

GUILLERMO ANDRES MARIN RUBIO

**OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM ARROZ CRU VITAMINADO E
CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DO PATÓGENO NO ARROZ COZIDO**

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

VIÇOSA- MINAS GERAIS

2015

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

T

M337o
2015

Marin Rubio, Guillermo Andres, 1987-
Ocorrência de *Bacillus Cereus* em arroz cru vitaminado e
cinética de multiplicação do patógeno no arroz cozido /
Guillermo Andres Marin Rubio. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.44-48.

1. *Bacillus cereus*. 2. Arroz. 3. Alimentos - Bacteriologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

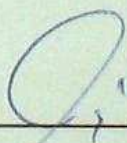
CDD 22. ed. 664.07

GUILLERMO ANDRES MARIN RUBIO

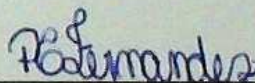
OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM ARROZ CRU VITAMINADO E CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DO PATÓGENO NO ARROZ COZIDO

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

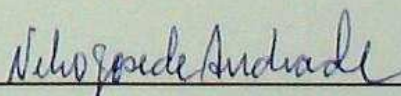
APROVADA: 28 DE JULHO 2015



Prof.ª Mônica Ribeiro Pirozi
(Coorientadora)



Patrícia Érica Fernandes



Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

Dedico

A minha mãe Julia

A minha namorada Carolina

A meus amigos...

Apoio incondicional, sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Julia Rubio, pelo amor, força, incentivo e apoio incondicional, ainda na distância.

A minha namorada Carolina, pelo amor e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o curso de mestrado.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o curso de mestrado

Ao Programa de Alianças para à Educação e Capacitação (PAEC) OEA-GCUB, pela bolsa de estudos.

A empresa Urbano Agroindustrial, pela ajuda e doação do arroz

Ao Professor Nélio José de Andrade pela orientação, confiança e apoio prestados.

Aos meus co-orientadores Professora Mônica Ribeiro Pirozi e Professor José Benício Paes Chaves pelos ensinamentos e apoio para minha pesquisa.

À Dr.^a Patrícia Erica Fernandes, pelo tempo e ajuda nesta pesquisa.

Ao Professor Joaquin Hernan Patarroyo, pela disponibilização dos equipamentos para as análise genéticas.

Aos funcionários do DTA/UFV, especialmente a Poliana, pela colaboração

A meus amigos, pelo ânimo e confiança.

Aos colegas do laboratório pelo ânimo e sua amizade.

BIOGRAFIA

GUILLERMO ANDRES MARIN RUBIO, filho de Julia Esperanza Rubio Cuenca e Guillermo Marin Torres, nasceu em Florência, Caquetá, Colômbia, em 8 de abril de 1987. Em fevereiro de 2005, iniciou o curso Engenharia de Alimentos na Universidade da Amazônia, Colômbia, graduando-se em dezembro de 2009.

No ano 2013, iniciou o curso de Mestrado em Ciência Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da tese em 28º de julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Arroz.....	4
3.2. Tecnologia Ultra Rice® e arroz vitaminado	6
3.3. <i>Bacillus cereus</i>	8
3.4. Fatores de virulência.....	12
3.5. Técnica do PCR para identificação genética	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Amostragem do arroz	18
4.2. Análises microbiológicas	19
4.3. Testes morfológicos e bioquímicos para isolados de <i>B. cereus</i>	20
4.3.1. Motilidade e redução de nitrato	20
4.3.2. Fermentação anaeróbica de glicose	20
4.3.3. Decomposição da tirosina.....	21
4.3.4. Crescimento rizoide	21
4.3.5. Teste Voges-Proskauer (VP)	21
4.4. Identificação genética dos isolados.....	22
4.4.1. Isolamento do DNA.....	22
4.4.2. Análise de PCR dos isolados.....	23

4.4.3. Eletroforese.....	24
4.4.4. Purificação do DNA	24
4.4.5. Sequenciamento do DNA	25
4.5. Inoculação de esporos de <i>Bacillus cereus</i> ao arroz cru branco e vitaminado, cocção de arroz e cinética de multiplicação do micro-organismo nas diferentes temperaturas de estocagem.....	25
4.5.1. Produção dos esporos	25
4.5.2. Inoculação dos esporos ao arroz cru e cocção do arroz	26
4.5.3. Cinética de multiplicação de <i>Bacillus cereus</i> no arroz sob duas temperaturas de armazenamento, tempos de geração do micro-organismo e estimativa de tempo para produção de toxina.	27
4.5.4. Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Análise de <i>Bacillus cereus</i> nos diferentes tipos de arroz.....	29
5.1.1. Características morfológicas e bioquímicas	29
5.2. Confirmação genética dos isolados de <i>Bacillus cereus</i> do arroz.....	31
5.3. Sequenciamento do DNA positivo para <i>Bacillus cereus</i>	32
5.4. Contaminação dos diferentes tipos de arroz com <i>Bacillus cereus</i>	35
5.5. Teste desafio	37
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

MARÍN RUBIO, Guillermo Andrés, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em arroz cru vitaminado e cinética de multiplicação do patógeno no arroz cozido.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Mônica Ribeiro Pirozi e José Benício Paes Chaves.

O arroz é um alimento amplamente consumido pela população mundial, que devido a sua composição nutricional pode ser um meio de cultura para bactérias. Diferentes publicações internacionais tem assinalado a *Bacillus cereus* como o micro-organismo que tem maior prevalência no arroz. Esporos desta bactéria podem contaminá-lo sendo capazes de sobreviver aos processos térmicos e, dependendo de fatores intrínsecos e eivtrínsecos, podem produzir toxinas causadoras de doenças. Pesquisas avaliaram as condições microbiológicas do arroz, mas pouco foi estudado da multiplicação de *B. cereus* em arroz vitaminado, assim o principal objetivo nesta pesquisa foi avaliar a ocorrência de *B. cereus* em arroz branco e enriquecido com minerais e vitaminas, além de determinar a influência do enriquecimento do arroz, na multiplicação bacteriana. A ocorrência de *B. cereus* em um total de 90 amostras de arroz cru, distribuídas entre arroz branco, Ultra Rice® e vitaminado, foi avaliada conforme a Resolução nº 12 de 2001, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). As contagens do patógeno variaram entre $1,0 \times 10^2$ e $9,6 \times 10^2$ UFC/g, inferiores ao limite máximo de $3,0 \times 10^3$ UFC/g exigidos pela legislação. Vinte e seis amostras apresentaram isolados típicos de *B. cereus* em meio MYP (*Manitol-Egg Yolk-Polymixyn*) e 24 isolados foram confirmados pelos testes morfológicos, bioquímicos e, também, pela identificação genética, realizada pela técnica de PCR convencional para a detecção do gene 16S ribossomal do *B. cereus*, o que corresponde a prevalência de 29% de *B. cereus*. O arroz Ultra Rice® apresentou o maior número de amostras (11) contendo isolados de *B. cereus*, seguido do arroz vitaminado (9) e do arroz branco (4). A multiplicação de *B. cereus* foi avaliada em arroz branco e vitaminado, ambos inoculados com cerca de $1,0 \times 10^3$ UFC/g de esporos, antes da cocção, sob condições domésticas. O arroz cozido foi armazenado às temperaturas de 10 °C e 25 °C e nos tempos de 24 h, 48 h,

