

ANNA CAROLINA MOTTA VASCONCELOS

**MODELAGEM DETERMINÍSTICA DO CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* EM
FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V331m
2017

Vasconcelos, Anna Carolina Motta, 1990-

Modelagem determinística do crescimento de *Bacillus cereus* em função do pH e temperatura / Anna Carolina Motta Vasconcelos. – Viçosa, MG, 2017.

xv, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.43-50.

1. *Bacillus cereus*. 2. Leite - Microbiologia.
3. Microbiologia dos laticínios. 4. Modelos matemáticos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664.07

ANNA CAROLINA MOTTA VASCONCELOS

**MODELAGEM DETERMINÍSTICA DO CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* EM
FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 12 de junho de 2017.



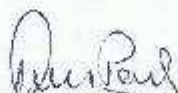
Nélio José de Andrade
(Coorientador)



Patrícia Érica Fernandes
(Coorientadora)



Luis César da Silva



Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

Dedico este trabalho,

A Deus, que abençoa, ilumina e protege minha vida.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado apoiando, dando forças e incentivando todas as minhas decisões.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família, a qual amo muito, sempre acredita em mim, me incentiva e demonstra confiança e carinho, que me ajuda nos momentos mais difíceis e que possibilita que todas as minhas vitórias possam ser alcançadas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Professor Wilmer Edgard, pela paciência e atenção na realização desse trabalho. E pelos ensinamentos, conhecimentos, orientação e oportunidades concedidas.

Ao Professor Nélio, pela orientação, paciência, colaboração e disposição para ajudar.

À Professora e colega de laboratório Patrícia, pela orientação, ensinamentos, colaboração e apoio durante o experimento.

Ao Professor Luís César, pela colaboração, pelas sugestões durante o projeto e pela ajuda para realização da modelagem estocástica.

Aos membros da banca por contribuírem para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Jorge, por conceder as estirpes necessárias para realização do experimento.

Às minhas amigas, Aline, Jordana, Kamila, Kamilla, Karla, Luiza e Tamy, pela amizade, companheirismo, conselhos, e que mesmo estando longe sempre me proporcionaram momentos inesquecíveis.

A todos os colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade, companheirismo, convivência, histórias e pelos momentos agradáveis que passamos no laboratório.

Aos amigos que fiz no Departamento de Tecnologia de Alimentos, por fazerem parte desse momento, sempre me ajudando e incentivando.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Aos meus colegas do Laticínios Damare pelo apoio e compreensão na reta final do mestrado.

Por fim, a todos os colegas que conviveram comigo durante esses 2 anos de aprendizado.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

ANNA CAROLINA MOTTA VASCONCELOS, filha de Mauro Daltio Vasconcelos e Andrea Motta Vasconcelos, nasceu na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 22 de março de 1990.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Espírito Santo, tornando-se bacharel em 2012.

Em 2013, assumiu o cargo de Coordenadora de Produção na empresa Segredos do Trigo, realizando as tarefas na mesma até 2015. Em 2013 ainda, realizou uma especialização em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, finalizando o curso em 2014.

Em 2015, iniciou o curso de Pós-graduação, *stricto sensu*, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, orientada pelo Professor Wilmer Edgard Luera Peña, na linha de pesquisa Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos.

Em 2017, assumiu o cargo de Supervisora de Garantia de Qualidade na empresa Laticínios Damare, onde atua até hoje.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | x |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 2 |
| 2.1. Objetivo Geral | 2 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 2 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| 3.1. Controle de patógenos na indústria de alimentos | 2 |
| 3.2. <i>Bacillus cereus</i> | 3 |
| 3.3. Patogenicidade de <i>Bacillus cereus</i> | 4 |
| 3.3.1. Síndrome emética..... | 5 |
| 3.3.2. Síndrome diarreica | 6 |
| 3.4. Microbiologia preditiva | 6 |
| 3.4.1. Classificação quanto aos níveis das variáveis estudadas | 7 |
| 3.4.2. Classificação quanto às categorias dos eventos microbiológicos ou abordagem da modelagem..... | 8 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| 4.1. Preparo do meio de cultura | 13 |
| 4.2. Micro-organismo e preparo do inóculo | 13 |
| 4.3. Delineamento experimental | 14 |
| 4.4. Análise dos dados e modelagem | 15 |
| 4.4.1. Modelo primário para o crescimento..... | 15 |
| 4.4.2. Modelo secundário..... | 16 |
| 4.5. Análise estatística | 17 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 18 |
| 5.1. Modelagem primária para avaliação da cinética de crescimento das diferentes estirpes de <i>Bacillus cereus</i> | 18 |
| 5.2. Modelagem secundária para avaliação da cinética de crescimento das diferentes estirpes de <i>Bacillus cereus</i> | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.1. Modelo secundário de Ratkowsky..... | 34 |
| 5.2.2. Modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado | 37 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 41 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Análise estatística das taxas máxima de multiplicação (μ) das diferentes estirpes de <i>Bacillus cereus</i> nas diferentes temperaturas e pH's | 30 |
| Tabela 2 – Análise estatística do tempo de lag (λ) das diferentes estirpes de <i>Bacillus cereus</i> nas diferentes temperaturas e pH's | 32 |
| Tabela 3 – Valores de R^2 , fator BIAS e fator exatidão para a taxa de crescimento dos modelos secundários para <i>Bacillus cereus</i> | 35 |
| Tabela 4 – Valores de R^2 , fator BIAS e fator exatidão para o tempo de lag dos modelos secundários para <i>Bacillus cereus</i> | 39 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Curvas de multiplicação da estirpe 1 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 19 |
| Figura 2 – Curvas de multiplicação da estirpe 2 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 20 |
| Figura 3 – Curvas de multiplicação da estirpe 3 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 21 |
| Figura 4 – Curvas de multiplicação da estirpe 4 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 22 |
| Figura 5 – Curvas de multiplicação da estirpe 5 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 23 |
| Figura 6 – Curvas de multiplicação da estirpe 6 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 24 |
| Figura 7 – Curvas de multiplicação da estirpe 7 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 25 |
| Figura 8 – Curvas de multiplicação da estirpe 8 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 26 |
| Figura 9 – Curvas de multiplicação da estirpe 9 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 27 |
| Figura 10 – Curvas de multiplicação da estirpe 10 de <i>B. cereus</i> em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C)..... | 28 |

Figura 11 – Curvas de multiplicação da estirpe 11 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).29

RESUMO

VASCONCELOS, Anna Carolina Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Modelagem determinística do crescimento de *Bacillus cereus* em função do pH e temperatura.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Nélio José de Andrade e Patrícia Érica Fernandes.

Bacillus cereus tem causado preocupação na indústria de alimentos, sendo que esse patógeno causa duas síndromes distintas que atingem os humanos, a diarreica é ocasionada que pelas toxinas não hemolítica (*nhe*), hemolítica (*hbl*) e citotoxina (*cytk*) e a emética, causada pela toxina denominada de cereulide. Estudar o comportamento de micro-organismos frente às várias mudanças dos parâmetros ambientais é fundamental para compreender e obter maiores conhecimentos do comportamento microbiano. Assim, modelos preditivos podem ser usados como ferramentas para descrever tais informações, além de prever o crescimento, sobrevivência e, ou inativação de micro-organismos na cadeia produtiva de alimentos. Com base nisso, esse trabalho consistiu em descrever matematicamente a multiplicação microbiana de 11 estirpes de *B. cereus* em função do pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C), determinar as curvas de crescimento das 11 estirpes de *B. cereus* em caldo nutriente, modelar as curvas de crescimento determinando o tempo de lag e a taxa de crescimento empregando o modelo primário de Baranyi e Roberts e modelar a taxa de crescimento e tempo de lag em função do pH e temperatura empregando os modelos secundários de Raiz Quadrada e Arrhenius–Davey modificado. O inóculo foi padronizado realizando leitura da densidade óptica (D.O) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm, em que a absorbância foi ajustada para 0,100, equivalente a $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹. Após o ajuste, foram feitas diluições em caldo BHI para a obtenção de $1,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹. A multiplicação microbiana foi observada utilizando o equipamento Elisa com leitura de densidade óptica em 600 nm, até que todas as estirpes alcançassem a fase estacionária. Como resultados, foram obtidas 704 curvas para caracterizar o crescimento das estirpes. O modelo de Baranyi e Roberts (1994) ajustou bem os dados para todas as temperaturas estudadas com coeficiente de determinação (R^2) > 0,95. Pode ser observado neste trabalho que as maiores taxas de multiplicação ($\mu_{máx}$) acontecem nas temperaturas de 32 °C e 37 °C e nos valores de pH entre 6,5 e 7,0 e a 15 °C nota-se que a taxa de multiplicação foi menor e o

tempo de permanência na fase lag (λ) foi maior. Foram obtidos bons ajustes do modelo secundário da Raiz Quadrada aos dados dos parâmetros $\mu_{máx}$ em função da temperatura e do pH, com valores de R^2 maiores que 0,75, e menores que 0,96, para todos os casos. Com relação ao modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado, os modelos podem ser considerados ótimos aos dados dos parâmetros λ em função da temperatura e do pH, apresentando valores de R^2 maiores que 0,88, e menores que 0,99. Portanto, observando o exposto acima, os modelos apresentados nesta pesquisa possuem boa confiabilidade para prever os parâmetros de crescimento das diferentes estirpes de *B. cereus*.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Anna Carolina Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Deterministic modeling of *Bacillus cereus* growth as a function of pH and temperature**. Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Nélio José de Andrade and Patrícia Érica Fernandes.

Bacillus cereus has caused concern in the food industry, and this pathogen causes two distinct syndromes that affect humans, the diarrhea that is caused by non-hemolytic toxins, hemolytic (*hbl*) and cytotoxin (*cytk*) and emetics, caused by cereulide toxin. The study of the behavior of microorganisms in the face of various changes in environmental parameters is fundamental to understanding and gaining knowledge of microbial behavior. Thus, predictive models can be used as tools to describe such information, in addition to predicting the growth, survival, or inactivation of microorganisms in the food production chain. Based on this, this work consisted in describing mathematically the microbial multiplication of 11 strains of *B. cereus* as a function of pH (4.9, 5.5, 6.5, 7.0) and temperature (15 °C, 25 °C, 32 °C and 37 °C), determine the growth curves of the 11 strains of *B. cereus* in nutrient broth, model the growth curves determining lag time and growth rate using the Baranyi and Roberts primary model and model the rate of growth and lag time as a function of pH and temperature using the modified Secondary Root and Arrhenius-Davey models. The inoculum was standardized by reading the optical density (O.D.) in a spectrophotometer at the wavelength of 630 nm, where the absorbance was adjusted to 0.100, equivalent to 1.0×10^8 CFU \cdot mL⁻¹. After adjustment, dilutions were made in BHI broth to obtain 1.0×10^5 CFU \cdot mL⁻¹. Microbial multiplication was observed using the Elisa equipment with optical density reading at 600 nm until all strains reached the stationary phase. As results, 704 curves were obtained to characterize the growth of the strains. The model of Baranyi and Roberts (1994) fitted the data well for all temperatures studied with coefficient of determination (R^2) > 0.95. It can be observed in this work that the highest multiplication rates (μ_{max}) occur at temperatures of 32 °C and 37 °C and at pH values between 6.5 and 7.0 and at 15 °C it is noted that the multiplication rate was lower and the residence time in the lag (λ) phase was higher. Good adjustments of the secondary model of the Square Root were obtained for the parameters μ_{max} as a function of temperature and pH, with R^2 values higher than 0.75 and less than 0.96 for all cases. With respect to the modified

Arrhenius-Davey secondary model, the models can be considered optimal for the λ parameter data as a function of temperature and pH, with R^2 values greater than 0.88 and less than 0.99. Therefore, considering the above, the models presented in this research have good reliability to predict the growth parameters of the different strains of *B. cereus*.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observou-se um aumento de notificações de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados. Por isso, o maior desafio da indústria alimentícia é garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, evitando a contaminação dos mesmos por micro-organismos patogênicos e deterioradores.

Um dos micro-organismos que tem causado preocupação na indústria de alimentos é *Bacillus cereus*. Esse micro-organismo é formador de esporo, resistente ao processamento térmico e é produtor das toxinas diarreica e emética. Os surtos de doenças associadas ao *B. cereus* ocorre em uma ampla variedade de alimentos, sendo que a síndrome diarreica é provocada pelo consumo de leites e derivados, molhos, sopas e vegetais contaminados com células vegetativas viáveis, e a síndrome emética ocorre pela ingestão das toxinas pré-formadas produzidas em arroz, massas e macarrões.

Como mencionado, *B. cereus* tem sido isolado de uma vasta variedade de alimentos processados e *in natura*, sendo comumente encontrado nos produtos lácteos. Além desses fatos, *B. cereus* é um dos principais micro-organismos causadores de deterioração do leite processado, ficando responsável por causar *off-flavors* e defeitos no produto devido à atividade de proteases, lipases e fosfolipases, além de comprometer a qualidade e segurança dos produtos lácteos.

É fundamental estudar o comportamento desse micro-organismo frente às mudanças dos parâmetros ambientais, dessa forma, é possível obter maiores conhecimentos do comportamento microbiano. Por isso, são realizados estudos modificando parâmetros como temperatura, pH e diversidade genética, a fim de ser determinados aumento ou não da multiplicação microbiana e evitar riscos a saúde da população. Diante do exposto, o efeito desses fatores no desenvolvimento microbiano pode ser estudado por meio da microbiologia preditiva.

A microbiologia preditiva é uma ferramenta que utiliza modelos matemáticos para prever o crescimento, sobrevivência e, ou inativação de micro-organismos em cadeias produtivas no que se refere ao processamento, armazenamento, transporte e distribuição dos alimentos.

Portanto, inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de utilizar modelagens matemáticas para determinar o crescimento microbiano, ao longo do

tempo sob condições diversas, como, pH, temperatura, atividade de água, entre outros. De modo geral, a modelagem preditiva contribui para o conhecimento do comportamento microbiano, possibilitando a avaliação dos efeitos de processamentos, distribuição e estocagem na qualidade e segurança microbiológica, predição da vida útil de prateleira dos alimentos, bem como auxiliar nas tomadas de decisões.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Descrever matematicamente a multiplicação microbiana de onze estirpes de *Bacillus cereus* em função da alteração do pH e temperatura do meio.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar curvas de crescimento de 11 estirpes de *B. cereus* em função do pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C) em caldo nutriente;
- Modelar as curvas de crescimento determinando o tempo de lag e a taxa de crescimento empregando o modelo primário de Baranyi e Roberts;
- Modelar a taxa de crescimento e tempo de lag em função do pH e temperatura empregando os modelos secundários de Raiz Quadrada e Arrhenius–Davey modificado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Controle de patógenos na indústria de alimentos

O controle microbiológico em alimentos é importante para a segurança alimentar e é uma questão de saúde pública. Portanto, têm sido intensificados os

processos para garantir a produção de alimentos seguros, devido ao risco de incidência de doenças de origem alimentar (TAYLOR et al., 2012).

Segundo os dados do Centro de Controle de Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*), todos os anos, aproximadamente, 48 milhões de pessoas são vítimas de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por algum patógeno, ocorrendo 128 mil hospitalizações e 3 mil óbitos, ocasionando um custo total de US\$ 77,7 milhões (CDC, 2014). No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância e Saúde, foram registrados 9.719 surtos e 192.803 pessoas ficaram doentes no período de 2000 a 2014 (BRASIL, 2014).

As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos, protozoários e vírus. As bactérias constituem o grupo microbiano mais importante e as principais bactérias patogênicas de preocupação nos alimentos são *Salmonella*, *Campylobacter*, variedades patogênicas de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, cada um dos quais podem ser associadas com a infecção gastrointestinal grave. Existem outros micro-organismos patogênicos que devem ser controlados nos alimentos, como *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Bacillus cereus* e norovírus (ENDERSEN et al., 2014).

A alteração dos alimentos por micro-organismos pode acarretar perdas econômicas e de qualidade dos alimentos, além de comprometer a saúde dos consumidores, ocasionando maior preocupação por parte dos gestores das indústrias alimentícias (COSTA et al., 2013).

