximada de 10^3 esporos/g

Este experimento foi conduzido, visando, pri-

meiramente, avaliar a adequação do macarrão cozido e resfriado como substrato para a proliferação de *Bacillus cereus*. Além disso, inquéritos epidemiológicos (BRYAN, 1988) têm evidenciado que problemas de recontaminação de alimentos preparados, principalmente através de manuseio inadequado ou contaminações cruzadas, estão entre as causas mais frequentes de surtos de toxinfecções de origem alimentar. Assim sendo, o procedimento de inocular o produto preparado simulou a ocorrência de uma recontaminação do macarrão por práticas higiênico-sanitárias deficientes.

Os resultados obtidos nestes experimentos constam da Tabela 12.

Tabela 12. Multiplicação de *Bacillus cereus* em macarrão cozido e resfriado, inoculado experimentalmente com suspensão de esporos e armazenado a 30°C

Período de incubação (h)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
0	$3,2 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^2$
5	$1,3 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^3$
10	$2,6 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^6$
Tempo de geração-g (minutos)	46,2	45,6

Os resultados demonstraram a adequação do macarrão cozido como substrato para a multiplicação de *Bacillus cereus* com tempo de geração (g) variando entre 45,6 e 46,2 min. Aliás, o crescimento rápido desta bactéria em substratos ricos em amido também foi observado por outros autores, entre eles MORITA & WOODBURN (1977) que constataram que populações na faixa de 10^5 UFC/g eram alcançadas em arroz cozido após 7 a 20 horas a 23°C e 3 a 9 horas a 43°C .

Inquéritos epidemiológicos têm revelado que alimentos contendo populações de *Bacillus cereus* iguais ou superiores a 10^7 UFC/g são potencialmente tóxicos (ICMSF, 1978; BANWART, 1979).

Nestas condições, conhecendo-se a razão de crescimento (μ) da bactéria no substrato, pode-se determinar o espaço de tempo decorrente até que populações que ofereçam risco ao eventual consumidor do alimento sejam atingidas; em outras palavras, pode-se calcular o tempo necessário para um alimento infectado tornar-se infeccioso ou tóxico.

Os dados contidos na Tabela 13 evidenciam mais claramente estas considerações.

Tabela 13. Relação entre grau de contaminação inicial e período de armazenamento do macarrão a 30°C, necessário para se atingir populações de *Bacillus cereus* de 10^7 UFC/g

Contaminação Inicial (UFC/g)	Período de Armazenamento (h) *
10^2	12,80
10^3	10,20
10^4	7,60
10^5	5,11
10^6	2,55

(*) Observação: valores calculados assumindo uma razão de crescimento (μ) = $0,90 \text{ h}^{-1}$

BRYAN (1988), num estudo sobre os principais fatores responsáveis pela ocorrência de surtos de toxinfecções de origem alimentar nos Estados Unidos da América, no período 1977-1982, destaca que a refrigeração inadequada, manutenção de pratos preparados à temperatura ambiente e tempo superior a 12 horas entre preparo e consumo foram responsáveis por 40,9, 21,1 e 25,2% dos surtos, respectivamente.

Estes dados são extremamente importantes principalmente quando se considera que provêm de país tecnolo-

gicamente desenvolvido e tradicionalmente rigoroso quanto às exigências higiênico-sanitárias de manipulação dos alimentos.

Com base nestas considerações, os dados da Tabela 13 tornam-se particularmente interessantes pois evidenciam os riscos potenciais elevados decorrentes da manipulação ou armazenamento inadequado de macarrões preparados. Assim sendo, para níveis baixos de contaminação (10^2 UFC/g), populações de risco seriam alcançadas após 12,8 horas de armazenamento, reduzindo-se este espaço de tempo para apenas 7,6 horas quando populações maiores (10^4 UFC/g) contaminassem o produto já preparado. Particularmente quando se considera a precariedade das condições de manipulação e armazenamento de alimentos em nosso meio, principalmente a nível de cozinhas industriais e restaurantes, compreende-se que níveis de contaminação na faixa de 10^4 a 10^5 UFC/g não seriam impossíveis de se constatar com relativa frequência.