72 h, 96 h e 120 h. Quanto ao tempo de armazenamento, verificou-se que os valores de μ para o arroz branco e para o arroz vitaminado ambos adicionados de esporos de *B. cereus* não diferiram ($p>0,05$) entre si. Por outro lado, houve diferença ($p<0,05$) entre esses tipos de arroz e o arroz controle não adicionado de esporos. Entretanto, constatou-se que os valores μ para os tipos de arroz adicionados de esporos de *B. cereus* diferiram ($p< 0,05$) entre si, para as temperaturas de armazenamento, de 10 °C e 25 °C. O mesmo se constatou para o arroz controle não adicionado de esporos bacterianos. Concluiu-se que a adição de arroz Ultra Rice® (contendo vitaminas e minerais) na proporção de 1:99 no Arroz Branco não favoreceu a multiplicação de *B. cereus*. Esse fato foi evidenciada pelos resultados das contagens e das taxas de crescimento, nas quais os dois tipos de arroz apresentam comportamentos similares sendo as temperaturas de estocagem o fator determinante na multiplicação de *B. cereus*. A 25 °C, considerando a dose infecciosa de $1,0 \times 10^5$ UFC/g de *B. cereus*, a partir das regressões lineares da multiplicação do micro-organismo, estima-se que a produção de toxinas poderia ocorrer a partir de 43,1 h, 44,9 h e 106,3 h, no Arroz Vitaminado, Arroz Branco e Arroz Controle, respectivamente.

ABSTRACT

MARÍN RUBIO, Guillermo Andrés, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Occurrence of *Bacillus cereus* in gross rice with added of vitamins and minerals and the kinetic growth of the pathogen in cooked rice.** Advisor: Nélio José de Andrade. Co-Advisor: Mônica Ribeiro Pirozi e José Benício Paes Chaves.

The rice is a food widely consumed by the world population, due to their nutritional composition may be a culture medium for bacteria. *Bacillus cereus* is the microorganism that is most prevalent in rice, spores of this bacterium can contaminate it being able to survive the thermal process and depending on intrinsic and extrinsic factors can produce toxins that cause illness. Several research evaluated the microbiological conditions of the rice, but little has been studied the multiplication of *B. cereus* in rice added of vitamins and minerals, so the main objective of this research was to evaluate the occurrence of *B. cereus* in white rice and rice enriched with minerals and vitamins, and determine the influence of rice enriched in bacterial multiplication. Occurrence of *B. cereus* in a total 90 samples of raw rice, distributed among white rice, Ultra Rice® and added of vitamins and minerals was assessed, according to Resolution No. 12 of 2001 ANVISA (National Health Surveillance Agency). Pathogen counts ranged between 1.0×10^2 and 9.6×10^2 CFU/g, below of 1.0×10^3 CFU/g as required by Brazilian legislation. Twenty-six samples of raw rice showed typical isolates of *B. cereus* in MYP medium (*Mannitol-Egg-yolk Polymixyn*) and 24 isolates were confirmed as of *B. cereus* by morphological, biochemical tests and also by genetic identification, by conventional PCR for detection of 16S ribosomal RNA, which corresponds a prevalence of *B. cereus* of 29%. Ultra Rice® had the highest number of samples (11) containing isolates of *B. cereus*, followed by rice added of vitamins and minerals (9) and white Rice (4). The growth of *B. cereus* was evaluated in white rice and rice added of vitamins and minerals, both inoculated with about 1.0×10^3 CFU/g of spores before cooking under domestic conditions. The boiled rice was stored at temperatures of 10 °C and 25 °C and stored at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h. According to the time of storage, it was found that the μ value for white rice and the rice added of vitamins and minerals, both inoculated with *B. cereus* spores, was not different

($p < 0.05$) between them. On the other hand, there was significant differences ($p > 0.05$) between these types of rice and control the white rice not added spores. However, it was found that the μ values for the types of rice added spores *B. cereus* showed difference ($p < 0.05$) between them, for storage temperatures of 10 °C and 25 °C. The same was found for the control or white rice is not added bacterial spores. It was concluded that the addition of Ultra Rice® (containing vitamins and minerals) in the ratio of 1:99 in the white rice was not favorable to the growth of *B. cereus*. This fact was evidenced by the results of the counts and the growth rates, in which the two types of rice have similar behaviors and the storage temperatures was the determining factor in the multiplication of *B. cereus*. At 25 °C, considering the infectious dose 1.0×10^5 CFU/g of *B. cereus* and based in the linear regressions of the micro-organism growth, it is estimated that the production of toxins could occur from 43.1 h, 44.9 h and 106.3 h in rice added of vitamins and minerals, white rice and rice Control, respectively.

1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia vem aprimorando tecnologias e desenvolvendo novos métodos de produção a fim de aumentar a quantidade, qualidade e inocuidade dos alimentos. Os consumidores também têm se mostrado cada vez mais exigentes com relação aos produtos que adquirem. Por esses motivos, torna-se necessário o constante aperfeiçoamento das técnicas produtivas, especialmente as que asseguram um alimento de qualidade e, acima de tudo, que os perigos biológicos, químicos e físicos identificados apresentem risco mínimo à saúde de seus consumidores.

As contaminações microbiológicas podem ocorrer em todas as etapas pelas quais passam os produtos agrícolas, desde a colheita até o processamento, embalagem, transporte, estocagem e por diversos meios, seja o solo, a água ou o ar, incluindo os diversos contatos físicos, mecânicos ou manuais. No entanto, o desenvolvimento microbiano depende do tipo de substrato em que se constitui o alimento, ou seja, das condições de desenvolvimento biológico que o produto oferece, notadamente relacionada ao armazenamento, à disponibilidade de água necessária aos processos metabólicos.

Os alimentos são contaminados por *Bacillus cereus* durante as diferentes etapas de elaboração, podendo o micro-organismo multiplicar e determinar a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos, que se manifestam sob a forma de duas síndromes, uma emética, que é similar à causada pela enterotoxina produzida por *Staphylococcus aureus*, e outra diarreica, semelhante à causada pela enterotoxina de *Clostridium perfringens*. A ocorrência de ambas as síndromes está associada, geralmente, ao consumo de alimentos previamente submetidos a tratamento térmico, de forma que, alimentos cozidos e mantidos sob temperaturas que permitam a germinação dos esporos e multiplicação das células, são importantes fontes do micro-organismo ou de suas toxinas (VILAS BÔAS et al., 2007). Um único polipeptídeo termoestável chamado de cereulide é responsável pela forma emética, conduzindo a casos de vômito poucas horas após a ingestão de alimentos contaminados. A cereulide é codificada por um cluster de genes chamado ces de 2,4 kDa.