3.2. *Bacillus cereus*

B. cereus é um micro-organismo anaeróbio facultativo, gram-positivo, tem o formato de haste, formador de esporos e é amplamente distribuído no ambiente, devido à resistência em condições hostis (CEUPPENS et al., 2013).

Os esporos desse micro-organismo em alimentos germinam e as células vegetativas desenvolvem quando as condições são adequadas, ocasionando deterioração do produto e produção de toxinas nos alimentos ou no hospedeiro. Esses esporos podem resistir à pasteurização do leite (IZADI et al., 2016).

B. cereus está associado à vários surtos de origem alimentar em todo mundo (ORGANJI et al., 2015). É um contaminante alimentar comum, que é encontrado no solo, em alimentos elaborados ou crus como arroz, carne, legumes, leite, assim como em produtos lácteos e pratos que já foram cozidos (SAMAPUNDO et al., 2011).

B. cereus é facilmente encontrado em produtos lácteos, principalmente, aos submetidos ao tratamento térmico, sendo responsável por causar *off-flavors* e defeitos no produto devido à atividade de proteases, lipases e fosfolipases, além de comprometer a qualidade e segurança dos produtos lácteos (MAZIERO; BERSOT, 2011).

B. cereus é responsável por ocasionar intoxicação alimentar em que comumente ocorrem em dois tipos de doença: as síndromes eméticas e diarreicas (MOLS et al., 2011).

Schoeni e Lee Wong (2005) demonstraram que o grupo formado por *Bacillus* possui membros com uma grande diversidade no que diz respeito à fisiologia, nicho ecológico, sequência de DNA e regulação gênica. Além disso, espécies de *B. cereus* têm causado surtos de doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados, por isso, técnicas de biologia molecular têm sido usadas para investigar de forma epidemiológica esses surtos e, também, rastrear contaminações causadas por esses micro-organismos a fim de não comprometer a qualidade e a segurança dos alimentos (OH et al., 2012).

3.3. Patogenicidade de *Bacillus cereus*

A patogenicidade está relacionada ao potencial do micro-organismo causar determinada doença (PRESCOTT et al., 2008). A patogenicidade de *B. cereus* está relacionada à destruição de tecidos ocasionada pela ação de exoenzimas produzidas pelo micro-organismo. Por isso, as enzimas encontradas nesse micro-organismo compõem-se de quatro hemolisinas, três fosfolipases distintas, uma toxina emética, e três enterotoxinas, sendo elas, hemolisina BL (*hbl*), toxina não hemolítica (*nhe*) e citotoxina k (*cytk*) (BOTTONE, 2010).

B. cereus é o agente causador de dois tipos diferentes de doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados: a síndrome emética, causada

pela ingestão de uma toxina emética pré-formada nos alimentos e a síndrome diarreica, causada por diferentes toxinas que podem ser formadas tanto nos alimentos quanto no intestino delgado (DI PINTO et al., 2013; GRANUM e LINDBÄCK, 2013).

3.3.1. Síndrome emética

A síndrome emética é causada pelo consumo de dodecadepsipeptideo, conhecido como cereulide, que é produzido no alimento antes do consumo (JEßBERGER et al., 2014). De acordo com Lindback e Granum (2013), essa síndrome é caracterizada por vômitos e náuseas após 0,5 h a 6,0 h do consumo de alimentos contaminados com a enterotoxina pré-formada provocando vômitos. A duração dos sintomas é geralmente inferior a 24 h. A toxina é produzida no alimento durante a multiplicação vegetativa do micro-organismo, apresentando ser resistente ao pH ácido, às enzimas proteolíticas e processamento de alimentos, incluindo autoclavagem (KUMARI e SARKAR, 2014). A dose infecciosa varia de 10^5 a 10^8 células ou esporos por grama (NARANJO et al., 2011). Os alimentos que estão associados ao tipo emético são comumente os farináceos (HARIRAM e LABBÉ, 2016).

A síndrome emética está associada à ingestão da toxina pré-formada em arroz frito e cozido, massas e macarrões, nestes tipos de enfermidade, o alimento implicado geralmente foi tratado com calor e os esporos sobreviventes são a origem das síndromes (LEDENBACH e MARSHALL, 2009).

Cereulide é uma toxina emética, formado por um pequeno dodecadepsipeptideo, resistente ao calor, possui pH em torno de 2 a 11, além de ser altamente resistente à atividade da protease (pepsina e tripsina) e não está inativada durante a passagem gastrointestinal (CEUPPENS et al., 2012). Tem sido envolvida no processo da insuficiência hepática fulminante em humanos, causa danos celulares em modelos animais e apresenta toxicidade para as mitocôndrias, agindo como um ionóforo de potássio (KUMARI e SARKAR, 2014).

3.3.2. Síndrome diarreica

A síndrome diarreica resulta da produção de enterotoxinas de três tipos, toxina proteína única, citotoxina k, e duas enterotoxinas complexas, isto é, hemolisina BL (*hbl*) e enterotoxina não hemolítica (*nhe*) (FERNANDES et al., 2014). Entre os genes envolvidos na biossíntese das enterotoxinas mencionados, grupo *nheA* são os mais prevalentes em todas subespécies de *B. cereus* (HWANG e PARK, 2015). Essa síndrome está relacionada ao consumo de alimentos com alto conteúdo proteico e produzida por bactérias viáveis no intestino delgado (ARNESEN, FAGERLUND e GRANUM, 2008). O aparecimento de diarreia aquosa e cólicas abdominais acontece de 6 a 15 horas após o consumo de alimentos contaminados com esta bactéria. Os sintomas persistem durante 24 horas, na maioria dos casos. A dose infecciosa é de 10^5 a 10^7 células ou esporos por grama (NARANJO et al., 2011).

Os alimentos que estão associados ao tipo diarreico são carne, molhos, pudim, legumes e produtos lácteos (HARIRAM e LABBÉ, 2016).

Entre as enterotoxinas produzidas por *B. cereus*, a enterotoxina hemolisina (*hbl*) desempenha um papel fundamental na doença diarreica. É um sistema lítico composto por três proteínas antígenicamente diferentes (B, L1, L2), secretadas de forma independente e todas essenciais para a atividade biológica *hbl* (BEECHER, SCHOENI e WONG, 1995).

A enterotoxina não hemolítica (*nhe*) é encontrada em quase todas as estirpes de *B. cereus*, enquanto que os genes da hemolisina BL (*hbl*) são encontrados em aproximadamente 50 % das estirpes conhecidas. Como resultado, a co-expressão de ambas enterotoxinas encontra-se numa percentagem elevada (40-60 %) das estirpes de *B. cereus* (JEßBERGER et al., 2014).

3.4. Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva de alimentos passou a ser estudada com mais intensidade a partir da década de 1980 devido ao aumento de surtos causados pela infecção alimentar, provocados por *Salmonella* spp e *L. monocytogenes*. Governos dos Estados Unidos, Europa, Austrália e Nova Zelândia contribuíram para as

pesquisas sobre microbiologia preditiva com o intuito de garantir maior segurança dos alimentos. O aumento do interesse pela microbiologia preditiva foi essencial devido à facilidade de acesso à tecnologia dos dias atuais e as limitações dos métodos microbiológicos tradicionais, como por exemplo, o custo elevado e a demora dos resultados das análises (MEMBRÉ; LAMBERT, 2008).

Microbiologia preditiva é uma área da ciência de alimentos que emprega modelos matemáticos para descrever o crescimento, sobrevivência e, ou inativação de populações de micro-organismos mediante alterações no ambiente, como por exemplo, temperatura, condições de armazenamento, atividade de água e pH. Isso contribui para adoção de medidas de segurança alimentar quanto às etapas de processamento, armazenamento, transporte, distribuição de alimentos e de matérias-primas. Dessa forma, a microbiologia preditiva apresenta-se como ferramenta útil na previsão de populações microbianas, tempo de conservação, controle de qualidade e avaliações de risco (HUANG, 2014).

As respostas microbianas são testadas sob condições controladas e os resultados são então expressos como modelos matemáticos que permitem prever combinações de condições não testadas (FAKRUDDIN et al., 2011).

3.4.1. Classificação quanto aos níveis das variáveis estudadas

De acordo com Whiting e Buchanan (1993), os modelos matemáticos podem ser classificados em três níveis, primários, secundários e terciários.

Os níveis primários são os modelos matemáticos que descrevem alterações na população microbiana em função do tempo, sob um determinado conjunto de condições (HUANG, 2014). Esses modelos podem ser utilizados para descrever processos como, a curva de crescimento e a curva de inativação de micro-organismos (FAKRUDDIN et al., 2011). As respostas microbianas em função do tempo, por exemplo, tempo de geração, duração da fase lag, taxa de crescimento e densidade populacional máxima podem ser determinadas de maneira direta, como a contagem em placa e formação de toxina e, indiretamente, por densidade ótica.

Os modelos de níveis secundários descrevem respostas de um ou mais parâmetros do modelo primário em razão das alterações das condições ambientais

(HUANG et al., 2011). Superfície de resposta, Arrhenius e Belehradek são exemplos de modelos secundários.

Os modelos de níveis terciários tratam de programas de computador fundamentados nos modelos primários e, ou secundários para prever o comportamento de micro-organismos em alimentos em diversos cenários. Os modelos terciários propiciam a inclusão de que simulam as condições variáveis do crescimento ou sobrevivência de micro-organismos, permitindo assim prever o comportamento microbiano em condições diferentes ou observar por meio de gráficos o crescimento de vários micro-organismos simultaneamente (FAKRUDDIN et al., 2011).

3.4.2. Classificação quanto às categorias dos eventos microbiológicos ou abordagem da modelagem

Em microbiologia preditiva os modelos matemáticos, segundo Ross, McMeekin (1994), podem ser divididos em duas categorias: mecanísticos ou determinísticos e empíricos.

Modelos mecanísticos descrevem os processos microbianos por meio de bases teóricas, permitindo a interpretação da mesma em termos de fatos conhecidos. Portanto, o número de parâmetros deve ser o menor possível, pois isso significa maior parcimônia e, portanto, maior poder de explicação; por isso, quanto mais mecanístico for o modelo, mais explicativo ele se torna (PELEG; CORRADINI, 2011).

Os modelos empíricos são formulados para descrever processos microbianos a partir de dados experimentais. Desse modo, as relações matemáticas empregadas limitam-se à predição de respostas para o intervalo de dados empregados. Fato que demonstra carência de base mecanística (NAKASHIMA et al., 2000).

Os modelos cinéticos, também denominados dinâmicos, consideram a variável tempo quanto à predição, por exemplo, da extensão e velocidade de crescimento ou destruição de micro-organismos de interesse (NAKASHIMA et al., 2000). Ou seja, esses modelos fornecem informações a respeito do comportamento microbiano. Alguns exemplos dessa categoria são o modelo de Gompertz e modelo de raiz quadrada, que aplicam à descrição de taxas de resposta, como tempo de

latência, taxa de crescimento específico e máxima, densidade populacional ou modelos de inativação e, ou sobrevivência que descrevem a destruição ou sobrevivência ao longo do tempo (FAKRUDDIN et al., 2011).

Os modelos probabilísticos ou estocásticos aplicam a predição de probabilidades de ocorrência de eventos. Modelos estocásticos, por meio do experimento denominado Simulação de Monte Carlo, permitem prever probabilidades associadas, por exemplo, ao crescimento populacional e produção de toxinas (FAKRUDDIN et al., 2011).

Vários modelos matemáticos são tradicionalmente utilizados em microbiologia preditiva, dentre estes, pode-se destacar o modelo de Gompertz, Gompertz modificado, Baranyi e Roberts, probabilidade de regressão logística e raiz quadrada.

A equação original de Gompertz pode ser descrita de acordo com a Equação 1.

$$N_t = C \exp\{\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

em que:

t = tempo;

$N(t)$ = densidade da população no tempo t ;

C = valor da assíntota superior, isto é, a densidade máxima da população indicada por $N_{+\infty}$;

M = tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima; e

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M .

O modelo de Gompertz modificado é o representado pela Equação 2.

$$y(t) = A + C\{\exp[-\exp(-B(t - M))]\} \quad (2)$$

em que:

$y(t)$ = densidade populacional do micro-organismo no tempo t ;

A = valor da assíntota inferior ($\log N(-\infty)$) – o que representa o log da população inicial de micro-organismo;

C = valor da assíntota superior ($\log N(+\infty)$) – o que representa o log da densidade máxima da população microbiana durante a fase estacionária menos o log da população inicial;

M = tempo em que a velocidade de crescimento absoluta é máxima;

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M ; e

t = tempo.

O modelo de Gompertz modificado apresentado pela Equação 2 parece ser uma equação complexa, porém os parâmetros da equação representam os parâmetros que estão relacionados matematicamente com domínios conhecidos pelos microbiologistas (BUCHANAN, 1993). As Equações 3, 4, 5 e 6 apresentam os parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada.

$$\mu = \frac{BC}{e} \quad (3)$$

$$GT = [\log(2)] \left(\frac{e}{BC} \right) \quad (4)$$

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B} \right) \quad (5)$$

$$MPD = A + C \quad (6)$$

em que:

e = constante neperiana;

μ = taxa de crescimento [$\text{Log}(\text{UFC/ml})/\text{h}$];

GT = tempo de geração (h);

λ = duração da fase lag; e

MPD = log da densidade máxima da população, [$\text{Log}(\text{UFC/ml})$].

A equação original de Gompertz (Equação 1) não considera a fase lag, como é o caso da sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (McMEEKIN et al., 1993).

A equação 7 é o modelo de Baranyi e Roberts (1994), que propuseram um modelo que incluiu uma fase de crescimento exponencial linear, $\mu(x)$ e uma fase lag determinada por uma função de ajuste, $A(x)$. Este modelo é classificado como empírico, cinético e primário.

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x}A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{m\acute{a}x}A(t)} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}} \right) \quad (7)$$

em que:

y_0 = população inicial no tempo t_0 , [Log(UFC/ml)/h];

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa de crescimento máximo, [Log(UFC/ml)/h];

$Y_{m\acute{a}x}$ = população máxima [Log(UFC/ml)/h]; e

m = parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial.

A função $A(t)$ é representada pela Equação 8.

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{m\acute{a}x}t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0})}{\mu_{m\acute{a}x}}, \text{ para } h_0 = -\ln \alpha_0 \quad (8)$$

em que:

α_0 = estado fisiológico das células no tempo $t = t_0$;

h_0 = estado fisiológico inicial da célula.

O modelo de probabilidade de regressão logística é classificado como empírico, probabilístico e secundário. Segundo Gortmaker; Hosmer; Lemeshow (1994), este modelo descreve a probabilidade de ocorrência de um dado evento Y , dependente de um vetor x . Sua fórmula está representada pela Equação 9.

$$P(x) = \frac{e^{|\Sigma \beta_i + x_i|}}{1 + e^{|\Sigma \beta_i + x_i|}} \quad (9)$$

Em que $P(x)$ é a probabilidade de ocorrer ou não determinado evento, como por exemplo, a probabilidade de crescimento ou não crescimento de um patógeno. A

transformação de $P(x)$, essencial para o estudo da regressão logística, é dada pela transformação logit, representada pela Equação 10.

$$\text{Logit}(P) = g(x) = \ln \left[\frac{P(x)}{1 - P(x)} \right] = \sum \beta_i + \beta x_i \quad (10)$$

O modelo de raiz quadrada foi desenvolvido para descrever o efeito da temperatura na taxa de crescimento microbiano (RATKOWSKY et al., 1982). É classificado como um modelo empírico, cinético e secundário. Sua fórmula é representada pela Equação 11.

$$\sqrt{\mu} = b (T - T_{\min}) \quad (11)$$

em que:

μ = taxa de crescimento, [Log(UFC/ml)/h];

b = parâmetro a ser estimado;

T = temperatura subótima (de interesse); e

T_{\min} = temperatura mínima em que a velocidade de crescimento extrapolada é zero.

McMeekin et al. (1987); Adams; Little e Easter (1991), adicionaram ao modelo os parâmetros atividade de água (a_w) e pH, respectivamente, o que resultou na Equação 12.

$$\sqrt{\mu} = b (T - T_{\min}) \sqrt{(a_w - a_{w \min})} \sqrt{(pH - pH_{\min})} \quad (12)$$

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

4.1. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi caldo nutriente (Himedia®), sendo preparado de acordo com instruções do fabricante.