4.3.3. Experimento de inoculação do macarrão e secagem da amostra inoculada, seguido de cocção, preparo e armazenamento

A diferença básica entre este experimento e o anterior foi a de que a inoculação com a suspensão de espo-

ros de *Bacillus cereus* foi efetuada antes do cocção do macarrão e não após a cocção como ocorreu em 3.3.2. Com isto pretendeu-se confirmar o efeito prejudicial do procedimento de cocção sobre a microbiota contaminante do alimento, o que já havia sido indicado pelos resultados obtidos no experimento 4.3.1.

Os resultados alcançados indicaram que, partindo de níveis de contaminação de $3,7 \cdot 10^3$ e $1,9 \cdot 10^3$ UFC/g nos ensaios 1 e 2, respectivamente, não se conseguia detectar microrganismos sobreviventes no macarrão cozido mesmo após 5 e 10 horas de armazenamento a 30°C .

Nestas condições, os resultados experimentais parecem confirmar que a cepa específica de *Bacillus cereus* utilizada nesta pesquisa não revelou resistência térmica acentuada, sendo destruída em proporções elevadas pela cocção à temperatura de ebulição, durante 20 minutos.

4.3.4. Avaliação da presença de esporos na água drenada após a cocção do macarrão

Este experimento foi conduzido visando esclarecer se a ausência de contagens de *Bacillus cereus* no macarrão cozido seria devida exclusivamente à destruição dos esporos pelo calor ou a um efeito de lavagem durante a cocção do alimento, ficando os esporos em suspensão na água

utilizado no processo.

Assim, partindo de amostras inoculadas de macarrão, contendo $1,2 \cdot 10^3$ e $1,4 \cdot 10^3$ UFC/g, nos ensaios 1 e 2, respectivamente, não se conseguiu detectar sobreviventes na água de drenagem remanescente do processo de cocção, obtendo-se, invariavelmente, contagens inferiores a 10 UFC/ml.

Nestas condições, a hipótese de lavagem dos esporos pela água de cocção não parece consistente, reforçando-se a afirmativa anterior atribuindo ao efeito letal do tratamento térmico a redução na população de *Bacillus cereus* contaminante do macarrão.

5 . CONCLUSÕES

Os experimentos desenvolvidos e os resultados experimentais obtidos permitem que sejam alcançadas as seguintes conclusões:

— A avaliação da contaminação de macarrões comerciais por *Bacillus cereus* revelou índices médios de 72,9% de amostras contaminadas, com valores menores (58,3%) nas amostras com ovos e superiores (87,5%) naquelas sem ovos.

— Ainda com relação aos produtos comerciais, constatou-se que em 52,1% das amostras, a microbiota de *Bacillus cereus* oscilava entre 10^1 e 10^2 UFC/g, reduzindo-se a 20,1% as amostras contaminadas com populações na faixa de 10^2 a 10^3 UFC/g.

— Cepas isoladas e presuntivamente positivas de *Bacillus cereus* revelaram índices elevados de positividade em testes bioquímicos confirmativos, envolvendo a fermentação de glucose, redução de nitrato, reação de Voges-Proskauer e decomposição da tirosina, com índices de 95,8, 93,9, 89,9 e 81,4% de positividade respectivamente.

— Os ensaios de processamento de macarrão em planta piloto, com inoculação experimental das massas de *Bacillus cereus* em níveis de 10^2 e 10^4 UFC/g, revelaram a ausência de multiplicação da bactéria ao longo do processamento, independente dos níveis de inoculação e do uso de ovos na formulação.

— Constatou-se que os valores de atividade de água (Aa) inferiores a 0,92 e limitantes, portanto, para a multiplicação de *Bacillus cereus* no macarrão eram atingidos já no início da operação de secagem dos macarrões (após 3 horas de secagem).

— Foi verificado que os valores de umidade absoluta do macarrão correspondentes a uma Aa = 0,92, limitante para a multiplicação de *Bacillus cereus*, oscilavam entre 17,5 e 18,0%, para macarrões sem ovos, e sem variação (19%) para macarrões com ovos.