Entre os alimentos mais frequentemente contaminados por *B. cereus* estão os cereais e derivados, produtos de laticínios, carnes, alimentos desidratados e especiarias. O arroz cru, pelo baixo teor de umidade, entre 12% a 14%, não permite a multiplicação microbiana, mas há sobrevivência de células vegetativas de *B. cereus*, por alguns dias e a presença de esporos desse micro-organismo pode ser constatada por períodos longos de tempo

O arroz cozido, com atividade de água (Aw) entre 0,97 e 0,99 favorece as condições de multiplicação do *B. cereus*. Esporos do micro-organismo podem contaminar o arroz sendo capazes de sobreviver ao processo de cocção e, durante o resfriamento, pode ocorrer a germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas com a produção de toxinas, como a cereulide, dependendo das condições de tempo e temperatura de armazenamento. Populações de *B. cereus* podem alcançar 6,4 log UFC/g em 96 h e incubação de 15 °C e 7,2 log UFC/g em 24 h a 30 °C (FINLAY; 2002). Aproximadamente, 95% dos surtos de intoxicação, causada pela toxina emética estão relacionados com o consumo arroz, especialmente com preparações orientais (LAKE et al; 2009).

Por ser um alimento amplamente consumido pela população mundial, o arroz tem sido utilizado em programas de combate à fome oculta por meio de seu enriquecimento com vitaminas e minerais. O arroz fortificado Ultra Rice® é um exemplo desse tipo de alimento. Esse produto é semelhante ao arroz natural beneficiado, em tamanho, e cor, não apresenta sabor ou cheiro quando comparado ao arroz cozido ou não cozido, e o processo de manufatura utiliza tipicamente equipamentos de mistura e extrusão. Devido a forma de processamento, o arroz Ultra Rice® pode estar contaminado com *B. cereus*, em suas formas vegetativas e de esporos, e vir a ser uma fonte de toxina emética após a cocção e consumo pelas pessoas. Geralmente, os estudos com *B. cereus* são feitos com arroz branco e integral e não com arroz fortificado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a ocorrência e o efeito do enriquecimento na multiplicação de *Bacillus cereus* em arroz branco e enriquecido com minerais e vitaminas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de *B. cereus* conforme Resolução nº 12 de 2001 em arroz vitaminado, arroz branco e arroz Ultra Rice®;
- Verificar o efeito do enriquecimento do arroz na multiplicação de *B. cereus*;
- Verificar a multiplicação de *B. cereus* no arroz enriquecido cozido, após 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h a 10 °C e 25 °C, inoculado com esporos do micro-organismo;
- Determinar os valores máximo de multiplicação (μ) e tempo de geração (TG) do *B. cereus* no arroz branco e arroz vitaminado cozido, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Arroz

O arroz (*Oryza sativa*, L.), dentre os cereais cultivados, se destaca por ser alimento básico da maioria da população em várias regiões do planeta. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014) calcula que o arroz é consumido por mais de três bilhões de pessoas, correspondendo à metade da população mundial e a produção para o ano 2014 foi estabelecida em cerca de 490 milhões de toneladas. No Brasil, a produção nacional de arroz para o período de 2013/2014 foi de 12,6 milhões de toneladas segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) e o consumo interno foi de 12,0 milhões de toneladas.

Os cereais, em especial o arroz, o trigo e o milho, constituem a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e proteica dos indivíduos. Segundo FAO (2014) o arroz é a principal fonte de carboidratos para mais da metade da população mundial e que mais de 850 milhões de pessoas em todo mundo passam fome, com mais de 50% delas vivendo em zonas que dependem da produção do arroz. No Camboja o produto representa 73,29% da energia ingerida pela população; para a China 29,99%; para o Japão, 23,06%; na Guiné Bissau é responsável por 42,17%; na Costa do Marfim por 23,47% e no Brasil por 12,09% (IRRI, 2012). O arroz, por sua composição nutricional (Tabela 1), contendo proteína, gordura e carboidratos, é um excelente meio de cultura para bactérias, dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos da multiplicação microbiana, como umidade relativa, temperatura, A_w , pH, potencial de oxirredução e substâncias antimicrobiana presentes.

Tabela 1 - Composição nutricional do arroz branco. Valores em 100 g de produto cozido

Calorias (Kcal)	130,00
Água (g)	68,44
Proteínas (g)	2,69
Lipídeos (g)	0,28
Carboidratos (g)	28,17
Fibra (g)	0,40
Minerais	
Cálcio (mg)	10,00
Fósforo (mg)	43,00
Ferro (mg)	0,20
Potássio (mg)	35,00
Magnésio (mg)	12,00
Vitaminas	
Tiamina (mg)	0,020
Riboflavina (mg)	0,013
Niacina (mg)	0,400

Fonte: adaptado USDA (2014)

O Ministério da Saúde determina limites de teores de micotoxinas, mas não limites de tolerância para contagem padrão em placas de bactérias mesófilas e de fungos totais em grãos de arroz. Para farinhas, amidos, féculas e fubás, são considerados admissíveis valores entre 10^4 e 10^6 UFC/g do produto. Como não existe um limite estabelecido para o arroz, pode se comparar com os limites estabelecidos para outros alimentos, para se ter um indicativo da qualidade sanitária do produto (EMBRAPA, 2010).

O arroz e o processamento deste produto estão regulados no Brasil pelas seguintes legislações:

- a) Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001: Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001);
- b) *Codex Alimentarius Commission - Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods CAC/GL 21 -1997.*

3.2. Tecnologia Ultra Rice® e arroz vitaminado

O grão de arroz fortificado é produzido a partir da quirera que é um subproduto do beneficiamento do arroz. A quirera de arroz é submetida a processo de moagem e após a adição de nutrientes, como ferro, zinco e vitaminas do complexo B é formado por extrusão grãos de arroz enriquecidos, sendo incorporado ao arroz tradicional na proporção de 1% como descrito na figura 1 Fluxograma de elaboração de arroz vitaminado. O Ultra Rice® é de baixo custo e é um alimento culturalmente apropriado com uma tecnologia de fortificação especialmente feita para suprir as necessidades de populações de baixa renda, consumidoras de arroz. O seu sistema de distribuição de micronutrientes engloba vitaminas e minerais em um grão de arroz extrusado feito da farinha de arroz (BEINNER et al., 2009).

Esses grãos parecem com o arroz tradicional em tamanho e forma, depois de secos, eles são misturados com o arroz normal numa taxa de 1:99 para obtenção de arroz vitaminado. Quando cozido, o arroz vitaminado tem o mesmo sabor, cor e textura do arroz tradicional.

A tecnologia de extrusão é um conceito completamente diferente em fortificação de arroz. Na extrusão a quente, uma massa feita de farinha de arroz, mistura de vitamina, minerais e água é passada através de um único extrusor de parafuso duplo e moldadas em estruturas de grãos parcialmente pré-cozinhados como assemelhando-se grãos de arroz; que é então misturado com o arroz polido natural. Este processo envolve temperaturas relativamente elevadas (70 a 110 °C) obtidos por pré-condicionamento ou transferência de calor através de vapor aquecido pelos revestimentos do tambor (ASHONG et al., 2012).