4.2. Micro-organismo e preparo do inóculo

O experimento foi realizado com onze estirpes de *Bacillus cereus*, isolados de diversos produtos lácteos, como leite em pó, bebida láctea, ricota, leite UHT e leite pasteurizado, cedidos por Barreto (2016). Cada micro-organismo apresentou genes para a produção de diferentes toxinas que pode ser, toxina não hemolítica (*nhe*), hemolisina BL (*hbl*) e citotoxina k (*cytk*) (Quadro 1).

Com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota da cultura do micro-organismo, congelada a -80 °C em tubo *ependorff* contendo caldo BHI e glicerol na proporção 80:20, foi ativada em caldo BHI por duas vezes consecutivas e incubada a 32 °C por 24 h. Para a padronização do inóculo, foi realizada leitura da Densidade Óptica (D.O) em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227) no comprimento de onda de 630 nm, em que a absorbância foi ajustada para 0,100, equivalente a $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹, de acordo com padrão McFarland 0,5. Após o ajuste, foram feitas diluições em caldo BHI para a obtenção de $1,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹.

Quadro 1 – Lista dos isolados utilizados no experimento com suas respectivas toxinas

| Produto lácteo | Estirpe | NHE | HBL | Citk |
|---------------------------|----------------|------------|------------|-------------|
| Leite em pó | 1 | + | - | + |
| | 2 | + | + | + |
| Bebida láctea | 3 | + | + | + |
| | 4 | + | - | + |
| Ricota | 5 | + | - | + |
| | 6 | + | + | + |
| Leite UHT | 7 | + | + | + |
| | 8 | + | - | + |
| Leite pasteurizado | 9 | + | + | + |
| | 10 | + | - | + |
| | 11 | - | + | + |

4.3. Delineamento experimental

Para a avaliação do crescimento dos isolados de *B. cereus*, foi realizado em esquema fatorial completo, cujos fatores foram quatro níveis de temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C) e quatro níveis de pH (4,9; 5,5; 6,5 e 7,0). O experimento foi realizado em quatro repetições, o que totalizou 64 ensaios experimentais para cada um dos 11 isolados.

O pH do meio foi determinado utilizando o pHmetro da marca GEHAKA, sendo que seu valor foi ajustado para baixo ou para cima utilizando ácido clorídrico 1M (HCl) e hidróxido de sódio 1M (NaOH), respectivamente.

A concentração do inóculo inicial para cada uma das combinações do delineamento experimental foi de, aproximadamente, 10^5 UFC·mL⁻¹. O experimento foi conduzido utilizando placas de microtitulação de 96 poços contendo caldo nutriente (Himedia®) ajustadas às condições experimentais de pH e temperatura.

A multiplicação microbiana foi observada pelo equipamento Elisa (Leitor de microplacas Modelo Expert Plus - marca Asys), disponível no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, com leitura de

densidade óptica em 600 nm, em intervalos de tempo de uma hora para as leituras realizadas nas temperaturas de 32 °C e 37 °C, intervalos de tempo de duas horas para a temperatura de 25 °C e intervalos de tempo de quatro horas para a temperatura de 15 °C, até que todas as estirpes alcançassem a fase estacionária.

4.4. Análise dos dados e modelagem

4.4.1. Modelo primário para o crescimento

O *software* DMFit, cedido pelo Dr. Baranyi (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit) foi usado para ajustar os dados das curvas de multiplicação ao modelo de Baranyi (BARANYI; ROBERTS, 1995). Assim, os parâmetros de multiplicação microbiana: taxa máxima de multiplicação (μ) e tempo de lag (λ), foram determinados para os 11 isolados de *B. cereus*, equações 13 e 14.

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x}A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{m\acute{a}x}A(t)} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}} \right) \quad (13)$$

em que:

y_0 = população inicial no tempo t_0 ;

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa de crescimento máximo, [Log(UFC/ml)/h];

$Y_{m\acute{a}x}$ = população máxima; e

m = parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial.

A função $A(t)$ é representada pela Equação 14.

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{m\acute{a}x}t} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{\mu_{m\acute{a}x}}, \text{ para } h_0 = -\ln\alpha_0 \quad (14)$$

em que:

α_0 = estado fisiológico das células no tempo $t = t_0$;

h_0 = estado fisiológico inicial da célula.

4.4.2. Modelo secundário

Os efeitos da temperatura e do pH na taxa de multiplicação ($\mu_{m\acute{a}x}$), foram avaliados pelo modelo secundário de raiz quadrada, de Ratkowsky et al. (1982) modificado, conforme a Equação 15. O ajuste dos dados a este modelo foi realizado pelo *software Statistica 7.0*.

$$\sqrt{\mu} = b (T - T_{min})\sqrt{(pH - pH_{min})} \quad (15)$$

em que:

μ = taxa de crescimento, [Log(UFC/ml)/h];

b = parâmetro a ser estimado;

T = temperatura subótima (de interesse), (min);

T_{min} = temperatura mínima em que a velocidade de crescimento extrapolada é zero.

Os efeitos da temperatura e do pH no tempo de lag (λ), foram avaliados pelo modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado (DAVEY, 1991), conforme a Equação 16. O ajuste dos dados a este modelo foi realizado pelo *software Statistica 7.0*.

$$\ln(\lambda) = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 \times pH + C_4 \times pH^2 \quad (16)$$

em que:

λ = tempo de lag, [h⁻¹];

$C_0 \dots C_4$ = coeficientes do modelo;

T = temperatura.

O ajuste dos modelos encontrados foi avaliado pela significância dos coeficientes dos modelos, pelo coeficiente de determinação (R^2), fator BIAS e fator exatidão.

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra.

O fator BIAS é uma estimativa da diferença média entre os valores observados e preditos, considerado um desvio relativo médio, Equação 17.

$$fator\ BIAS = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}}\right)}{n}\right)} \quad (17)$$

Se o valor do fator BIAS for igual a 1, resposta predita = observada;

Se o valor do fator BIAS for maior que 1, resposta predita é maior que a observada;

Se o valor do fator BIAS for menor que 1, resposta predita é menor que a observada.

O fator exatidão é uma medida para a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Quanto maior o valor do fator exatidão, menor será a exatidão da estimativa da média, Equação 18.

$$fator\ exatidão = 10^{\left(\frac{|\log\left(\frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}}\right)|}{n}\right)} \quad (18)$$

4.5. Análise estatística

Para realização da análise estatística, foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para avaliar a taxa máxima de multiplicação (μ) e o tempo de lag (λ) das onze estirpes de *Bacillus cereus* nas diferentes temperaturas (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C) e pH's (4,9; 5,5; 6,5 e 7,0).

As onze estirpes foram analisadas pela Análise de Variância, utilizando o teste F a 5 % de probabilidade, e quando constatado o efeito significativo dos tratamentos, utilizou-se o Teste de Tukey a 5 % de probabilidade. O experimento foi realizado com quatro repetições.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System* – SAS, Institute Inc., North Carolina, USA), versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa (SAS, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Modelagem primária para avaliação da cinética de crescimento das diferentes estirpes de *Bacillus cereus*

Um total de 704 curvas foram obtidas para caracterizar o crescimento das onze estirpes de *B. cereus* nas temperaturas (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C) e pH's estudados (4,9; 5,5; 6,5; 7,0). Os dados do modelo de Baranyi e Roberts (1994) ajustaram bem para todas as temperaturas estudadas com coeficiente de determinação (R^2) > 0,95.

De acordo com Van Impe (2005), existem várias razões para utilizar o modelo de Baranyi e Roberts, como: a facilidade de uso, a aplicabilidade sob condições ambientais dinâmicas, boa capacidade de ajuste e os parâmetros são biologicamente interpretáveis.

As curvas referentes ao comportamento durante a cinética de multiplicação microbiana das diferentes estirpes de *B. cereus* estão apresentadas nas Figuras 1 a 11. De acordo com as Figuras (1 a 11) pode-se notar que cada estirpe apresentou um comportamento diferenciado com relação ao pH e a temperatura. À medida que se aumenta a temperatura e o pH, aumenta a taxa máxima de multiplicação (μ) e diminui o tempo de lag (λ), isso também pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

Dufrenne et al. (1994) estudaram o comportamento de 30 estirpes de *B. cereus* isoladas de diferentes alimentos e colocadas em temperaturas que variaram de 5 °C, 7 °C, 9 °C e 11 °C e relataram que houve diferença no comportamento de cada estirpe nas diferentes temperaturas, sendo que algumas conseguiram crescer em temperaturas mais baixas e outras não.

Souza (2003) estudou o comportamento de duas estirpes (emética e diarreica) de *B. cereus* inoculados em arroz-doce em diferentes temperaturas de 10 °C, 15 °C, 22 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C e observou que houve diferença entre as duas estirpes, porém a maior diferença pode ser analisada em temperaturas mais altas entre 30 °C e 45 °C.

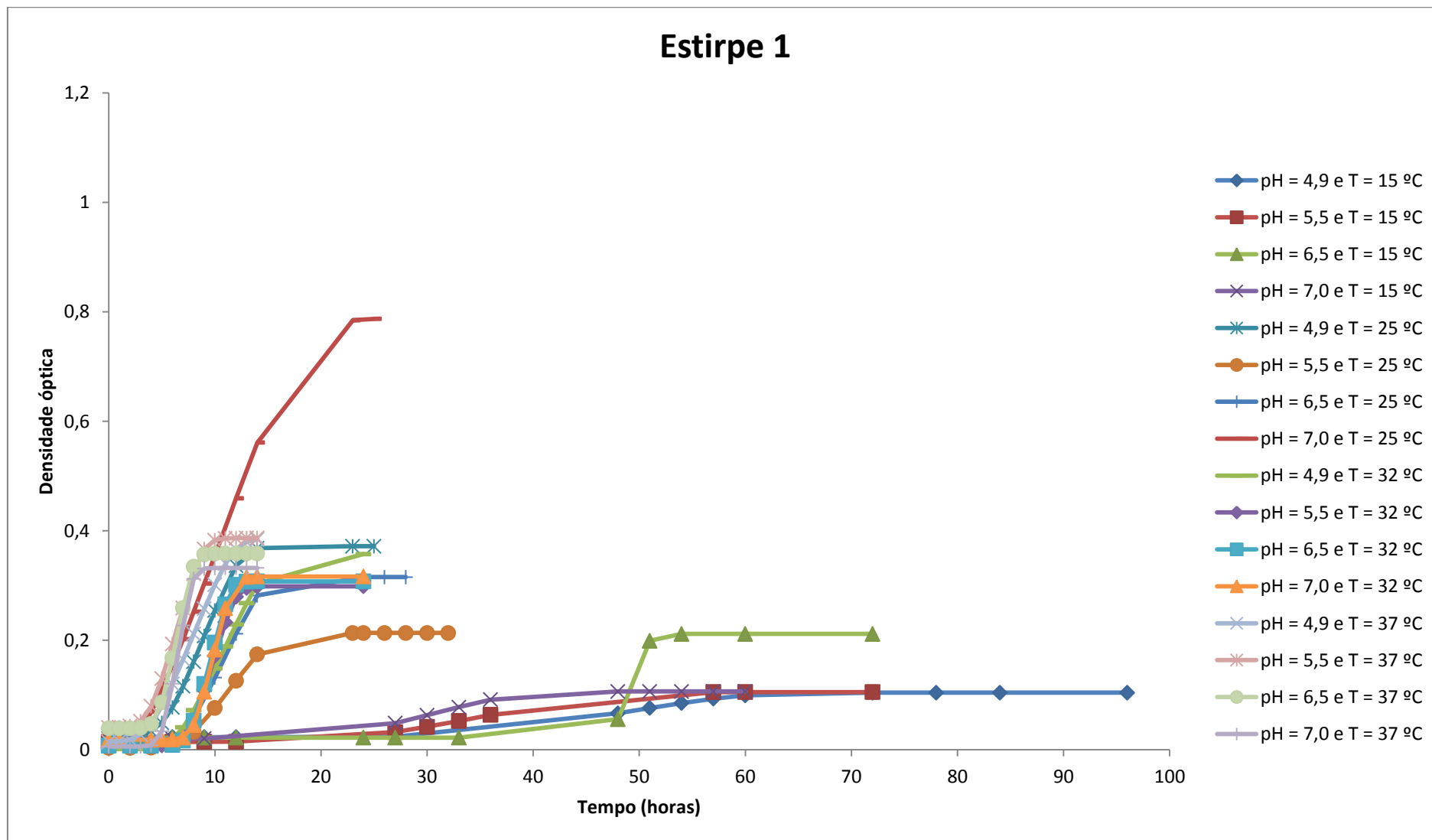


Figura 1 – Curvas de multiplicação da estirpe 1 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

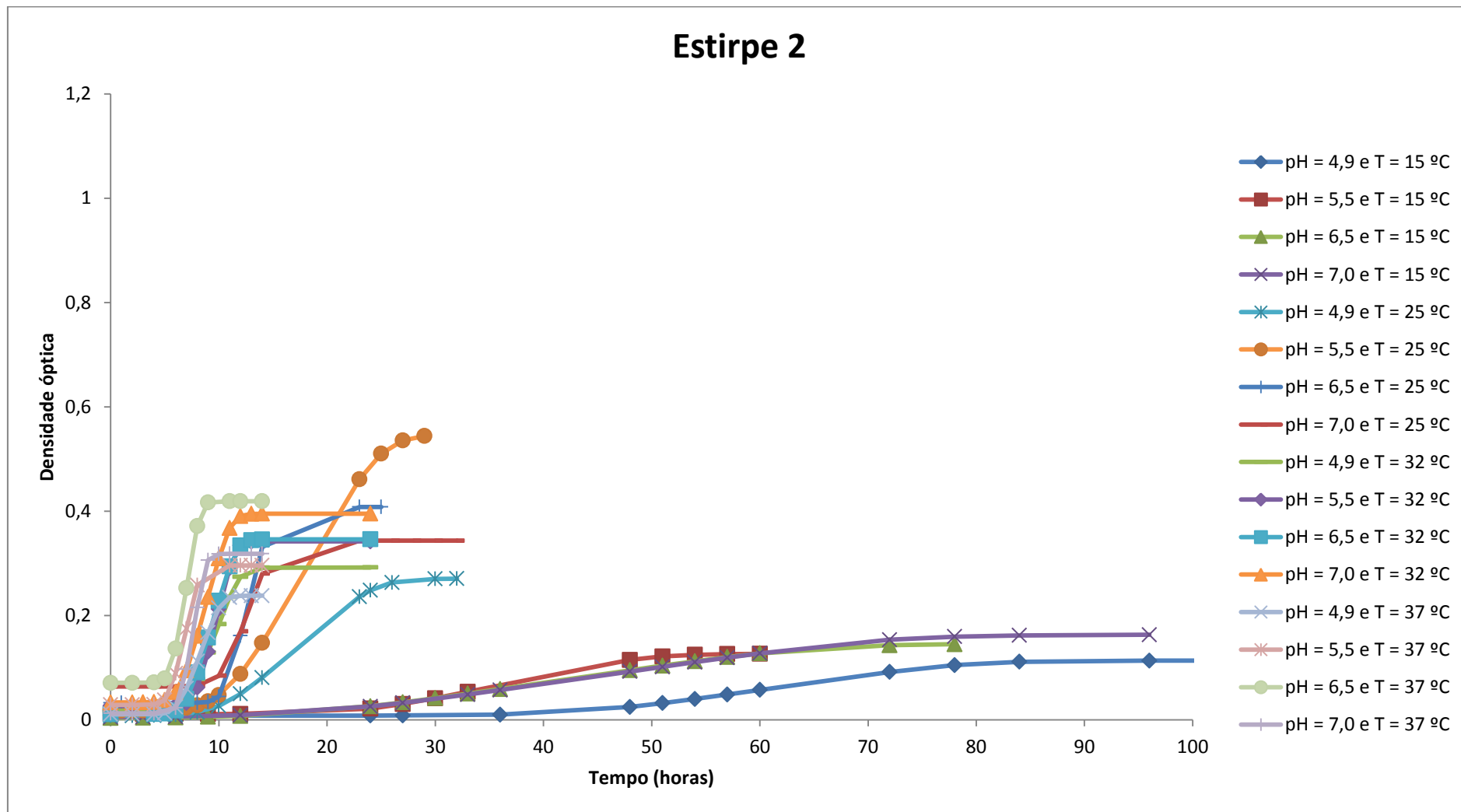


Figura 2 – Curvas de multiplicação da estirpe 2 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