— Recomenda-se que no controle microbiológico de qualidade no processamento industrial de macarrões seja especificado que contagens de *Bacillus cereus* inferiores a 10^3 UFC/g devem ser alcançadas no produto imediatamente após a trefilagem, garantindo-se, assim, um produto final com contagens inferiores a 10^3 UFC/g, que é o limite estabelecido nos padrões brasileiros.

— Os experimentos de cocção e preparo de

amostras de macarrões inoculados experimentalmente revelaram que o processo de cocção (20 minutos à temperatura de ebulição da água) era bastante letal à microbiota de *Bacillus cereus* contaminante, reduzindo, portanto, o risco de toxinfecções decorrentes do consumo de macarrões contaminados.

— Os experimentos de cocção e preparo de amostras de macarrões, seguidos de sua posterior inoculação e armazenamento a 30°C revelaram ser o macarrão cozido um excelente substrato para a multiplicação da bactéria, caracterizando-se um tempo de geração (g) médio de 45,9 min.

— Determinou-se que em macarrão cozido, preparado e armazenado a 30°C, populações potencialmente tóxicas de *Bacillus cereus* ($\geq 10^7$ UFC/g) seriam atingidas após 12,80, 7,60 e 2,55 horas de armazenamento, para níveis iniciais de contaminação de 10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/g, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 2ª ed., St. Paul, 1973. p.2.

BANWART, G.J. Basic food microbiology. Westport, AVI, 1979. 781p.

BECKERS, H.J. Incidence of foodborne disease in the Netherlands Annual Summary, 1980. Journal of Food Protection, Ames, 48(2): 181-7, 1985.

BONVENTRE, P.E. & JOHNSON, C.E. *Bacillus cereus* toxin. In: MONTIE, T.C.; KADIS, S.; AJL, S.I., ed. Microbiological toxins. New York, Academic Press, 1970. v.3, p.415-35.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 001 de 28 de janeiro de 1987, padrões microbiológicos. Brasília, DINAL, 1987. 19p.

BRYAN, F.L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. Journal of

- Food Protection, Ames, 51(8): 663-763, 1988.
- CLAUS, D. & BERKELEY, W.C.R. *Bacillus*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. *BERGEYS Manual of Systematic Bacteriology* Baltimore, 1984. p.1105-31.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; UBOLDI EIROA, M.N. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, (60): 31-40, 1978.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; PEREIRA, L.; UBOLDI EIROA, M. N.; SANTOS, C.A.M. Microbiologia de produtos institucionais. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 17(3): 315-25, 1980.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Health Education and Welfare. Bacteriological analytical manual. 5ª ed. Washington, Food and Drug Administration, 1978. n.p.
- FRANKLIM, J.G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing. Journal Applied Bacteriology, London, 33(1): 180-91, 1970.
- FURNALETTO, S.M.P. Dados sobre a presença em alimentos ou manipulados de alimentos, de bactérias responsáveis por toxinfecções de origem alimentar no Brasil. In: SEMINÁRIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMEN-

TOS, 4., Campinas, 1982. Anais. Campinas, CATI, 1982. p.167-70.

GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L.F., ed. Foodborne infections and intoxications. 2^a ed. New York, Academic Press, 1979. p. 495-514.

GILBERT, R.J.; STRINGER, M.F.; PEAGE, T.C. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation of outbreaks of food poisoning. Journal of Hygiene, London, 73(3): 433-44, 1974.

GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus*. In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Publishing Health Association, 1976. p.417-23.

GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; KIM, V.H. *Bacillus cereus*; food poisoning organism: a review. Journal of Milk and Food Technology, Ames, 35(4): 213-23, 1972.

GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; GLATS, B.A.; KIM, H.U. Pathogenicity of *Bacillus cereus*. In: HOBBS, B.C. & CRISTIAN, J.H.B., ed. Microbiological safety of foods. London, Academic Press, 1973. p.69-79.

GORDON, R.E. The genus *Bacillus*. In: LASKIN, A.I. & LECHA VALIER, H.A., ed. CRC handbook of microbiology. 2nd ed., Washington, government printing office, 1977. v.1, p. 319-36.

GORINA, L.G.; FLUER, F.S.; OLOVNIKOV, A.M.O.; EXEPARK, Y.U. Use of aggregate - hemagglutination technique for determining exo-enterotoxin of *Bacillus cereus*. Applied Microbiology, Washington, 29(2): 201-4, 1975.

INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. Microorganisms in foods; their significance and methods of enumeration. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. 434p.

INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. Microbial ecology of foods; factors affecting life and death of microorganisms. New York, Academic Press, 1980. v.1. 385p.

IVERS, J.T. & POTTER, N.N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. Journal of Food Protection, Ames, 40(1): 17-22, 1977.

JOHNSON, K.M. *Bacillus cereus* foodborne illness; an update. Journal of Food Protection, Ames, 47(2): 145-53, 1984.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic foodborne illnesses. *Journal of Food Science*, Chicago, 47(4): 1268-91, 1982.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. *Journal of Food Science*, Chicago, 48(1): 286-7, 1983.

KAMAT, A.S. The nature of toxins produced by *Bacillus cereus* BIS-59. *Journal of Food Safety*, Westport, (8): 71-81, 1987.

KAUR, P. Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 60(6): 513-6, 1986.

KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in food. I. 24-hour presumptive test medium. *Applied Microbiology*, Washington, 22(4): 581-7, 1971.

KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, 34: 13-5, 1971.

LEITÃO, M.F.F. Microbiota e controle higiênico sanitário na produção de massas alimentícias. In: VITTI, P. & LEITÃO, R.F. Tecnologia de massas alimentícias e biscoitos; manual técnico. Campinas, ITAL, 1987. p.89-104.

LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I.; MAZZONI, H. Microbiologia de alimentos desidratados. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 5: 223-41, 1973/74.

MORITA, T.N. & WOODBURN, M.J. Stimulation of *Bacillus cereus* growth by protein in cooked rice combination. Journal of Food Sciences, Chicago, 42(5): 1232-5, 1977.

MOSSEL, O.A.A.; KOOPMAN, M.I.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Applied Microbiology, Washington, 15(3): 650-3, 1967.

MURO, M.A. Identificação e caracterização de *Bacillus cereus* em alimentos envolvidos ou não em casos de toxinfecção alimentar. Campinas, 1988. 125p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

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

RABINOVITCH, L.; VICENTE, M.M.A.; GUAICURUS, T.V.; FEITAS, J.P.G.V.; MESQUITA, R.P. Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. Memorando do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 80(1): 1-9, 1985.

RAEVUORI, M. & GENEIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride in growth of *Bacillus cereus* in Laboratory media and certain foods. Applied Microbiology, Washington, 29 (1): 68-73, 1975.

ROGERS, R.F. *Bacillus cereus* isolates from refrigerated doughs, wheat flour and wheat. Cereal Chemistry, St. Paul, 55(5): 671-4, 1978.

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, 18 (4): 131 - 2, 1981.

SHARMA, P.L. & DOGRA, R.C. *Bacillus cereus* enterotoxins and its production in different foods. Journal of Food Science and Technology, Mysore, 20(3): 223-7, 1983.

SPECK, M.L. ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2^a ed. Washington, APHA, 1976. 701p.

- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Applied Microbiology*, Washington, 24(3): 341-8, 1972.
- SPIRA, W.M. & SILVERMAN, G.I. Effects of glucose, pH and dissolved-oxygen tension on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 37(1): 109 - 16, 1979.
- STANIER, R.Y.; ADELBERG, A.E.; INGRAHAM, J. The microbial world. 4^a ed. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1976. 741p.
- STEELE, J.E. & STILES, M.E. Food poisoning potential of artificially contaminated vacuum package sliced ham in sandwiches. *Journal of Food Protection*, Ames, 44(6): 430-4, 444, 1981.
- STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in food processing*. 2^a ed. New York, Academic Press, 1973. 378p.
- UBOLDI EIROA, M.N.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F.; VITTI, P. Caracterização microbiológica de farinhas e amidos. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 6(2): 459-73, 1975.
- TOOD, E.C.D. Foodborne and waterborne disease in Canada, 1979. Annual Sumary. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(2): 1071-8, 1985.

WYATT, C.J. & GUY, V.H. Incidence and growth of *Bacillus cereus* in retail pumpkin pie. Journal of Food Protection, Ames, 44(6): 422-9, 1981.