Um protagonista na fortificação do arroz no Brasil e no mundo é o Instituto de Excelência em Fortificação de Alimentos e combate à fome oculta (IPAF-UFV) da Universidade Federal de Viçosa. Através desse instituto, a UFV fornece assistência técnica para a introdução da fortificação do arroz no Brasil. Sua equipe provê apoio técnico à indústria arroseira no enriquecimento do arroz, dentro de padrões de qualidade e especificações consistentes com a regulamentação da ANVISA (RDC n° 269 de 22 setembro de 2005) e diretrizes da Organização Mundial de Saúde (BEINNER et al., 2009).

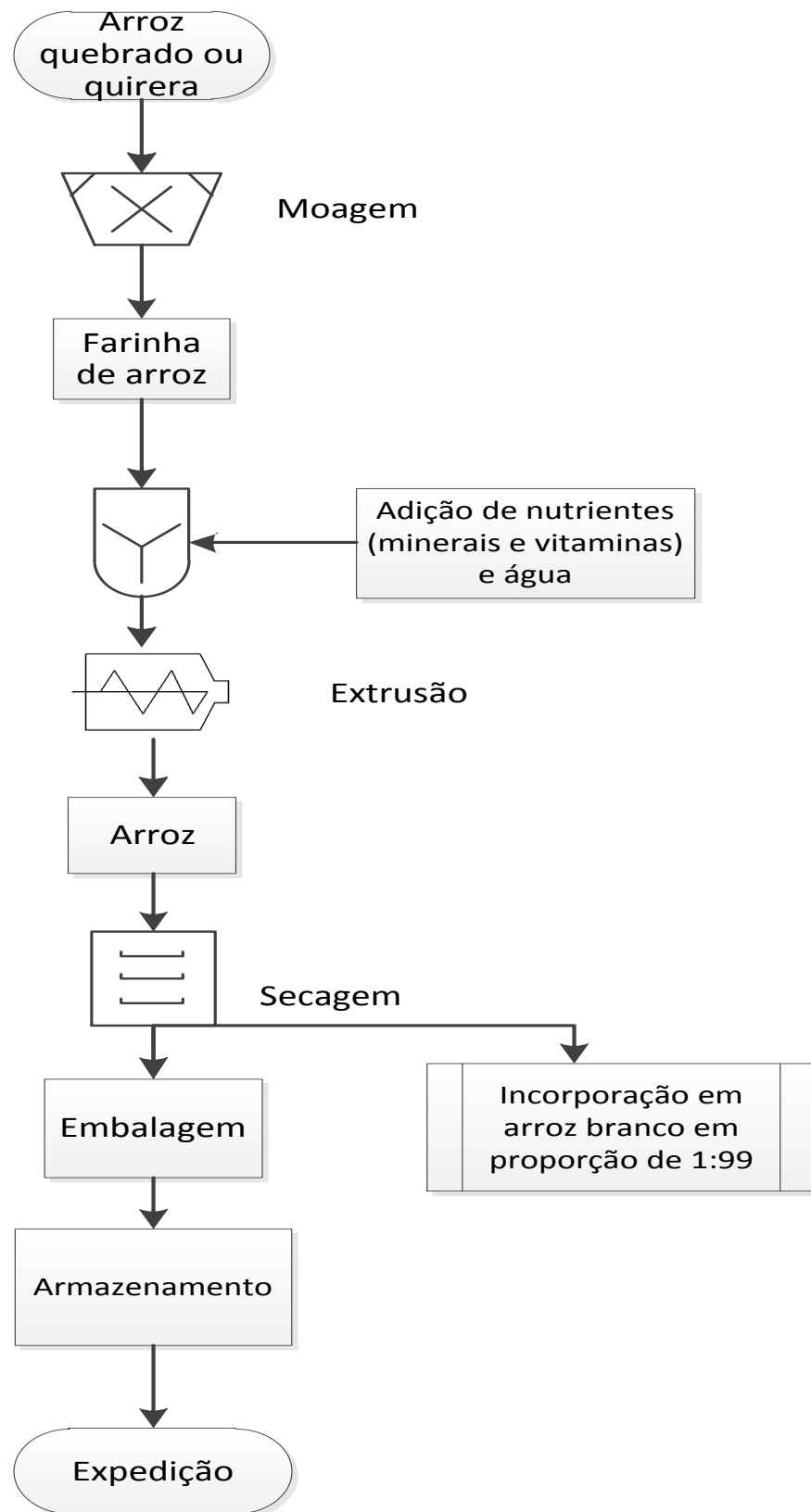


Figura 1 - Fluxograma de produção do arroz vitaminado.

Fonte: adaptado Ashong et al, (2012)

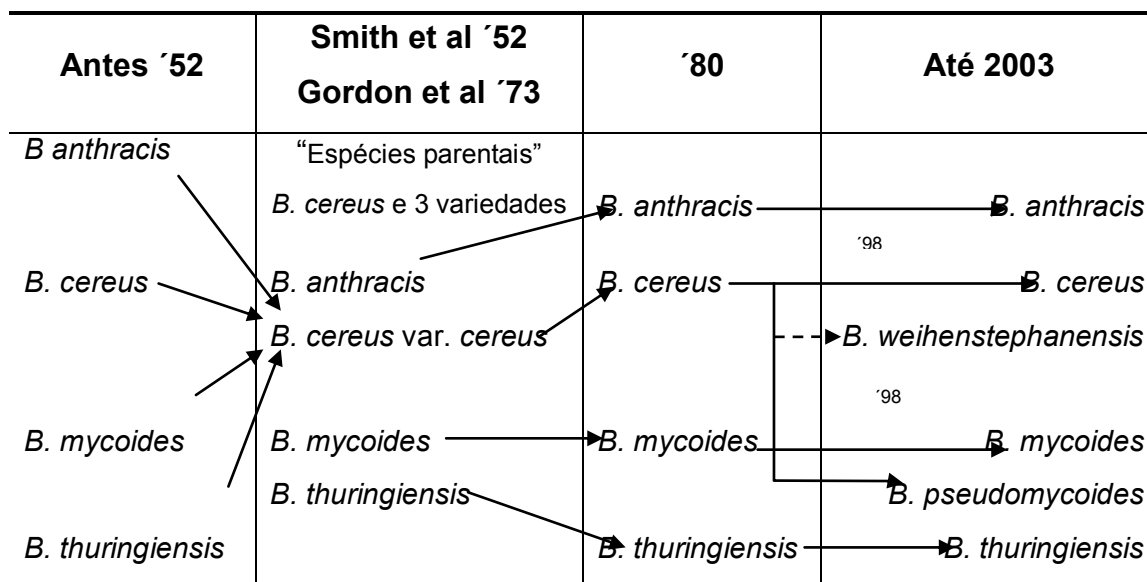
O modelo de produção e distribuição do arroz vitaminado é o da parceria público-privada. A tecnologia de produção do arroz vitaminado foi cedida gratuitamente pela PATH, uma instituição sem fins lucrativos dedicada à saúde global, ao governo brasileiro, por meio da UFV. A UFV repassa essa mesma tecnologia gratuitamente a empresas interessadas mediante o compromisso contratual de repassarem apenas o custo adicional da fortificação ao preço do arroz vitaminado. As arrozeiras são incentivadas a lançar marcas posicionadas para consumo geral, com preço acessível a toda a população, e distribuídas pelos canais tradicionais do varejo em todo o território nacional, contribuindo para a saúde de crianças, indivíduos e famílias de todas as classes sociais (BEINNER et al., 2009).