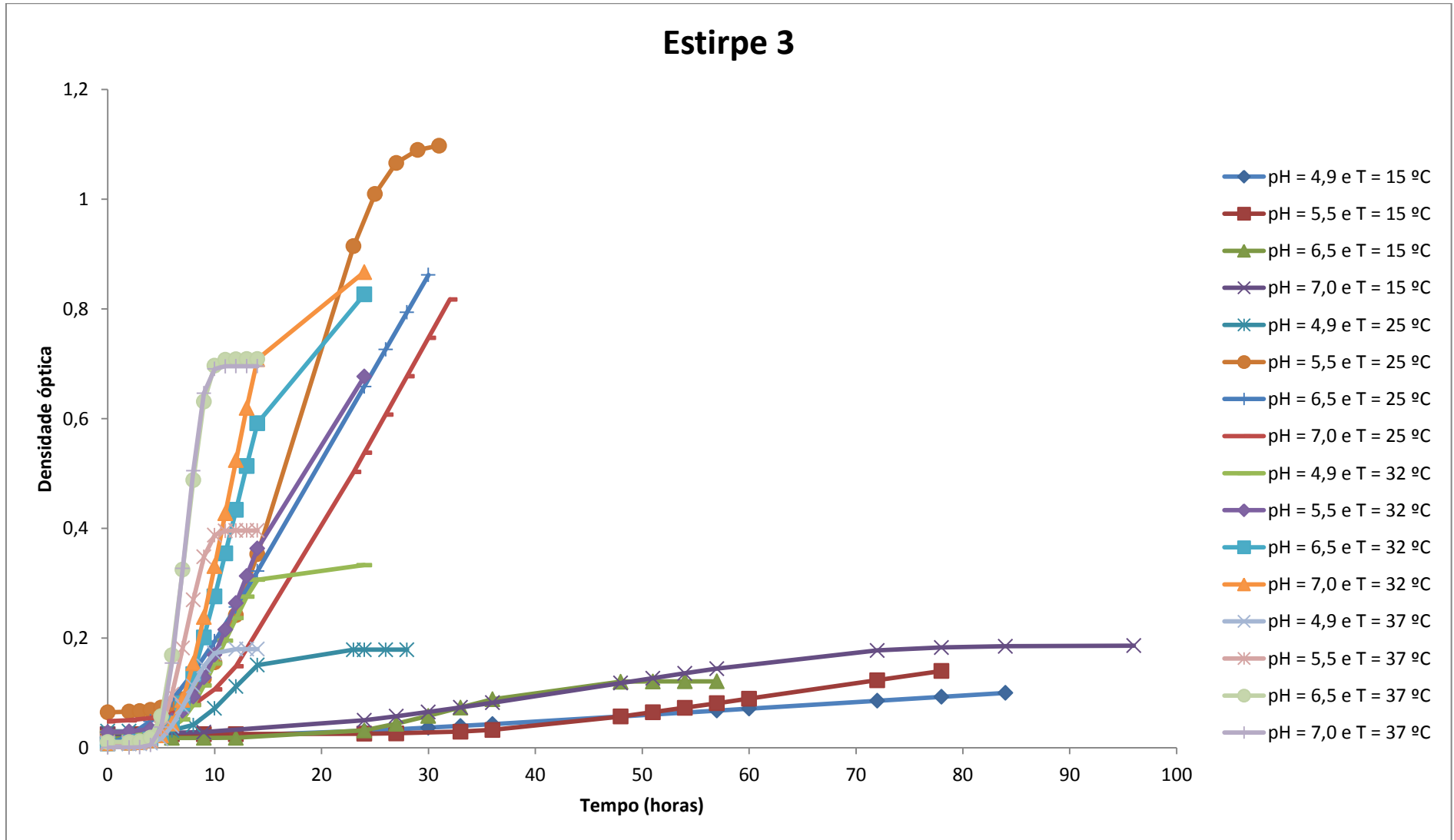


Figura 3 – Curvas de multiplicação da estirpe 3 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

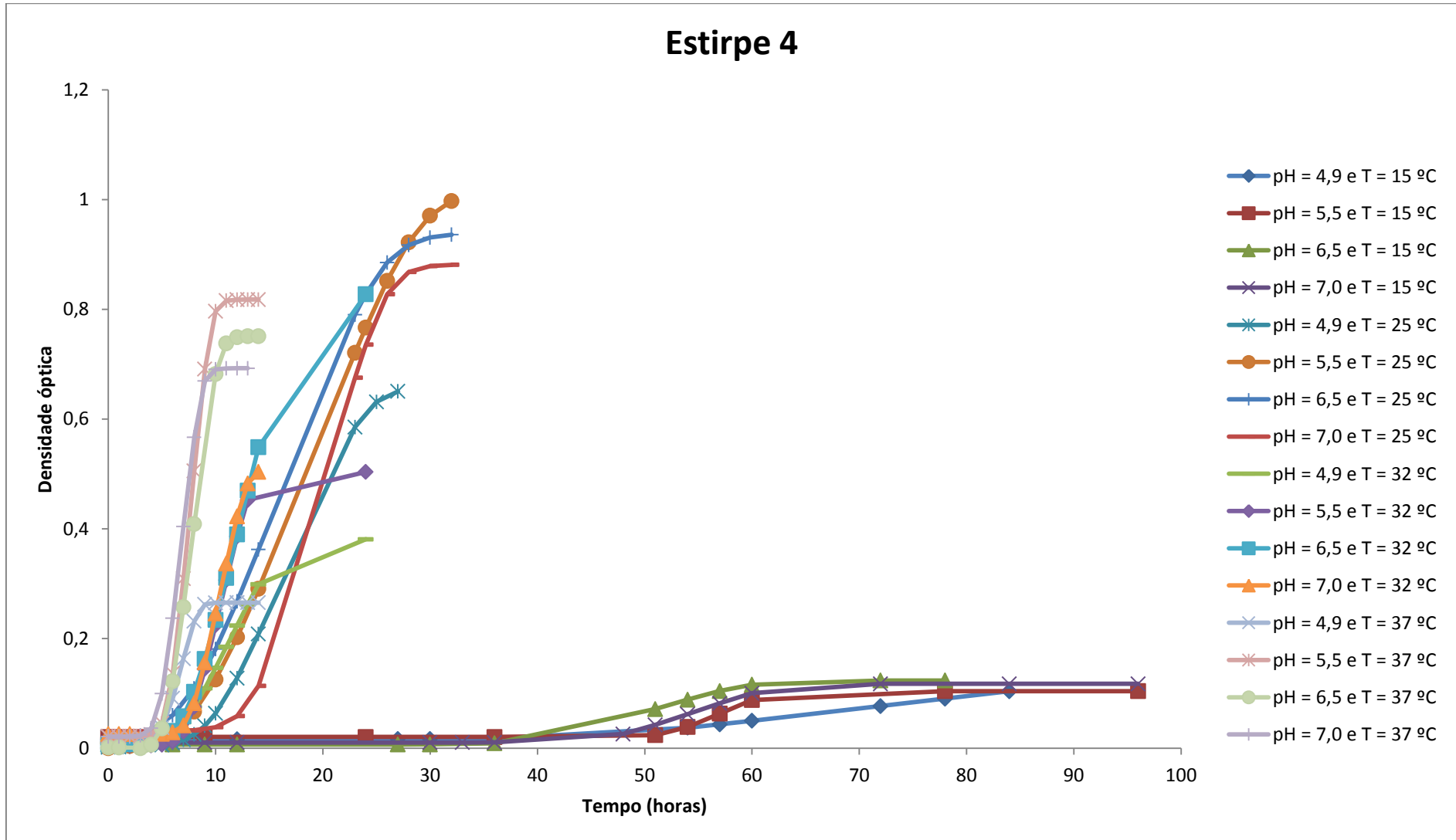


Figura 4– Curvas de multiplicação da estirpe 4 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

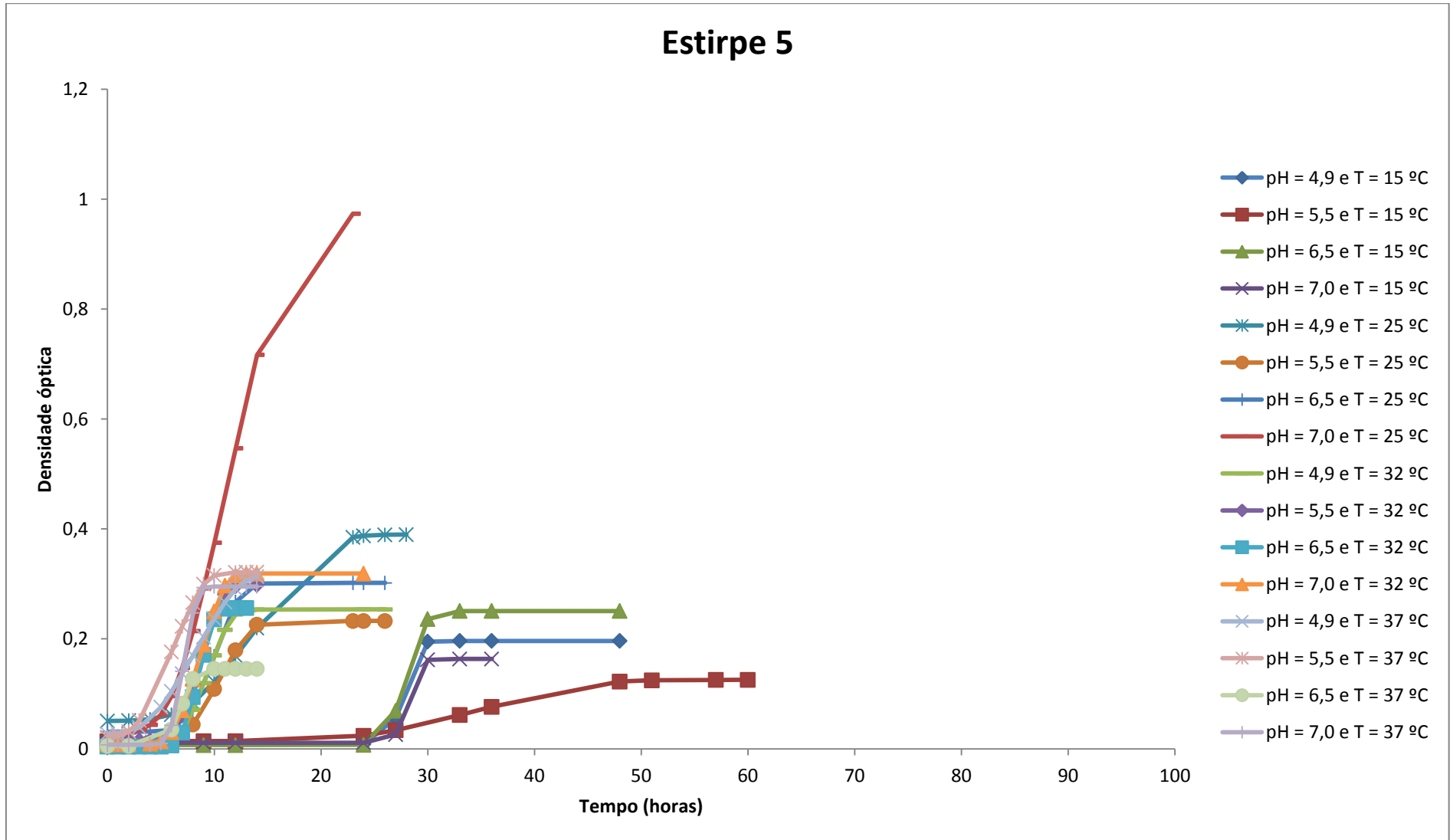


Figura 5 – Curvas de multiplicação da estirpe 5 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

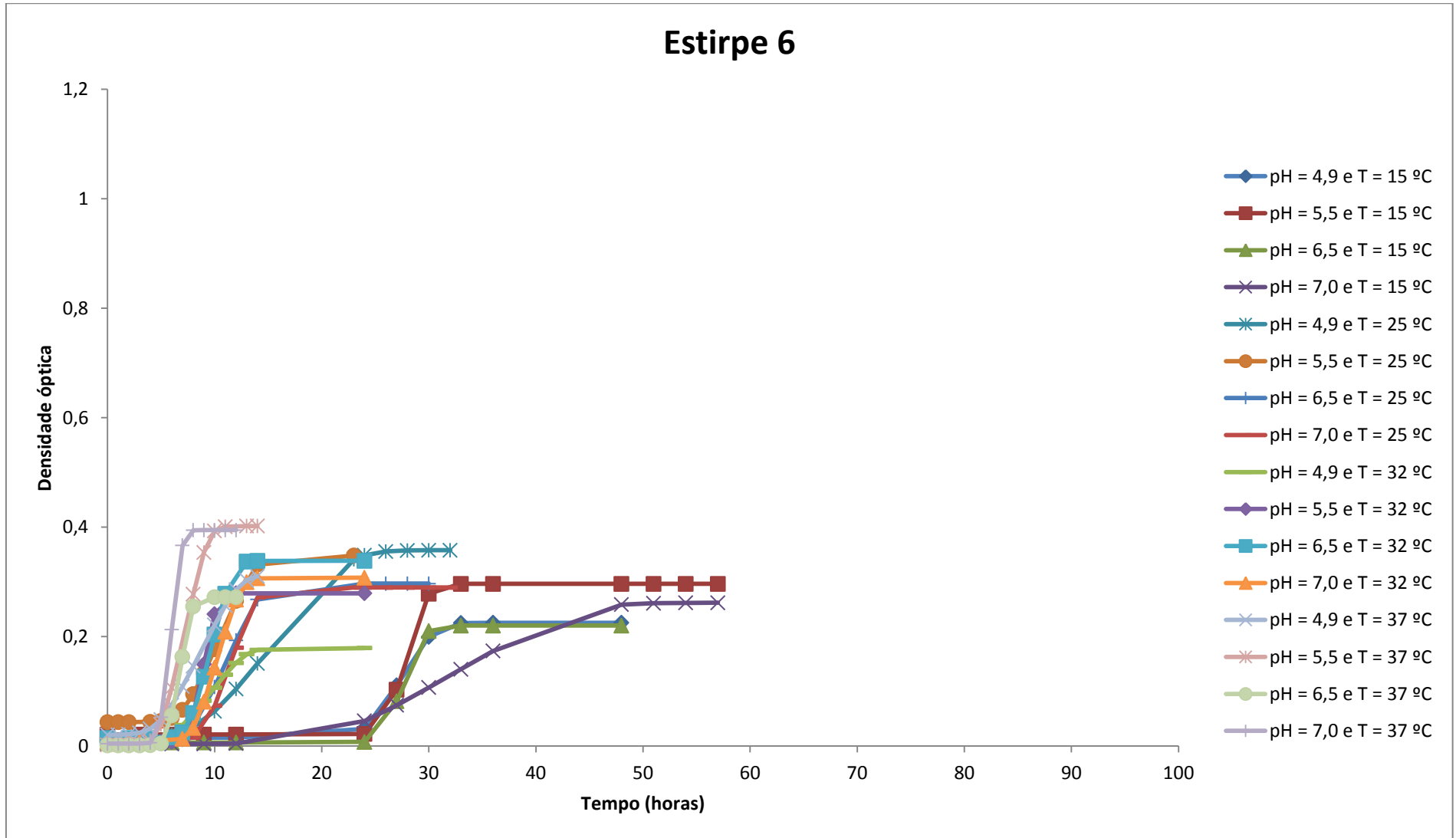


Figura 6 – Curvas de multiplicação da estirpe 6 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

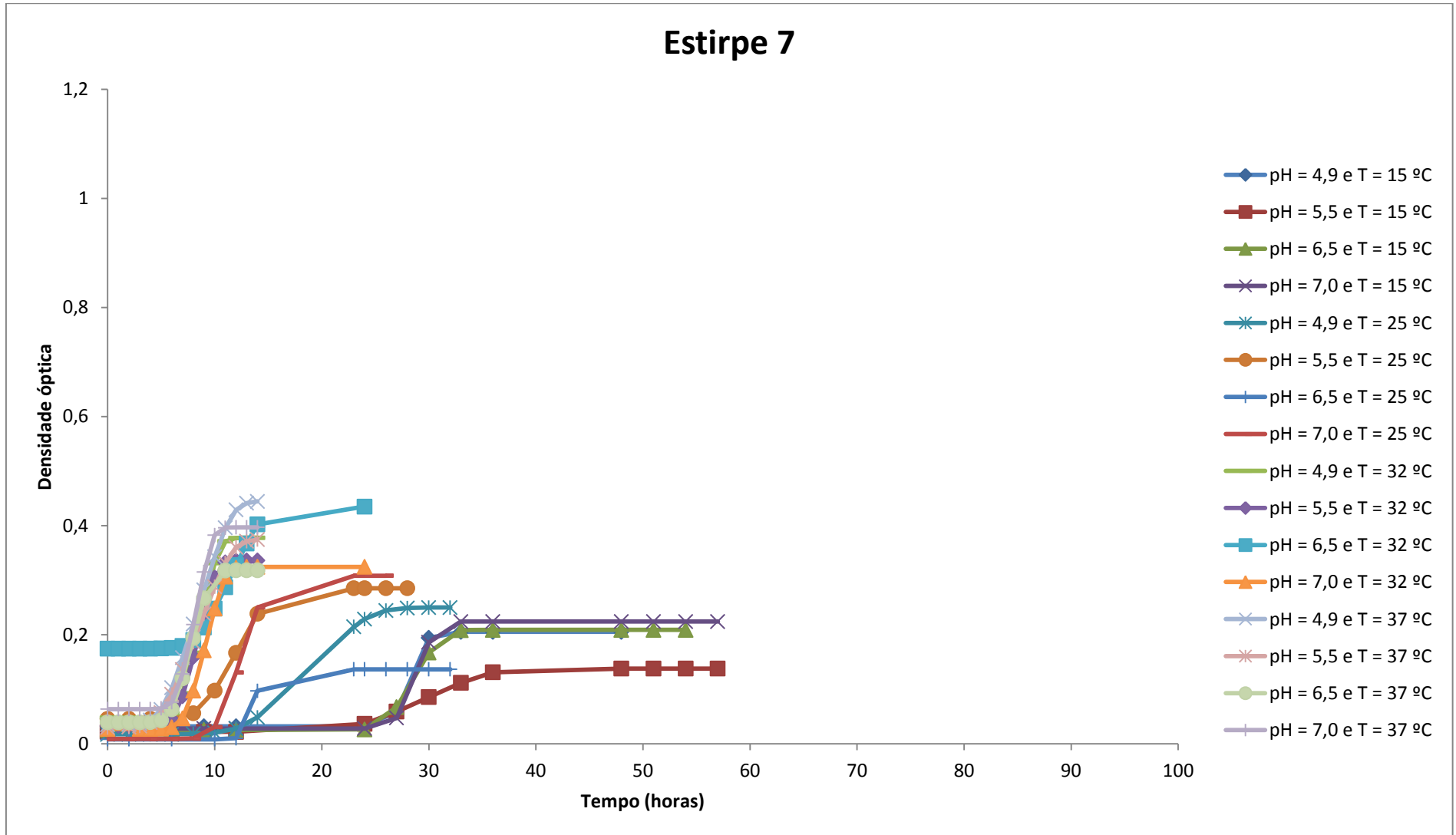


Figura 7 – Curvas de multiplicação da estirpe 7 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

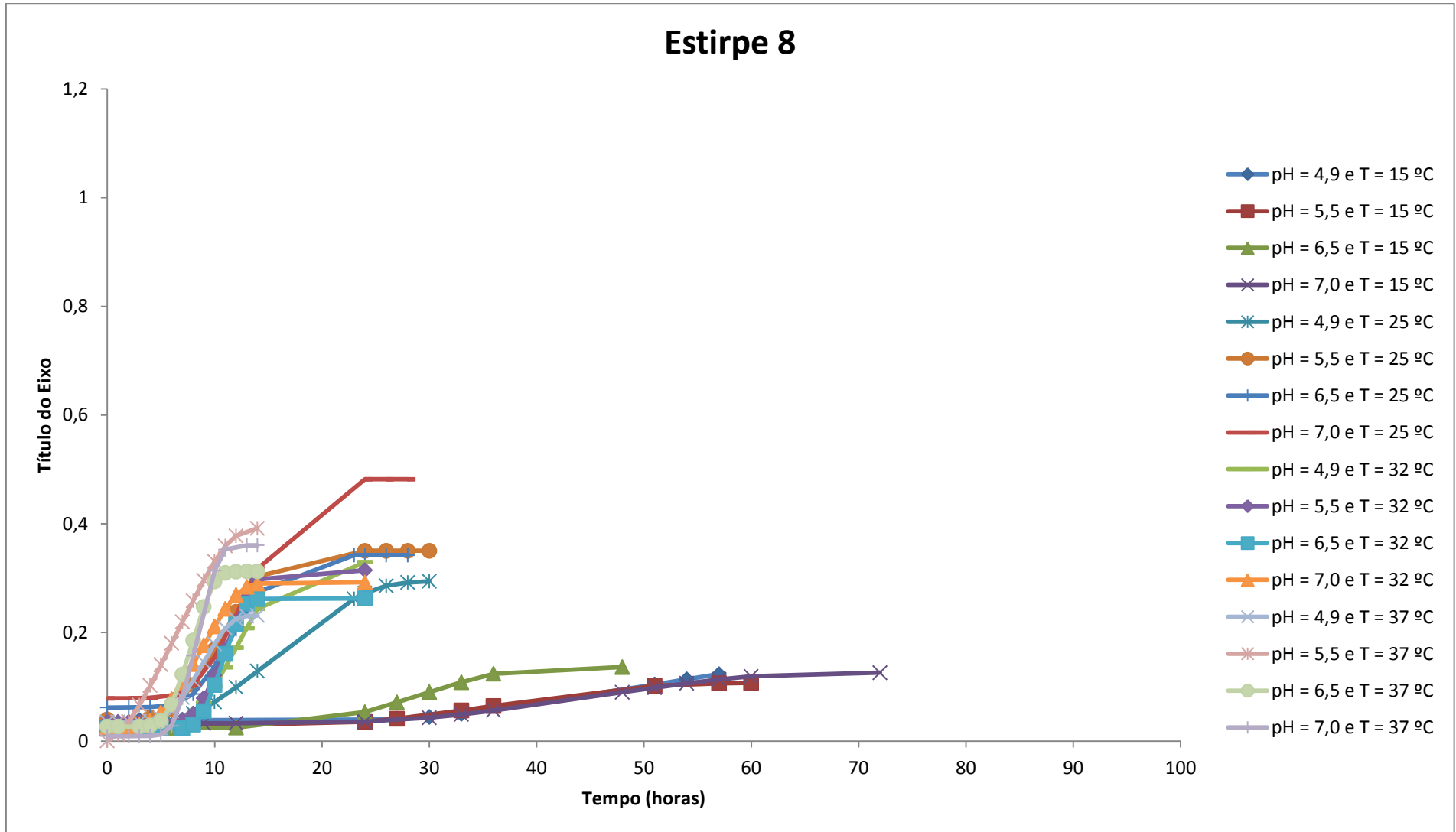


Figura 8 – Curvas de multiplicação da estirpe 8 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

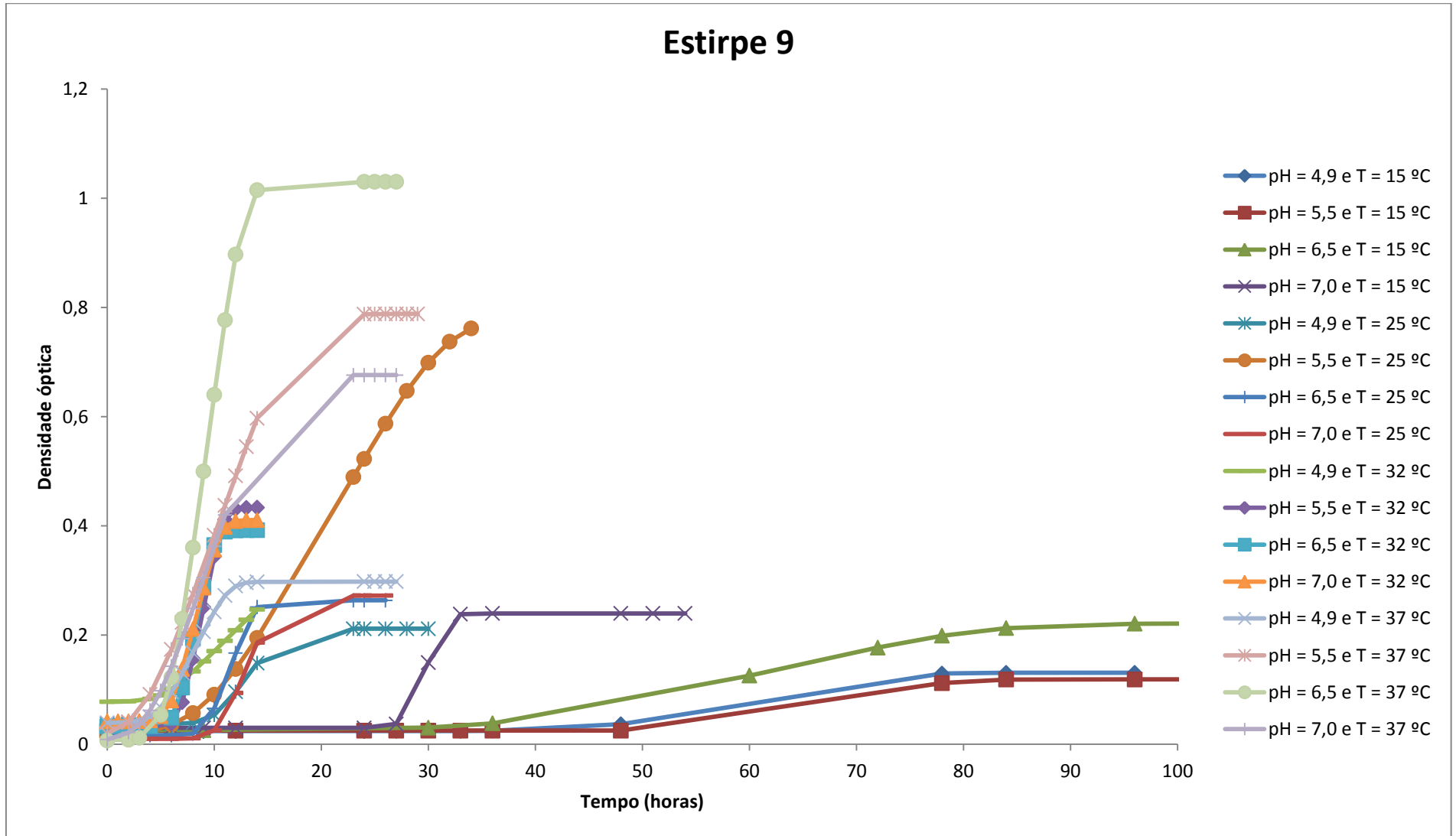


Figura 9 – Curvas de multiplicação da estirpe 9 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

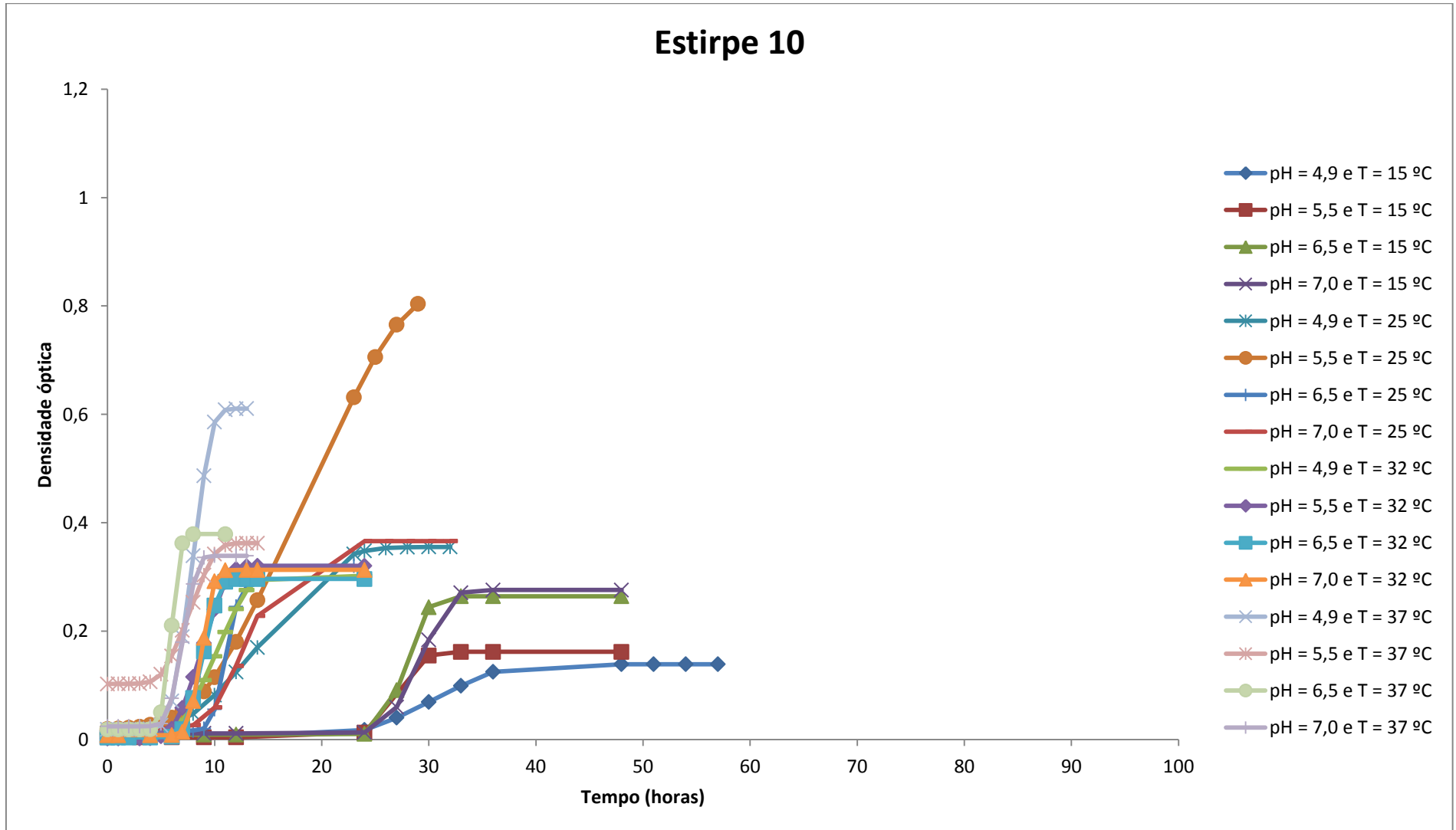


Figura 10 – Curvas de multiplicação da estirpe 10 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