3.3. *Bacillus cereus*

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

O termo *Bacillus* significa pequeno bastão e *cereus* pode ser traduzido do latim como semelhante a cera. A designação reflete o fácil reconhecimento morfológico de *B. cereus* tanto a nível microscópico como em placas de ágar (ARNESEN et al., 2008). *B. cereus* são bastonetes gram-positivos, formadores de esporos, quimio-heterotróficos, sendo normalmente móveis devido à presença de flagelos peritriquios. (PRESCOTT et al., 2008). À Tabela 2 resume a evolução na classificação do *B. cereus* e de outras espécies de *Bacillus* segundo a taxonomia do micro-organismo.

Tabela 2 - Evolução da taxonomia de *Bacillus cereus*.



Fonte: Adaptado Fritze, 2004

Com base na evolução dos métodos de análise e da biotecnologia, a classificação das diferentes espécies tem sofrido constante adaptação. Este fato condiz com as alterações recorrentes na classificação taxonômica do grupo *B. cereus*.

Os micro-organismos de *B. cereus* são ubiqüitários encontrando-se naturalmente no solo e na água. Este micro-organismo mantém-se estável na natureza, sendo resistente a vários fatores ambientais e condições adversas. Apresenta duas formas morfológicas: endósporo e célula vegetativa.

Os esporos de *B. cereus* possuem forma elipsoide, com localização central ou pericentral, sem provocar deformação da célula (ARNESEN et al., 2008). Os esporos contêm ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinedicarboxílico, DPA), que possui um papel fundamental na esporulação, germinação e estrutura dos esporos.

As células vegetativas são bastonetes de dimensão de 1,0-1,2 x 3,0-5,0 µm, geralmente móveis e majoritariamente mesófilas, desenvolvendo-se a temperaturas entre os 10 °C e os 48 °C, com temperatura ótima de multiplicação entre os 25 °C e 37 °C. No entanto, é importante salientar a existência de estirpes psicrótróficas, que apresentam uma temperatura de multiplicação abaixo dos 7 °C, mas não acima dos 38 °C (LECHNER et al., 1998) e da existência de estirpes termófilas, como a estirpe NVH391-98 isolada

num surto de toxinfecção alimentar que provocou três casos fatais (LUND, BUYSER & GRANUM, 2000), que se desenvolve a temperaturas superiores a 50 °C (AUGER et al., 2008).

As estirpes de *B. cereus* desenvolvem-se num intervalo bastante amplo de valores de pH de 4,0 a 9,3, sendo tolerantes a concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 7% (BHUNIA, 2008). O valor mínimo de Aw que possibilita a multiplicação das bactérias deste grupo é de 0,92 (ARNESEN et al., 2008).

A bactéria *B. cereus* utiliza a glucose como fonte de carbono (mas não o manitol, a arabinose nem a xilose), hidrolisa o amido e a gelatina (com exceção das estirpes produtoras de cereulide que não utilizam o amido). A fermentação dos açúcares pode ser avaliada através da realização do teste API CHB® (Biomérieux), que consiste numa galeria de 49 poços, cada um contendo um açúcar diferente e o indicador de pH vermelho fenol. A metabolização dos açúcares provoca a acidificação do meio, passando a cor de vermelho a amarelo.

O método para contagem de *B. cereus* em alimentos foi padronizado pela *International Organization for Standardization* (ISO) e é baseado na multiplicação em ágar com D-manitol, gema de ovo e polimixina B (*Mannitol EggYolk Polymyxin– MYP*). A polimixina B é um agente seletivo que inibe bactérias gram-negativas, o ágar contém D-manitol como substrato de fermentação e vermelho de fenol como indicador da presença de ácido. Como *B. cereus* não consegue fermentar o manitol não há formação de ácido e as suas colônias ficam cor-de-rosa devido ao vermelho de fenol. Devido à gema de ovo surge uma zona de precipitação em torno das colônias com capacidade de produzir lecitinase, como é o caso da maior parte das estirpes de *B. cereus*.

Classicamente, as características que distinguem *B. cereus* de outras bactérias aeróbias formadoras de endósporos são a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol e o fato de produzir lecitinase (FRITZE, 2004). *B. cereus* apresenta atividade hemolítica e é resistente à penicilina. Esta bactéria necessita de três L-aminoácidos para o seu desenvolvimento: a treonina, leucina e a valina. As características bioquímicas que podem ser utilizadas para caracterizar *B. cereus*, distinguindo-o de outros membros do grupo *Bacillus*, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Características bioquímicas de várias espécies do grupo *Bacillus*

CARACTERÍSTICAS	<i>B. cereus</i>	<i>B anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>
Diâmetro Médio (µM)	1,4	1,3	1,4	1,3
Cadeias de células	+	+	+	+
Mobilidade	v	V	V	v
Cápsula	v	+	-	-
Esporângio				
Forma do esporo	E (C)	E	E (C)	E
Posição do esporo	S.C	S	S	S (C)
Cristais paraesporais	-	-	+	-
Corpos paraesporais	-	-	+	-
Reação Voges-Proskauer	+	+	+	+
Hemólise (entrocitos de ovelha)	+	-	+	-
Catalase	+	+	+	+
Lecitinase	+	+	+	(+)
Decomposição da tirosina	+	(+)	+	(+)
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Sensibilidade à penicilina	-	+	-	-
Hidrólise de ureia	v	-	+	v
Hidrólise da caseína	+	+	+	+
Hidrólise do amido	+	+	+	+
Arginina dihidrolase	V(-)	-	+	v
Produção de indol	-	-	-	-
Hidrólise da gelatina	+	(+)	+	+
Redução do nitrato	(+)	+	+	(+)
Gás a partir de carboidratos	-	-	-	-
Ácido a partir de:				
D-Arabinose	-	-	-	-
Glicerol	+	-	+	+
Glicogénio	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Salicina	+	-	(+)	(+)
D-Trealose	+	+	+	+

Legenda: +, ≥85 % positivos; (+), 75-84 % positivos; v, variável (26-74 % positivos); (-), 16-20 % positivos; -, 0-15 % positivos; Forma do esporo: E, elipsóide; C, cilíndrico; Posição do esporo: C, central ou pericentral; S, subterminal Adaptado de Rajkowski & Bennett (2003), Bhunia (2008).

3.4. Fatores de virulência

O termo virulência (do latim *virulentia*, veneno) refere-se à intensidade ou grau de patogenicidade de um micro-organismo (PRESCOTT et al., 2008). A patogenicidade é um termo geral que se refere ao potencial de um micro-organismo para causar doença.