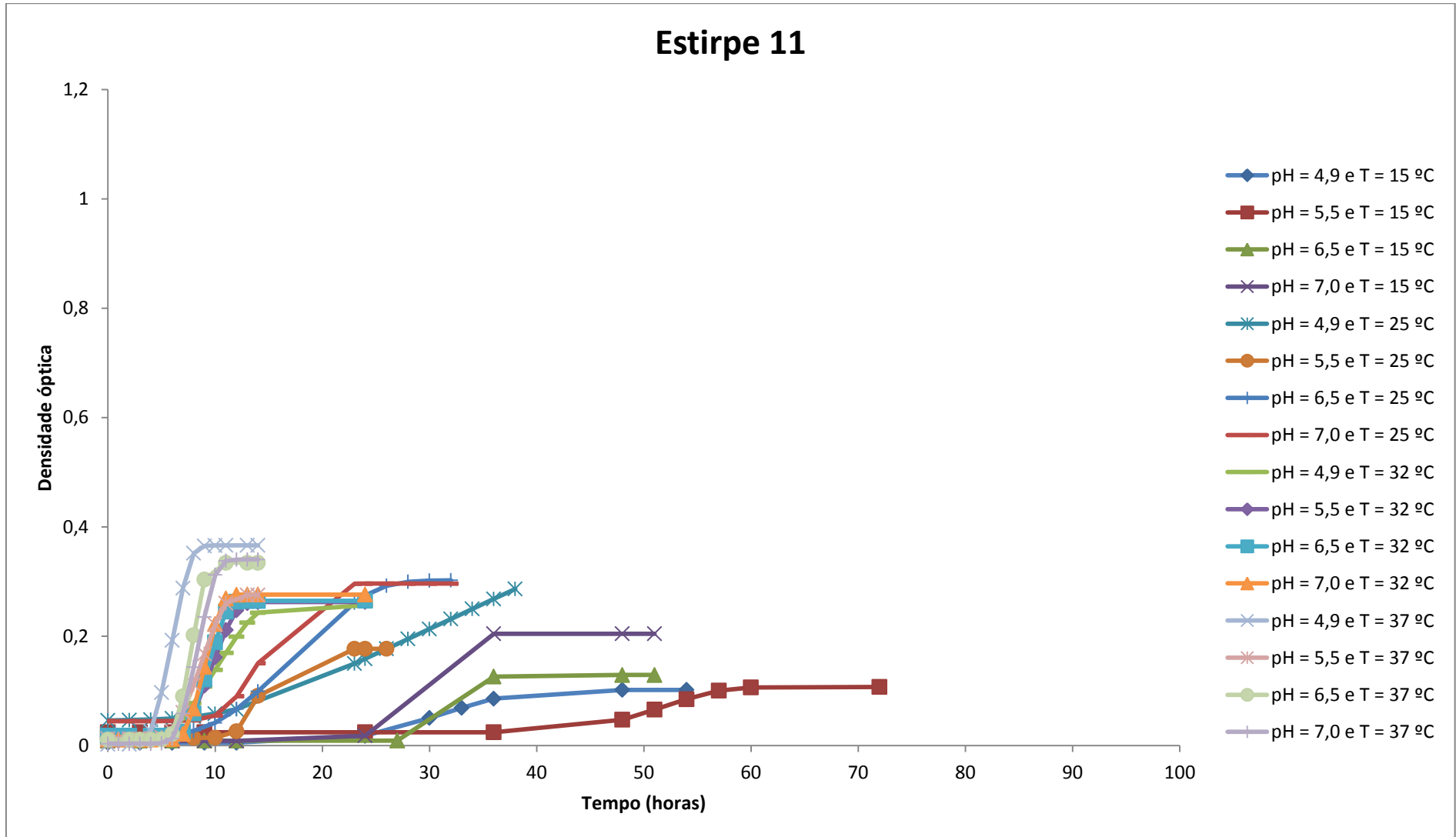


Figura 11 – Curvas de multiplicação da estirpe 11 de *B. cereus* em relação aos diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

Tabela 1 – Análise estatística das taxas máxima de multiplicação (μ) das diferentes estirpes de *Bacillus cereus* nas diferentes temperaturas e pH's

| Parâmetro de crescimento | Temperatura (°C) | pH | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 |
|--------------------------|------------------|-----|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| μ (h ⁻¹) | 15 | 4,9 | 0,004 ± 0,003 ^c | 0,023 ± 0,036 ^{abc} | 0,001 ± 0,0001 ^c | 0,002 ± 0,001 ^c | 0,049 ± 0,019 ^{ab} | 0,042 ± 0,020 ^{abc} | 0,051 ± 0,028 ^a | 0,004 ± 0,002 ^c | 0,007 ± 0,009 ^{bc} | 0,024 ± 0,017 ^{abc} | 0,006 ± 0,003 ^c |
| | | 5,5 | 0,005 ± 0,004 ^a | 0,005 ± 0,003 ^a | 0,012 ± 0,066 ^a | 0,007 ± 0,002 ^a | 0,063 ± 0,068 ^a | 0,045 ± 0,025 ^a | 0,037 ± 0,027 ^a | 0,006 ± 0,008 ^a | 0,016 ± 0,012 ^a | 0,076 ± 0,034 ^a | 0,004 ± 0,079 ^a |
| | | 6,5 | 0,018 ± 0,024 ^{ab} | 0,008 ± 0,011 ^b | 0,011 ± 0,009 ^b | 0,005 ± 0,003 ^b | 0,077 ± 0,044 ^{ab} | 0,056 ± 0,015 ^{ab} | 0,039 ± 0,019 ^{ab} | 0,004 ± 0,002 ^b | 0,033 ± 0,055 ^{ab} | 0,089 ± 0,054 ^a | 0,023 ± 0,021 ^{ab} |
| | | 7,0 | 0,013 ± 0,019 ^a | 0,040 ± 0,073 ^a | 0,024 ± 0,042 ^a | 0,004 ± 0,002 ^a | 0,047 ± 0,024 ^a | 0,074 ± 0,057 ^a | 0,110 ± 0,100 ^a | 0,004 ± 0,001 ^a | 0,015 ± 0,022 ^a | 0,024 ± 0,014 ^a | 0,088 ± 0,092 ^a |
| | 25 | 4,9 | 0,031 ± 0,011 ^a | 0,036 ± 0,030 ^a | 0,022 ± 0,012 ^a | 0,027 ± 0,014 ^a | 0,057 ± 0,055 ^a | 0,044 ± 0,027 ^a | 0,048 ± 0,033 ^a | 0,023 ± 0,014 ^a | 0,029 ± 0,011 ^a | 0,030 ± 0,009 ^a | 0,018 ± 0,022 ^a |
| | | 5,5 | 0,037 ± 0,011 ^a | 0,044 ± 0,025 ^a | 0,048 ± 0,012 ^a | 0,089 ± 0,067 ^a | 0,039 ± 0,032 ^a | 0,045 ± 0,006 ^a | 0,050 ± 0,039 ^a | 0,101 ± 0,127 ^a | 0,163 ± 0,265 ^a | 0,038 ± 0,005 ^a | 0,023 ± 0,015 ^a |
| | | 6,5 | 0,042 ± 0,017 ^a | 0,084 ± 0,041 ^a | 0,066 ± 0,056 ^a | 0,046 ± 0,005 ^a | 0,052 ± 0,002 ^a | 0,055 ± 0,009 ^a | 0,061 ± 0,008 ^a | 0,042 ± 0,009 ^a | 0,058 ± 0,021 ^a | 0,063 ± 0,027 ^a | 0,038 ± 0,034 ^a |
| | | 7,0 | 0,055 ± 0,008 ^a | 0,141 ± 0,161 ^a | 0,037 ± 0,007 ^a | 0,059 ± 0,010 ^a | 0,072 ± 0,012 ^a | 0,070 ± 0,035 ^a | 0,084 ± 0,028 ^a | 0,039 ± 0,007 ^a | 0,027 ± 0,015 ^a | 0,057 ± 0,034 ^a | 0,052 ± 0,021 ^a |
| | 32 | 4,9 | 0,038 ± 0,002 ^a | 0,054 ± 0,006 ^a | 0,072 ± 0,045 ^a | 0,051 ± 0,036 ^a | 0,030 ± 0,015 ^a | 0,083 ± 0,058 ^a | 0,056 ± 0,029 ^a | 0,045 ± 0,015 ^a | 0,050 ± 0,021 ^a | 0,045 ± 0,003 ^a | 0,029 ± 0,006 ^a |
| | | 5,5 | 0,065 ± 0,008 ^a | 0,086 ± 0,006 ^a | 0,103 ± 0,040 ^a | 0,077 ± 0,014 ^a | 0,058 ± 0,025 ^a | 0,076 ± 0,034 ^a | 0,072 ± 0,023 ^a | 0,046 ± 0,009 ^a | 0,084 ± 0,017 ^a | 0,096 ± 0,056 ^a | 0,055 ± 0,014 ^a |
| | | 6,5 | 0,076 ± 0,007 ^a | 0,086 ± 0,011 ^a | 0,108 ± 0,048 ^a | 0,083 ± 0,005 ^a | 0,066 ± 0,039 ^a | 0,110 ± 0,054 ^a | 0,072 ± 0,021 ^a | 0,046 ± 0,010 ^a | 0,084 ± 0,019 ^a | 0,077 ± 0,009 ^a | 0,072 ± 0,014 ^a |
| | | 7,0 | 0,087 ± 0,017 ^{ab} | 0,081 ± 0,003 ^{ab} | 0,113 ± 0,035 ^a | 0,086 ± 0,006 ^{ab} | 0,102 ± 0,062 ^{ab} | 0,066 ± 0,00 ^{ab} | 0,069 ± 0,014 ^{ab} | 0,051 ± 0,012 ^b | 0,089 ± 0,016 ^{ab} | 0,092 ± 0,027 ^{ab} | 0,078 ± 0,013 ^{ab} |
| | 37 | 4,9 | 0,054 ± 0,014 ^a | 0,060 ± 0,044 ^a | 0,095 ± 0,135 ^a | 0,115 ± 0,099 ^a | 0,118 ± 0,157 ^a | 0,053 ± 0,027 ^a | 0,041 ± 0,015 ^a | 0,042 ± 0,014 ^a | 0,045 ± 0,007 ^a | 0,066 ± 0,059 ^a | 0,057 ± 0,031 ^a |
| | | 5,5 | 0,066 ± 0,022 ^{bc} | 0,066 ± 0,025 ^{bc} | 0,224 ± 0,157 ^a | 0,190 ± 0,021 ^{ab} | 0,084 ± 0,054 ^{bc} | 0,068 ± 0,015 ^{bc} | 0,058 ± 0,015 ^{bc} | 0,049 ± 0,027 ^c | 0,086 ± 0,029 ^{bc} | 0,053 ± 0,031 ^c | 0,072 ± 0,041 ^{bc} |
| | | 6,5 | 0,101 ± 0,029 ^a | 0,131 ± 0,042 ^a | 0,159 ± 0,025 ^a | 0,125 ± 0,064 ^a | 0,097 ± 0,043 ^a | 0,120 ± 0,029 ^a | 0,095 ± 0,013 ^a | 0,077 ± 0,031 ^a | 0,119 ± 0,019 ^a | 0,107 ± 0,056 ^a | 0,121 ± 0,014 ^a |
| | | 7,0 | 0,080 ± 0,023 ^a | 0,141 ± 0,037 ^a | 0,124 ± 0,042 ^a | 0,093 ± 0,054 ^a | 0,117 ± 0,019 ^a | 0,094 ± 0,066 ^a | 0,107 ± 0,033 ^a | 0,083 ± 0,006 ^a | 0,091 ± 0,031 ^a | 0,099 ± 0,043 ^a | 0,117 ± 0,027 ^a |

E1: estirpe 1; E2: estirpe 2; E3: estirpe 3; E4: estirpe 4; E5: estirpe 5; E6: estirpe 6; E7: estirpe 7; E8: estirpe 8; E9: estirpe 9; E10: estirpe 10; E11: estirpe 11.

a,b,c Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas em relação ao crescimento de *B. cereus* de acordo com ANOVA ($P < 0,05$). Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 2 – Análise estatística do tempo de lag (λ) das diferentes estirpes de *Bacillus cereus* nas diferentes temperaturas e pH's

| Parâmetro de crescimento | Temperatura (°C) | pH | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 |
|--------------------------|------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| λ (h) | 15 | 4,9 | 22,6 ± 8,7 ^b | 41,4 ± 10,8 ^{ab} | 27,2 ± 12,9 ^{ab} | 45,3 ± 2,4 ^a | 28,2 ± 3,1 ^{ab} | 25,8 ± 1,2 ^{ab} | 25,9 ± 1,2 ^{ab} | 26,8 ± 9,9 ^{ab} | 42,3 ± 16,3 ^{ab} | 24,3 ± 2,3 ^b | 26,6 ± 5,0 ^{ab} |
| | | 5,5 | 23,8 ± 5,9 ^b | 41,3 ± 12,6 ^{ab} | 42,1 ± 9,9 ^{ab} | 48,9 ± 2,2 ^a | 25,4 ± 1,7 ^b | 25,4 ± 1,8 ^b | 25,5 ± 1,7 ^b | 27,7 ± 4,1 ^b | 42,7 ± 17,1 ^{ab} | 26,0 ± 1,1 ^b | 40,7 ± 11,1 ^{ab} |
| | | 6,5 | 29,4 ± 12,3 ^{abc} | 18,9 ± 5,1 ^c | 31,7 ± 8,7 ^{abc} | 43,5 ± 5,9 ^a | 26,1 ± 0,9 ^{bc} | 26,2 ± 0,6 ^{bc} | 25,3 ± 1,9 ^{bc} | 24,4 ± 7,6 ^{bc} | 39,0 ± 10,1 ^{ab} | 26,1 ± 0,5 ^{bc} | 30,9 ± 1,9 ^{abc} |
| | | 7 | 21,2 ± 4,3 ^c | 19,2 ± 5,5 ^c | 19,3 ± 5,2 ^c | 37,5 ± 7,4 ^a | 25,6 ± 2,0 ^{bc} | 25,4 ± 2,9 ^c | 26,8 ± 0,2 ^{abc} | 29,1 ± 1,9 ^{abc} | 37,3 ± 9,8 ^{ab} | 24,8 ± 1,0 ^c | 28,4 ± 3,3 ^{abc} |
| | 25 | 4,9 | 7,2 ± 2,5 ^a | 11,4 ± 1,5 ^a | 11,3 ± 5,2 ^a | 8,7 ± 0,9 ^a | 8,2 ± 2,3 ^a | 10,8 ± 5,0 ^a | 12,4 ± 4,2 ^a | 10,5 ± 6,3 ^a | 11,5 ± 2,8 ^a | 7,8 ± 0,5 ^a | 9,9 ± 3,0 ^a |
| | | 5,5 | 5,8 ± 1,8 ^a | 8,8 ± 3,4 ^a | 8,7 ± 1,1 ^a | 10,1 ± 2,1 ^a | 9,9 ± 3,5 ^a | 8,3 ± 1,2 ^a | 8,4 ± 3,2 ^a | 6,2 ± 2,4 ^a | 7,4 ± 1,8 ^a | 8,5 ± 0,9 ^a | 8,9 ± 3,2 ^a |
| | | 6,5 | 5,3 ± 1,6 ^c | 9,7 ± 2,9 ^{ab} | 6,1 ± 2,7 ^{bc} | 6,7 ± 1,1 ^{abc} | 5,9 ± 2,6 ^{bc} | 7,8 ± 0,2 ^{abc} | 10,7 ± 1,9 ^a | 7,4 ± 0,9 ^{abc} | 9,1 ± 0,7 ^{abc} | 9,0 ± 0,6 ^{abc} | 8,6 ± 1,4 ^{abc} |
| | | 7 | 6,6 ± 2,5 ^b | 11,5 ± 1,4 ^a | 6,6 ± 2,4 ^b | 11,3 ± 2,2 ^a | 7,9 ± 1,3 ^{ab} | 9,7 ± 1,4 ^{ab} | 11,3 ± 0,9 ^a | 7,4 ± 1,7 ^{ab} | 6,7 ± 2,4 ^b | 8,5 ± 1,6 ^{ab} | 9,4 ± 1,9 ^{ab} |
| | 32 | 4,9 | 6,9 ± 0,5 ^a | 7,2 ± 0,5 ^a | 7,8 ± 0,6 ^a | 7,5 ± 1,4 ^a | 13,1 ± 14,0 ^a | 14,9 ± 14,9 ^a | 7,5 ± 1,4 ^a | 8,9 ± 4,2 ^a | 6,7 ± 1,1 ^a | 6,7 ± 0,4 ^a | 5,9 ± 1,0 ^a |
| | | 5,5 | 7,9 ± 0,4 ^a | 7,4 ± 0,3 ^a | 7,6 ± 0,4 ^a | 7,3 ± 1,4 ^a | 9,4 ± 5,2 ^a | 9,6 ± 2,5 ^a | 7,4 ± 0,9 ^a | 8,4 ± 2,3 ^a | 6,9 ± 0,5 ^a | 7,1 ± 0,7 ^a | 7,3 ± 0,2 ^a |
| | | 6,5 | 8,0 ± 0,3 ^a | 7,4 ± 0,4 ^a | 7,7 ± 0,9 ^a | 7,9 ± 1,3 ^a | 9,5 ± 4,6 ^a | 9,2 ± 1,7 ^a | 7,5 ± 0,7 ^a | 8,1 ± 1,5 ^a | 6,5 ± 0,3 ^a | 6,8 ± 0,6 ^a | 7,6 ± 0,4 ^a |
| | | 7 | 8,2 ± 0,4 ^a | 7,1 ± 0,8 ^a | 7,4 ± 0,9 ^a | 8,0 ± 0,9 ^a | 10,6 ± 7,4 ^a | 8,9 ± 2,1 ^a | 7,6 ± 0,9 ^a | 7,5 ± 2,5 ^a | 6,4 ± 0,8 ^a | 7,4 ± 0,2 ^a | 7,6 ± 0,5 ^a |
| 37 | 4,9 | 3,0 ± 0,9 ^a | 5,6 ± 1,3 ^a | 5,9 ± 1,1 ^a | 5,6 ± 0,4 ^a | 3,6 ± 1,1 ^a | 4,9 ± 1,1 ^a | 5,8 ± 1,1 ^a | 5,0 ± 2,1 ^a | 3,7 ± 1,4 ^a | 6,0 ± 0,5 ^a | 5,9 ± 1,4 ^a | |
| | 5,5 | 3,7 ± 0,5 ^a | 4,7 ± 0,5 ^a | 5,3 ± 0,7 ^a | 5,9 ± 0,2 ^a | 3,8 ± 0,9 ^a | 4,8 ± 0,5 ^a | 4,8 ± 1,0 ^a | 15,0 ± 21,4 ^a | 5,2 ± 1,4 ^a | 5,5 ± 0,9 ^a | 5,2 ± 0,9 ^a | |
| | 6,5 | 4,2 ± 0,6 ^a | 5,6 ± 0,2 ^a | 4,6 ± 1,0 ^a | 5,5 ± 0,9 ^a | 4,5 ± 0,9 ^a | 5,6 ± 0,4 ^a | 5,5 ± 0,6 ^a | 5,3 ± 1,1 ^a | 5,4 ± 0,5 ^a | 6,1 ± 1,1 ^a | 6,2 ± 1,4 ^a | |
| | 7 | 4,5 ± 1,7 ^a | 6,3 ± 0,8 ^a | 4,6 ± 1,1 ^a | 4,8 ± 0,4 ^a | 4,3 ± 1,3 ^a | 4,9 ± 1,3 ^a | 6,3 ± 2,4 ^a | 5,4 ± 1,0 ^a | 4,8 ± 0,5 ^a | 4,7 ± 1,0 ^a | 5,8 ± 1,0 ^a | |