Diversos estudos têm identificado e caracterizado os principais fatores de virulência em isolados de *B. cereus* provenientes de diferentes fontes. Entretanto, pouco tem sido feito com isolados de países tropicais, incluindo o Brasil (ARAGON-ALEGRO et al., 2008), sendo desconhecidos dados tanto da presença destes fatores quanto da diversidade genética de seus genes.

Várias características físicas e químicas das bactérias, como estruturas que facilitam a adesão a um hospedeiro ou moléculas que ultrapassam as barreiras do hospedeiro, contribuem para a patogenicidade e conseqüentemente para a virulência. As características próprias de um micro-organismo que conferem virulência são designadas fatores de virulência. A virulência é determinada por três características do micro-organismo: capacidade de invasão, de infecção e potencial patogênico (PRESCOTT et al., 2008).

Os principais fatores de virulência de *B. cereus* parecem ser aqueles envolvidos com sua capacidade de causar doenças associadas ao consumo aos alimentos. Enquanto a síndrome emética é causada por uma única toxina, designada cereulide (AGATA et al., 1994), até cinco enterotoxinas já foram correlacionadas com a síndrome diarreica. A toxina emética cereulide é um duodecapeptídeo com estrutura: ([D-O-Leu-D-Ala- L-O-Val-L-Val]₃). Essa toxina está localizada num grande plasmídeo relacionado ao plasmídeo pXO1 de *B. anthracis* (EHLING-SCHULZ et al., 2006). Esse plasmídeo foi originalmente nomeado de pBCE4810, mas também é referenciado como pCER270 (RASKO et al., 2007).

B. cereus pode provocar dois tipos de sintomatologia no organismo humano: a síndrome emética e a diarreica (VILAS BÔAS et al., 2007). O *B. cereus* pode causar toxinfecção por colonização do intestino delgado com produção de enterotoxinas e subseqüente síndrome diarreica, ou pela produção de cereulide nos alimentos, a qual causa síndrome emética após a

ingestão dos alimentos. Uma vez que a cereulide tem um grau de termorresistência elevado e é difícil de inativar, não se conhece atualmente nenhum método para destoxificar os alimentos. A síndrome emética causada por *B. cereus* se assemelha a toxinfecção por *Staphylococcus. Aureus* (BHUNIA, 2007; JÄÄSKELÄINEN, 2008). Na Tabela 4 se apresenta as características das síndromes emética e diarreica produzidas por *B. cereus*.

Tabela 4 – Características das síndromes diarreica e emética causadas por por *Bacillus cereus*

	Síndrome Diarreica	Síndrome Emética
Dose infecciosa	10 ⁵ -10 ⁷ (total)	10 ⁵ -10 ⁷ (célula por grama)
Toxina produzida	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Proteica	Peptídeo cíclico
Período de incubação	8-16 h (ocasionalmente > 24 h)	0,5-6 h
Duração	12-24 h (ocasionalmente vários dias)	6-24 h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea	Náusea, vomito Mal-estar

Fonte: Adaptado de Granum e Lund, (1997).

Devido ao fato da toxina emética cereulide ser resistente em condições ácidas, à proteólise e às altas temperaturas, ela não é destruída pelo suco gástrico, enzimas proteolíticas do trato intestinal ou aquecimento de alimentos, podendo conduzir a vômito poucas horas após sua ingestão (SHINAGAWA et al., 1996). O mecanismo pelo qual a toxina cereulide conduz à síndrome emética em humanos não é bem definido. Contudo, experimentos utilizando modelos animais parecem evidenciar um mecanismo mediado pela ligação da toxina a receptores específicos, presentes no duodeno. Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, no entanto, estabeleceu-se que a toxina atinge o nervo vago, através da ligação ao receptores de serotonina 5-HT3 induzindo vômito causando danos às células, Além disso, também pode causar falência hepática, pois como é um ionóforo do potássio inibe a oxidação dos ácidos graxos afetando assim a atividade mitocondrial nos hepatócitos, o que resulta na degeneração maciça destes últimos, como evidenciado na figura 2. (VAN DER Z. et al., 2000).

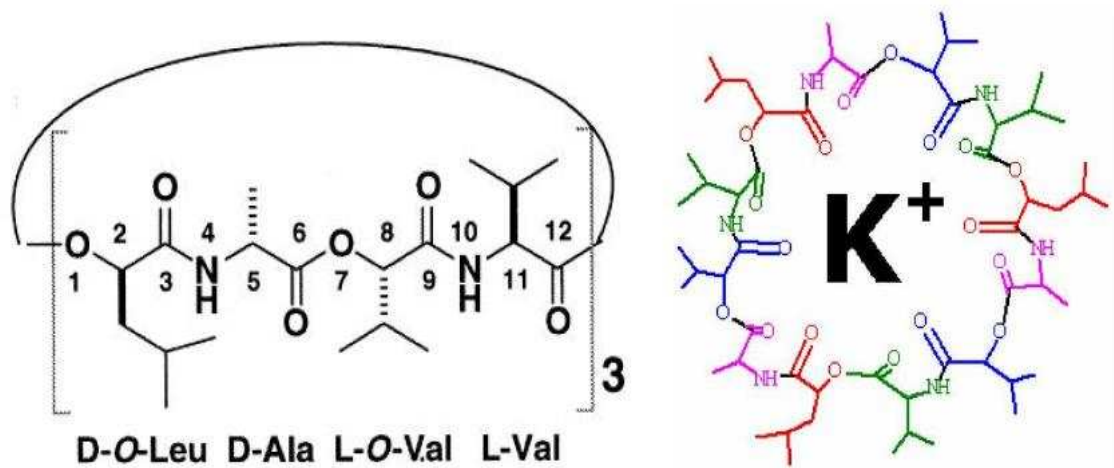


Figura 2 – Estrutura da cereulide e sua estrutura 3 D ao incorporar um íon de potássio

Fonte: Adaptado de Jääskeläinen, 2008

Devido à ampla distribuição do *B. cereus* na natureza e à resistência dos seus esporos a condições adversas, existem vários alimentos associados a toxinfecções por esta bactéria. A síndrome emética está associada ao consumo de arroz, massas e outros alimentos ricos em amido, pudim de leite, molho de baunilha e leite em pó, enquanto que a síndrome diarreica está associada, principalmente, ao consumo de carne, peixe, vegetais e laticínios. A dose infecciosa é bastante variável, indo de 10^5 a 10^8 células ou esporos por grama de alimento (BHUNIA, 2007).