E1: estirpe 1; E2: estirpe 2; E3: estirpe 3; E4: estirpe 4; E5: estirpe 5; E6: estirpe 6; E7: estirpe 7; E8: estirpe 8; E9: estirpe 9; E10: estirpe 10; E11: estirpe 11.

a,b,c Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas em relação ao crescimento de *B. cereus* de acordo com ANOVA (P<0,05). Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Na Tabela 1 estão representadas as médias e os desvios padrão dos valores referentes à taxa máxima de multiplicação (μ) e a Tabela 2 apresenta as médias e os desvios padrão dos valores referentes ao tempo de lag (λ) das diferentes estirpes de *B. cereus* nas temperaturas (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C) e pH's estudados (4,9; 5,5; 6,5; 7,0).

Como observado nas Tabelas 1 e 2, ocorreu diferença estatística entre algumas estirpes quando foram comparadas entre si em uma determinada temperatura e pH.

Analisando a Tabela 1 para taxa máxima de multiplicação (μ), ocorreu diferença estatística pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade entre as estirpes na temperatura de 15 °C e pH de 4,9, temperatura de 15 °C e pH de 6,5, temperatura de 32 °C e pH de 7,0 e temperatura de 37 °C e pH de 5,5. Já, quando se observa a Tabela 2 para o tempo de lag (λ), encontra-se diferença estatística pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade entre as estirpes na temperatura de 15 °C e pH de 4,9, temperatura de 15 °C e pH de 5,5, temperatura de 15 °C e pH de 6,5, temperatura de 15 °C e pH de 7,0, temperatura de 25 °C e pH de 6,5 e temperatura de 25 °C e pH de 7,0, ocorrendo maiores diferenças em temperaturas mais baixas.

Pode ser observado neste trabalho que as maiores taxas de multiplicação (μ) acontecem nas temperaturas de 32 °C e 37 °C e nos valores de pH entre 6,5 e 7,0 (Tabelas 1 e 2) (Figuras 1 a 11). No entanto, a 15 °C nota-se que a taxa de multiplicação (μ) foi menor e o tempo de permanência na fase lag (λ) foi maior.

Choma et al. (2000) estudando a cinética de crescimento de *B. cereus* em temperaturas entre 5 °C e 10 °C observaram que não houve multiplicação de *B. cereus* em substrato comum, somente em meio enriquecido e sob determinadas condições de pH e aeração, sendo observado que na temperatura de 15 °C a taxa de multiplicação (μ) foi menor do que em temperaturas mais altas, além disso, pode ser observado um aumento na taxa de multiplicação (μ) quando ocorre um aumento do pH na mesma condição de temperatura.

Valero et al. (2003) avaliaram as curvas de crescimento em purê de cenoura estudando o efeito combinado de pH (5,0 a 5,5) e de temperatura (5 °C a 16 °C) em diferentes estirpes de *B. cereus*, com isso foi observado que em pH 5,0 e a 5 °C não houve crescimento de *B. cereus*. À medida que ia aumentando o pH e também a temperatura foi observada crescimento do micro-organismo.

Guérin et al. (2016) estudando o efeito combinado de anaerobiose, baixos valores de pH (5,0 a 7,0) e baixas temperaturas (8 °C e 10 °C) na cinética de crescimento de *B. cereus*, observaram melhores resultados quanto a taxa de multiplicação (μ) e fase lag (λ) em valores de pH mais altos como de 5,7 e 7,0 e temperatura de 10 °C.

Neste trabalho é possível notar uma baixa taxa de multiplicação de *B. cereus* na temperatura de 15 °C e em baixos valores de pH, isso foi observado independente da estirpe analisada (Figuras 1 a 11), lembrando que cada estirpe possui uma característica diferente, variando quanto ao produto lácteo obtido e também quanto às enterotoxinas produzidas. Com isto, é possível afirmar que a temperatura de refrigeração utilizada pelas indústrias de alimentos, é uma ferramenta importante para garantir a segurança e qualidade dos alimentos.

5.2. Modelagem secundária para avaliação da cinética de crescimento das diferentes estirpes de *Bacillus cereus*

5.2.1. Modelo secundário de Ratkowsky

Uma vez obtida a taxa de crescimento de *B. cereus*, foi ajustado o modelo secundário para cada estirpe baseado no modelo de Ratkowsky (RATKOWSKY et al., 1982) (Equações (19) a (29)). Os valores de R^2 , fator BIAS e fator exatidão para a taxa de crescimento dos modelos secundários para *B. cereus* estão indicados na Tabela 3, indicando um bom ajuste para algumas estirpes.

$$\sqrt{\mu} = 0,004397 (T - 1,640868)\sqrt{(pH - 2,542204)} \quad (19)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,005554 (T + 0,93093)\sqrt{(pH - 3,534051)} \quad (20)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,005259 (T - 6,716193)\sqrt{(pH - 0,755217)} \quad (21)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,002396 (T - 9,244979)\sqrt{(pH + 22,0154)} \quad (22)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,001267 (T + 88,6691)\sqrt{(pH - 3,06564)} \quad (23)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,001322 (T + 66,8829)\sqrt{(pH - 1,699142)} \quad (24)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,000803 (T + 137,672)\sqrt{(pH - 2,291785)} \quad (25)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,003676 (T - 5,089774)\sqrt{(pH - 1,064937)} \quad (26)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,003942 (T + 1,33194)\sqrt{(pH - 2,113339)} \quad (27)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,001593 (T + 51,9865)\sqrt{(pH - 2,155224)} \quad (28)$$

$$\sqrt{\mu} = 0,004276 (T + 8,31546)\sqrt{(pH - 3,845884)} \quad (29)$$

As Equações 19 a 29 mostram o modelo matemático de raiz quadrada que descrevem os efeitos das temperaturas e pH's para os valores da taxa máxima de crescimento de *B. cereus*.

Tabela 3– Valores de R², fator BIAS e fator exatidão para a taxa de crescimento dos modelos secundários para *Bacillus cereus*

| Estirpe | R ² | Fator BIAS | Fator exatidão |
|---------|----------------|------------|----------------|
| 1 | 0,96 | 1,11 | 0,98 |
| 2 | 0,89 | 1,20 | 0,95 |
| 3 | 0,96 | 1,17 | 0,96 |
| 4 | 0,95 | 1,13 | 0,98 |
| 5 | 0,78 | 1,13 | 0,99 |
| 6 | 0,81 | 1,07 | 0,99 |
| 7 | 0,75 | 1,09 | 0,99 |
| 8 | 0,96 | 1,12 | 0,98 |
| 9 | 0,91 | 1,13 | 0,99 |
| 10 | 0,75 | 1,14 | 0,99 |
| 11 | 0,87 | 1,17 | 0,96 |

Analisando a Tabela 3, observa-se que os valores de R² para todos os modelos foram maiores que 0,75 representando um bom ajuste para os modelos apresentados. Com relação ao fator BIAS, todos os modelos apresentaram valores maiores do que 1, indicando que a resposta predita é maior que a resposta observada. O fator exatidão mostra que os valores para os modelos foram menores do que 1, esse fator indica que quanto maior o valor, menor será a exatidão da estimativa da média. Neste trabalho o fator exatidão indicou que os modelos implementados predizem taxas de multiplicação com no máximo 2 % de desvio em relação ao dado experimental.

Avaliando o desempenho do modelo envolvendo micro-organismos patogênicos, Ross (1999) propôs para o fator BIAS a seguinte interpretação: 0,90 – 1,05, o modelo pode ser considerado bom; 0,70 – 0,90 e 1,06 – 1,15, o modelo pode ser considerado aceitável; < 0,70 ou > 1,15, o modelo é considerado inaceitável.

Portanto, ao analisar os resultados da Tabela 3 e comparar com a interpretação de Ross (1999), é possível verificar que os modelos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 podem ser considerados aceitáveis. E os modelos 2, 3 e 11 podem ser considerados perigosos. Quando o valor do fator BIAS é maior do que 1, o modelo sobre-estima as observações, sendo que as predições são consideradas perigosas. E quando esse valor é menor do que 1, o modelo pode ser considerado seguro. Portanto, observa-se que os valores foram maiores do que 1, sendo assim o modelo pode ser considerado aceitável, com exceção dos modelos 2, 3 e 11 que foram considerados perigosos.

O valor do fator exatidão foi obtido devido ao fato do valor do fator BIAS não fornecer indicação da precisão média das estimativas. Quando se obtém um valor de fator exatidão igual a 1, indica-se que há perfeita coerência entre todos os valores previstos e observados, como observado na Tabela 3, os fatores exatidões estão próximos de 1.

Foram obtidos bons ajustes do modelo secundário da raiz quadrada (Equações 19 a 29) aos dados dos parâmetros $\mu_{máx}$ em função da temperatura e do pH, com valores de R^2 maiores que 0,75, e menores que 0,96, para todos os casos, como mostrado na Tabela 3.

Grijnspeerdt e De Reu (2005) estudaram o crescimento de *B. cereus* e *Enterobacter cloacae* e utilizaram o modelo de raiz quadrada proposto por Ratkowsky et al. (1982) para prever o crescimento desses micro-organismos em ovo líquido usando temperaturas de 15 °C e 20 °C. Com base nisto, eles observaram que o modelo primário de Baranyi quando combinado com o modelo de Ratkowsky apresentou um bom ajuste com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95, sendo possível demonstrar que esse modelo é o mais frequente para o uso na microbiologia preditiva.

Heo et al. (2009) estudaram um modelo de superfície de resposta para descrever o efeito da temperatura e do pH no crescimento de *B. cereus* em arroz cozido. Os valores obtidos utilizando as equações do modelo estavam em estreita

concordância com os valores experimentais ($R^2 = 0,9864$). A taxa de crescimento de *B. cereus* envolveu tanto um fator BIAS quanto um fator exatidão, que apresentaram, respectivamente, os valores de 1,006 e 1,011 aproximaram-se de 1,0 e estavam dentro de intervalos aceitáveis.

Um estudo realizado por Posada-Izquierdo et al. (2013), em que os autores avaliaram a influência de diferentes temperaturas de armazenamento (4 °C, 8 °C, 13 °C e 16 °C) sobre a taxa máxima de crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada em alface minimamente processada, os autores puderam observar que esse modelo de Ratkowsky et al. (1982) apresentou um ótimo ajuste e obteve um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,80.

Luo et al. (2015) modelando o efeito das temperaturas de armazenamento sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes* em presunto e salsicha, observaram que o modelo de Ratkowsky et al. (1982) apresentou um ótimo ajuste e obteve um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,98, fator BIAS de 0,99 e fator exatidão de 1,01 quando analisaram a taxa de crescimento.

Scolforo et al. (2017) estudando a modelagem da multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* na polpa e na casca de melões, utilizaram o modelo secundário de Ratkowsky e obtiveram um valor de R^2 maior que 0,97 tanto para a casca quanto para a polpa de *L. monocytogenes* e R^2 de 0,98 para casca e 0,85 para a polpa de *S. enterica*, apresentando bom ajuste do modelo.

Diante do exposto, ao analisar os valores encontrados para os índices estatísticos, pode-se afirmar que o modelo de Ratkowsky (RATKOWSKY et al., 1982) apresentou bons resultados. Portanto, ao avaliar os fatores acima, pode-se dizer que, a capacidade do modelo preditivo foi adequado para a proposta de avaliar o crescimento de *B. cereus* para diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

5.2.2. Modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado

O modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado (DAVEY, 1991) foi proposto para o tempo de lag (λ) (Equações (30) a (40)). Os valores de R^2 , fator BIAS e fator exatidão para o tempo de lag dos modelos secundários para *B. cereus* estão indicados na Tabela 4, indicando um bom ajuste.

$$\ln(\lambda) = -0,232599 + \frac{12,12929}{T} + \frac{303,6826}{T^2} + 0,369614 \times pH - 0,026549 \times pH^2 \quad (30)$$

$$\ln(\lambda) = 3,82233 + \frac{66,03278}{T} - \frac{274,015}{T^2} - 1,16669 \times pH + 0,09066 \times pH^2 \quad (31)$$

$$\ln(\lambda) = -0,794007 + \frac{8,91614}{T} + \frac{341,8267}{T^2} + 0,854318 \times pH - 0,084281 \times pH^2 \quad (32)$$

$$\ln(\lambda) = 1,057614 + \frac{5,78414}{T} + \frac{477,7923}{T^2} + 0,094403 \times pH - 0,009879 \times pH^2 \quad (33)$$

$$\ln(\lambda) = 2,824656 + \frac{58,92027}{T} - \frac{205,761}{T^2} - 0,850992 \times pH + 0,06872 \times pH^2 \quad (34)$$

$$\ln(\lambda) = 4,835823 + \frac{52,91335}{T} - \frac{185,873}{T^2} - 1,41308 \times pH + 0,113812 \times pH^2 \quad (35)$$

$$\ln(\lambda) = 4,581634 + \frac{75,97903}{T} - \frac{406,319}{T^2} - 1,59268 \times pH + 0,135457 \times pH^2 \quad (36)$$

$$\ln(\lambda) = 5,517126 + \frac{10,4044}{T} + \frac{301,3105}{T^2} - 1,43279 \times pH + 0,118108 \times pH^2 \quad (37)$$

$$\ln(\lambda) = -0,914625 + \frac{22,38759}{T} + \frac{320,4934}{T^2} + 0,617919 \times pH - 0,055028 \times pH^2 \quad (38)$$

$$\ln(\lambda) = -0,977305 + \frac{16,2951}{T} + \frac{221,8905}{T^2} + 0,726804 \times pH - 0,06071 \times pH^2 \quad (39)$$

$$\ln(\lambda) = -1,4944 + \frac{20,05103}{T} + \frac{235,1644}{T^2} + 0,851676 \times pH - 0,069709 \times pH^2 \quad (40)$$

As Equações 30 a 40 mostram o modelo matemático polinomial com equações quadráticas que descrevem os efeitos das temperaturas e pH's para os valores de tempo de lag em *B. cereus*.