A produção máxima de toxina parece ocorrer em culturas incubadas entre 12 e 22 °C, durante o início da fase estacionária da multiplicação, ainda que variando entre estirpes. A quantidade de cereulide produzida é dependente da temperatura de incubação e do meio de cultura, bem como de outros fatores extrínsecos como o pH, presença de oxigênio e de aminoácidos específicos; a glucose tende a suportar a produção de cereulide enquanto a presença de quantidades excessivas de leucina, isoleucina e ácido glutâmico reprimem significativamente a sua síntese (MARTINEZ et al., 2011). Uma vez que os esporos de *B. cereus* sobrevivem, em geral, à pasteurização ou ao processamento do alimento e germinam em células vegetativas quando a

temperatura lhes é favorável, a cereulide é geralmente produzida durante o armazenamento prolongado dos alimentos (EHLING-SCHULZ et al., 2004; BHUNIA, 2007).

Pensa-se que a síndrome emética esteja frequentemente associada a alimentos ricos em amido, uma vez que a maior parte das estirpes eméticas não consegue hidrolisar o amido, e como tal o alimento vai ter aspecto e sabor normais mesmo que contenha uma quantidade elevada de *B. cereus*. Os sintomas típicos consistem em náusea e vômito e aparecem em média 3 h (0,5 a 6 h) após a ingestão dos alimentos contaminados. Portanto a síndrome emética do *B. cereus* é semelhante a intoxicação por *S. aureus* (BHUNIA, 2007; JÄÄSKELÄINEN, 2008). As toxinas eméticas do *B. cereus* e do *S. aureus* são distinguíveis em relação ao tamanho, mecanismos de ação e de síntese, dose emética e pelos alimentos aos quais estão associadas, como observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades das toxinas eméticas do *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Características	Cereulide	Enterotoxina <i>S. aureus</i>
Tipo e tamanho	Dodecapsipeptídeo 2.4 KDa	Proteína 25 – 29 KDa
Síntese	Não ribossomal	Ribossomal
Mecanismo	Ionóforo, toxina mitocondrial	Superantígenos
Sintomas	Náusea e vômito; possível Atividade neurotóxica	Náuseas e vômito, dores Abdominais; atividade mitogênica
Dose emética mínima	30 µg/kg	100 µg/kg
Período de incubação	0.5-6 h	0.5-6 h
Duração	6-24 h	6-24 h
Produção	Pré-formada nos alimentos	Pré-formada nos alimentos
Estabilidade	Termoestável, resistente ao ácido	Termoestável, resistente ao ácido
Digestão	Não digerida	Não digerida
Prevalência nos alimentos	Arroz, massas	Laticínios, produtos de carne, produtos de pescado

Fonte: Adaptado de Ehling-Schulz *et al.*, 2004.

O potencial patogênico é dado principalmente pela toxicidade do micro-organismo, ou seja, pela capacidade de produzir toxinas e substâncias

químicas capazes de provocar um dano no hospedeiro e em desenvolver uma doença.

B. cereus é frequentemente encontrado em arroz na forma de esporos resistentes ao calor, uma vez que a reidratação deste alimento dará condições viáveis a sua germinação, se esta ocorrer. Das várias formas de tratamento térmico, o cozimento em vapor sob pressão, a fritura e o assar em forno a temperaturas superiores a 100 °C permitirá a eliminação das células vegetativas, contudo parte dos esporos pode não ser eliminado, pois já se sabe que nem todos os esporos poderiam germinar ao mesmo tempo e que resistem a temperaturas superiores a 100 °C (BLACKBURN e McCLURE, 2000).

O controle consiste inicialmente em limitar a germinação dos esporos, manutenção de um nível baixo de células viáveis (< que 10⁴ células), ou seja, controlar a multiplicação das células ali presentes, através do controle da temperatura, Aw, pH e combinação destes (LAKE et al., 2009). Para carnes de porco Byrne et al. (2006) verificaram que um tratamento térmico, o qual pudesse destruir células vegetativas e esporos do *B. cereus* e *Clostridium perfringens*, precisaria de 2 min a temperatura de 50 °C e 1 min para temperatura de 60 °C (LEE et al., 2009)

3.5. Técnica do PCR para identificação genética

Até o ano 1980, antes da descoberta da técnica de PCR, testes de identificação genética era feitos por métodos bacteriológicos de enriquecimento e isolamento do organismo de amostras clínicas ou alimentares, sendo feitos, posteriormente, testes adicionais bioquímicos e/ou imunológicos, para confirmação da identidade do organismo, métodos acima mencionados e sugeridos pelas normas da ISO (RAY, 2004)

Com a descoberta e análises dos genomas bacterianos, passou a ter-se conhecimento da base genética de fenótipos úteis para a distinção entre organismos patogênicos e comensais, com relações genéticas próximas e com o mesmo habitat (MAURER, 2006). A partir da técnica de PCR, fragmentos específicos de DNA são amplificados durante um processo cíclico de três passos:

- a. O DNA alvo, ou seja, aquele que queremos amplificar, é desnaturado a altas temperaturas;
- b. Dois oligonucleótidos sintéticos, denominados primers, são ligados a cadeias opostas, a uma temperatura que apenas permite a hibridação ao alvo correto;
- c. É feita a polimerização, de DNA pela enzima DNA polimerase, com os oligonucleótidos como primers e o DNA alvo como molde.

Sendo este processo repetido inúmeras vezes é obtida uma amplificação exponencial do DNA ladeado pelos dois oligonucleotídeos. Em primeiro lugar, tem de ser escolhida uma amostra para detecção por PCR.

Após a escolha de uma amostra, há que ter conhecimento se o organismo contamina o alimento em altas concentrações ou se, pelo contrário, é necessário um enriquecimento de cultura prévio para uma amplificação do número de células bacterianas. Estes pré-enriquecimentos permitem que as bactérias sejam detectadas mais rapidamente por PCR, do que por métodos bacteriológicos padrões, isto porque se tratam de resultados qualitativos, (presença/ausência) e não quantitativos, (UFC/g). Este fator torna a escolha da amostra ainda mais importante, visto que só o fato de o organismo estar presente é relevante, independentemente da quantidade de células (MAURER, 2006).

A técnica de PCR tornou-se mais reconhecida pelo seu potencial como fonte alternativa a métodos de cultura, na busca de micro-organismos patogênicos alimentares. Tem como principais vantagens a sua especificidade e rapidez, comparadas com técnicas culturais tradicionais. Contudo a sensibilidade vai variar com a matriz alimentar envolvida. Devido à complexidade desta última, muitos compostos nos alimentos são inibitórios às reações de PCR. Para contrariar este aspecto, muitas vezes as amostras alimentares são enriquecidas antes dos passos de amplificação. Assim, além de haver um aumento do número de micro-organismos alvo, há um aumento de sensibilidade de detecção e uma ajuda na redução do risco de amplificação de ácidos nucleicos de células mortas ou não viáveis (RAY, 2004).

A detecção da reação pode ser feita de várias formas. Uma delas, mais comum, é a colocação da amostra em gel de agarose, sendo os fragmentos, se

presentes, separados por eletroforese baseada no tamanho das amostras. O gel de agarose e o tampão de eletroforese contêm brometo de etídio, (EtBr), que se liga à dupla cadeia de DNA originando fluorescência sob luz ultra violeta (OLSEN, 2005).