Como observado na Tabela 4, os valores de R² para todos os modelos foram maiores que 0,88, representando um bom ajuste para os modelos apresentados. Com relação ao fator BIAS, os modelos 1, 5, 6, 7 e 10 apresentaram valores menores do que 1, indicando que a resposta predita é menor que a resposta observada, porém é um bom modelo, pois seus valores estão próximos de 1. E os modelos 2, 3, 4, 8, 9 e 11 apresentaram o fator BIAS igual a 1, ou seja, a resposta predita é igual a observada. O fator exatidão mostra que os valores para todos os modelos foram maiores do que 1, indicando que quanto maior o valor, menor será a exatidão da estimativa da média.

Tabela 4 – Valores de R^2 , fator BIAS e fator exatidão para o tempo de lag dos modelos secundários para *Bacillus cereus*

| Estirpe | R^2 | Fator BIAS | Fator exatidão |
|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 0,93 | 0,99 | 1,13 |
| 2 | 0,95 | 1,00 | 1,07 |
| 3 | 0,96 | 1,00 | 1,07 |
| 4 | 0,98 | 1,00 | 1,05 |
| 5 | 0,88 | 0,99 | 1,14 |
| 6 | 0,92 | 0,99 | 1,09 |
| 7 | 0,99 | 0,99 | 1,03 |
| 8 | 0,96 | 1,00 | 1,08 |
| 9 | 0,98 | 1,00 | 1,06 |
| 10 | 0,99 | 0,99 | 1,03 |
| 11 | 0,99 | 1,00 | 1,04 |

Analisando a Tabela 4 e comparando com a interpretação de Ross (1999), é possível verificar que todos os modelos podem ser considerados bons, pois avaliando o desempenho do modelo o fator BIAS está na faixa de 0,90 – 1,05, podendo considerar um bom ajuste para o modelo.

Como mostrado na Tabela 4, os valores do fator exatidão de todos os modelos foram maiores do que 1, indicando que há coerência entre todos os valores previstos e observados.

Foram obtidos bons ajustes do modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado (Equações 30 a 40) aos dados dos parâmetros λ em função da temperatura e do pH, com valores de R^2 maiores que 0,88, e menores que 0,99, para todos os casos, como mostrado na Tabela 4.

No estudo realizado por Baert et al. (2007) que consistiu na modelagem do efeito da temperatura na taxa de crescimento e na fase de lag de *Penicillium expansum* em maçãs, pode ser observado que o modelo de Arrhenius–Davey foi utilizado para descrever o tempo de lag em função da temperatura, foi observado um alto valor de R^2 , sendo maior que 0,94 e o fator BIAS e o fator exatidão maiores que 1, indicando que o modelo foi utilizado com sucesso.

Silva et al. (2010) estudando a modelagem do tempo de lag e taxa de crescimento de *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 em manga como função de pH e temperatura observaram que o modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado foi o que melhor ajustou no estudo de tempo de lag apresentando, inclusive, melhor resultado para a equação quadrática, apresentando um valor de R^2 maior que 0,98.

No estudo realizado por Kim et al. (2011), em que consistiu na caracterização do crescimento e desenvolvimento de um modelo preditivo para *B. cereus* em macarrão fresco e adicionados de etanol e tiamina, os autores observaram que o R^2 foi de 0,9782, o fator BIAS foi de 0,992 e o fator exatidão foi de 1,011 para o tempo de lag, sendo que este modelo foi promissor para a utilização na previsão do crescimento de *B. cereus* em macarrão fresco, uma contribuição importante para a fabricação de produtos seguros.

Da Silva et al. (2013) em seu estudo sobre a integração de um modelo microbiano cinético com um modelo de transferência de calor para prever o crescimento de *Byssochlamys fulva* na polpa de mamão refrigerada, observou que o comportamento do parâmetro λ como função da temperatura foi melhor ajustado pelo modelo de Arrhenius-Davey, considerando o fator BIAS e o fator exatidão maiores que 1 e o R^2 desse modelo foi cerca de 0,80, sendo considerado um bom ajuste do modelo.

Os índices estatísticos avaliados para o modelo secundário de Arrhenius–Davey modificado (DAVEY, 1991) indicam que o modelo apresentou bons resultados e fornecem previsões seguras para a avaliação do crescimento de *B. cereus* para diferentes valores de pH (4,9; 5,5; 6,5; 7,0) e temperatura (15 °C, 25 °C, 32 °C e 37 °C).

Analisando os dois modelos apresentados e considerando os parâmetros estatísticos para avaliação dos fatores pH e temperatura no crescimento de *B. cereus*, pode-se notar que o modelo de Arrhenius–Davey modificado (DAVEY, 1991) apresentou os resultados que melhor se ajustaram para análise do tempo de lag (λ), enquanto o modelo de Ratkowsky (RATKOWSKY et al., 1982) apresenta resultados inferiores (R^2 entre 0,75 a 0,96) quando é analisada a taxa máxima de crescimento ($\mu_{máx}$).

Portanto, observando o exposto acima, os modelos apresentados nesta pesquisa possuem boa confiabilidade e viabilidade para o estudo das diferentes estirpes de *B. cereus* em diferentes produtos lácteos. Esses resultados podem ser usados para padronizar modelos preditivos que são comumente usados para identificar pontos críticos de controle em sistemas de análise de risco ou para a avaliação quantitativa de risco microbiano para melhorar a segurança alimentar.

6. CONCLUSÃO

A cinética de multiplicação de *Bacillus cereus* indicou que cada estirpe teve seu comportamento com relação ao pH e à temperatura.

Além disso, foi possível notar que em temperaturas acima de 32 °C e pH maior que 6,5, o valores da taxas máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) foi aumentando e o tempo de lag (λ) foi diminuindo.

Foi possível notar também que uma baixa taxa de multiplicação de *B. cereus* na temperatura de 15 °C e em baixos valores de pH, indicando que a temperatura de refrigeração utilizada pelas indústrias de alimentos, é uma ferramenta importante para garantir a segurança e qualidade dos alimentos.

Assim, uma temperatura de armazenamento abaixo de 15 °C, juntamente com um valor de pH inferior a 4,9 nos produtos lácteos (leite em pó, bebida láctea, ricota, leite UHT e leite pasteurizado) ajudam no retardo do crescimento de *B. cereus*.

Os resultados indicaram que abusos na temperatura e valores de pH altos influenciam no número de bactérias, podendo alterar a qualidade dos produtos, e ou, riscos à saúde do consumidor.

A refrigeração deve ser suficiente para evitar o crescimento de micro-organismos, mas a educação dos consumidores (em particular evitar abusos térmicos significativos) representa um meio eficiente para prevenir intoxicações por *B. cereus*.

Os modelos secundários propostos apresentaram bons desempenhos em combinação com os dois parâmetros estudados (temperatura e pH).

Um modelo que descreve o crescimento microbiano em função da temperatura e pH, utilizado para estimar a evolução das contagens dos microorganismos quando aumentava-se a temperatura e o pH, foi considerado como potencial para contribuir na avaliação de riscos a que se expõem os consumidores de produtos lácteos, uma vez mantido a temperaturas que permitem o crescimento de *B. cereus*.

Em geral, os modelos produzidos neste estudo podem ser uma boa ferramenta nos processos preliminares de avaliação de risco microbiológico quando são estudadas mudanças de temperatura e pH do meio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R.; LITTLE, C.L.; EASTER, M.C. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.71, n.1, p.65-71, 1991.

ARNESEN, S.L.P.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, p.579-606, 2008.

BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M.M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.139-150, 2007.

BARANYI, J.; ROBERTS, A.T. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.199-218, 1995.

BARRETO, J.M.O. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em produtos lácteos comercializados na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, determinação de genes de virulência e produção de toxinas**. 2016. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

BEECHER, D.J.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.63, p.4423-4428, 1995.

BOTTONE, E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, p.382-398, 2010.

BRASIL. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo: Ministério da Saúde, 2014.

BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, p.6-11, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Vital Signs: Listeria Illnesses, Deaths, and Outbreaks**. United States: [s.n.], 2014.

CEUPPENS, S.; BOON, N.; UYTENDAELE, M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, p.433-50, 2013.

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

COSTA, M.L.; MACHADO, B.A.S.; SILVA, T.N.; SILVA, R.P.D.S.; DRUZIAN, J.I. Controle microbiológico no processamento de alimentos. **Cadernos de Prospecção**, v.6, n.2, p.174-180, 2013.

DA SILVA, P.R.S.; TESSARO, I.C.; MARCZAK, L.D.F. Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *Byssoschlamys fulva* growth in refrigerated papaya pulp. **Journal of Food Engineering**, v.118, p.279-288, 2013.

DAVEY, K.R. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.253-257, 1991.

DI PINTO, A.; BONERBA, E.; BOZZO, G.; CECI, E.; TERIO, V.; TANTILLO, G. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. **European Food Research and Technology**, v.237, p.275-279, 2013.

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

ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Phage therapy in the food industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.5, p.327-349, 2014.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Journal of Microbiology**, v.48, n.8, p.728-738, 2002.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R.M.; MANNAN, K.S.B. Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science**, v.40, n.2, p.121-131, 2011.

FERNANDES, S.M.; FUJIMOTO, G.; SCHNEID, I.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v.38, p.16-23, 2014.

FERNANDEZ-NO, I.C.; GUARDDON, M.; BOHME, K.; CEPPEDEA, A.; CALOMATA, P.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. **Food Microbiology**, v.28, p.605-10, 2011.

GORTMAKER, S.L.; HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. **Contemporary Sociology**. [S.l: s.n.], 1994.

GRANATO, D.; CASTRO, I.A.; ELLENDERSEN, L.S.N.; MASSON, M.L. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.75, p.149-155, 2010.

GRANUM, P.; LINDBÄCK, T. *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, p.491-502, 2013.

GRIJSPEERDT, K.; DE REU, K. Practical application of dynamic temperature profiles to estimate the parameters of the square root model. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, p.83-92, 2005.

GUÉRIN, A.; DARGAIGNARATZ, C.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; NGUYEN-THE, C. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, v.59, p.119-123, 2016.

HARIRAM, U.; LABBÉ, R.G. Growth and inhibition by spices of growth from spores of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in cooked rice. **Food Control**, v.64, p.60-64, 2016.

HEO, S.K.; LEE, J.Y.; BAEK, S.B.; HA, S.D. A response surface model to describe the effect of temperature and pH on the growth of *Bacillus cereus* in cooked rice. **Journal of Food Protection**, v.72, p.1296-1300, 2009.

HUANG, L. IPMP 2013 - A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.100-107, 2014.

HUANG, L.; HWANG, C.; PHILLIPS, J.G. Evaluating the effect of temperature on microbial growth rate — the Ratkowsky and a Belehrádek type models. **Journal of Food Science**, v.76, p.547-557, 2011.

HWANG, J.-Y.; PARK, J.-H. Distribution of six exotoxin genes and production of L2-HBL and nhe A proteins in six *Bacillus cereus* isolates from infant formula and produce. **Food Science and Biotechnology**, v.24, n.1, p.379-382, 2015.

IZADI, Z.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; ENSAFI, A.A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. **Biosensors and Bioelectronics**, v.80, p.582-589, 2016.

JEßBERGER, N.; DIETRICH, R.; BOCK, S.; DIDIER, A.; MÄRTLBAUER, E. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. **Toxicon**, v.77, p.49-57, 2014.

KIM, B.Y.; LEE, J.Y.; HA, S.D. Growth characteristics and development of a predictive model for *Bacillus cereus* in fresh wet noodles with added ethanol and thiamine. **Journal of Food Protection**, v.74, p.658-664, 2011.

KUMARI, S.; SARKAR, P.K. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. **Dairy Science & Technology**, v.94, p.483-497, 2014.

LEDENBACH, L. H.; MARSHALL, R. T. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. **Food Microbiology and Food Safety**, p. 41-67, 2009.

LINDBÄCK, T.; GRANUM, P.E. Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. **Protocol Food-Borne Pathogens**, v. 21, p.15-26, 2006.

LUO, K.; HONG, S.S.; OH, D.H. Modeling the effect of storage temperatures on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat ham and sausage. **Journal of Food Protection**, v.78, p.1675-1681, 2015.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. *Bacillus cereus* em produtos lácteos – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n. 381, p.5-12, 2011.

McMEEKIN, T.A.; CHANDLER, R.E.; DOE, P.E.; GARLAND, C.D.; JUNE OLLEY; PUTRO, S.; RATKOWSKY, D.A. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, n.6, p.543-550, 1987.

McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D.A. Predictive microbiology: theory and application. **Taunton: Research Studies**, p.1-86, 1993.

MEMBRÉ, J.-M.; LAMBERT, R.J.W. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.10-15, 2008.

MOLS, M.; CERAGIOLI, M.; ABEE, T. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, n.1, p.199-222, 2011.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, C.D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.41-51, 2000.

NARANJO, M.; DENAYER, S.; BOTTELDOORN, N.; DELBRASSINNE, L.; VEYS, J.; WAEGENAERE, J.; SIRTAINÉ, N.; DRIESEN, R.B.; SIPIDO, K.R.; MAHILLON, J.; DIERICK, K. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.4379-4381, 2011.

OH, M.H.; HAM, J.S.; COX, J.M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, p.1-8, 2012.

ORGANJI, S.R.; ABULREESH, H.H.; ELBANNA, K.; OSMAN, G.E.H.; KHIDER, M. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.7, p.515-520, 2015.

PELEG, M.; CORRADINI, M.G. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.917-945, 2011.

POSADA-IZQUIERDO, G.D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; SELMA, M.V.; GIL, M.I.; ZURERA, G. Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions:

Chlorine washing and modified atmosphere packaging. **Food Microbiology**, v.33, p.131-138, 2013.

PRESCOTT; HARLEY; KLEIN'S. **Microbiology** (7^aed.). Nova Iorque: McGraw Hill, 2008.

RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; McMEEKIN, T.A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v.149, n.1, p.1-5, 1982.

ROSS, T.; McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-264, 1994.

ROSS, T. Predictive food microbiology models in the meat industry. **Meat and Livestock**, Australia, 1999.

SAMAPUNDO, S.; HEYNDRICKX, M.; XHAFERI, R.; DEVLIEGHERE, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.150, p.34-41, 2011.

SAS/STAT. 9.2 User's Guide, Second Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009.

SCHOENI, J.L.; LEE WONG, A.C. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v.68, n.3, p.448-648, 2005.

SCOLFORO, C.Z.; BAIRROS, J.V.; REZENDE, A.C.B.; SILVA, B.S.; ALVES, R.B.T.; COSTA, D.S.; ANDRADE, N.J.; SANT'ANA, A.S.; PENA, W.E.L. Modeling the fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the pulp and on the outer rind of Canary melons (*Cucumis melo* (Indorus Group)). **LWT - Food Science and Technology**, v.77, p.290-297, 2017.

SILVA, A.R.; SANT'ANA, A.S.; MASSAGUER, P.R. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1105-1116, 2010.

SOUZA, B.I. **Aplicabilidade de um modelo para estimar o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz-doce, em função da temperatura**. 2003. 71 f. Tese (Ciência da Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

TAYLOR, A.W.; COVENEY, J.; WARD, P.R.; HENDERSON, J.; MEYER, S.B.; PILKINGTON, R.; GILL, T.K. Fruit and vegetable consumption - the influence of aspects associated with trust in food and safety and quality of food. **Public Health Nutrition**, New York, v. 15, p. 208-217, 2012.

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

VAN IMPE, J.F. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 97-105, 2005.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Predictive Modeling. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology - fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, p.728-739, 1997.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p.175-177, 1993.