Na interpretação dos resultados desta técnica qualitativa, podemos dizer que uma amostra é positiva quando um fragmento é produzido, com o tamanho esperado, de acordo com os primers usados. Se o seu tamanho for superior ou inferior do esperado a amostra deverá ser negativa, (amplificação inespecífica). Assim utilizando-se um marcador de pesos moleculares padrões, ajudando na verificação do tamanho dos fragmentos e uma amostra já conhecida, denominada controle positivo, utilizada como termo de comparação (MAURER, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Hematozoários – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Mnas Gerais, Brasil.

4.1. Amostragem do arroz

Uma empresa comercial forneceu, para a condução desse experimento, 20 kg de arroz branco e 8 kg de arroz Ultra Rice® (Figura 3) embalados em sacos plásticos e armazenados à temperatura ambiente. Cada unidade amostral foi preparada no LHMA, adicionando 250 g de arroz em sacos plásticos previamente esterilizados. As amostras de arroz vitaminado foram preparadas segundo as proporções utilizadas comercialmente; sendo 99 partes de arroz branco e 1 parte de arroz Ultra Rice® (Arroz Vitaminado na proporção 99:1) sendo esta a proporção que permita a disponibilidade de os nutriente para que o produto seja denominado arroz vitaminado.

O número de amostras mínimo necessário para a execução do experimento foi calculado pela equação 1, (MUNIZ e ABREU, 1999), considerando uma prevalência de 2% de *Bacillus cereus*.

$$n = \frac{t^2 * p(1-p)}{m^2} \quad (1)$$

n = número de amostra

t = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado (1.96)

p = prevalência *B. cereus*

m =margem do erro 5% (0,05)

Pelo qual, 30 amostras de arroz branco, 30 amostras de arroz Ultra Rice® e 30 amostras de arroz vitaminado, foram preparadas para as análises microbiológicas

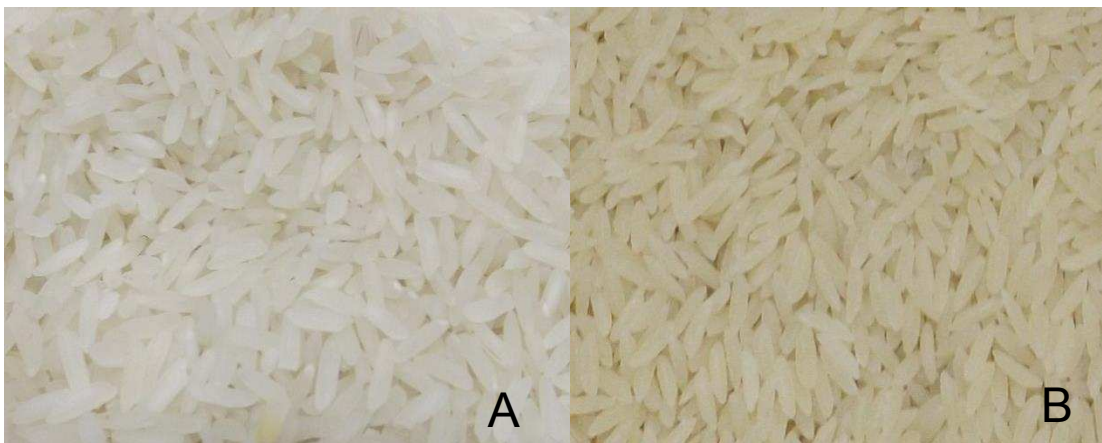


Figura 3 - Fotografias de amostras de arroz branco (A) e arroz Ultra Rice® (B).

4.2. Análises microbiológicas

Foi determinada a presença de *B. cereus* nas diferentes amostras de arroz cru (arroz branco, arroz Ultra Rice® e arroz vitaminado). Foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e adicionados 225 mL de água peptonada 1% (m/v). A mistura foi homogeneizada em *stomacher* (Marconi MA 440) por 90 s, sendo esta a diluição 10^{-1} . Diluições decimais sucessivas foram realizadas em 9 mL de água peptonada 0,1% considerando-se 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e volumes de 0,1 mL foram inoculadas em superfície de meio seletivo ágar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina B (MYP) para detecção de *B. cereus* com ajuda de alça de Drigalsky e incubadas a 35 °C durante 24 h.

4.3. Testes morfológicos e bioquímicos para isolados de *B. cereus*.

Colônias típicas para *B. cereus* foram isoladas das placas de MYP e posteriormente submetidas às análises de coloração de Gram e, aos testes bioquímicos para identificação das espécies isoladas.

Os seguintes testes bioquímicos foram realizados:

4.3.1. Motilidade e redução de nitrato

Tubos contendo ágar motilidade-nitrato foram inoculados com os isolados, com agulha e incubados a 35 ± 1 °C por 18 a 24 h. Após incubação, verificou-se o tipo de multiplicação presente. Culturas imóveis mostram multiplicação apenas na linha de inoculação, enquanto as que apresentam motilidade multiplicam-se de forma difusa. *B. cereus* em 50% a 90% dos casos mostra-se móvel.

Após a leitura da motilidade, foram adicionados aos tubos 2 a 3 gotas de α -naftilamina 0,5% p/v e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico 0,8% p/v. O aparecimento de coloração rósea indica positividade para redução de nitrato.

Quando não houver desenvolvimento de coloração, adiciona-se ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nesta situação, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa, enquanto o não desenvolvimento de cor indica positividade pois *B. cereus* reduz o nitrato a nitrito.

4.3.2. Fermentação anaeróbica de glicose

Tubos contendo 3 mL de caldo de vermelho de fenol dextrose foram inoculados com os isolados usando-se alça de platina e incubados a 35 ± 1 °C por 24 h em anaerobiose. Mudança de cor de vermelho para amarelo indica que foi produzido ácido. O ácido é produzido a partir da glicose, em condições de anaerobiose, por *B. cereus* e outros membros do grupo *Bacillus*.

4.3.3. Decomposição da tirosina

Superfícies de ágar tirosina (inclinado em tubo) foram inoculadas com os isolados por estrias usando-se alça de platina. Os tubos foram incubados a 35 ± 1 °C por 48 h. Após incubação, observa-se o aparecimento de uma zona clara próxima ao crescimento produzida pela decomposição da tirosina.

4.3.4. Crescimento rizoide

Superfícies de ágar nutriente foram inoculadas com isolados usando-se alça de platina, depositando-se o inóculo no ponto central da placa. Às placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 a 72 h.

Após incubação observou-se o crescimento rizoide que se caracteriza pelo aparecimento de colônias com longas extensões em forma de raízes ou longos fios. Isolados típicos de *B. cereus* não apresenta crescimento rizoide, porém algumas estirpes podem apresentar colônias rugosas em forma de galáxia.

4.3.5. Teste Voges-Proskauer (VP)

Meio VP modificado foi inoculado com os isolados e incubado a 35 ± 1 °C por 48 h. Presença de acetilmetilcarbinol foi determinada pela adição de 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% m/v e 0,6 mL de solução alcoólica de α -naftilamina para um mL de cultura em tubo teste. Adição de cristais de creatina acelera a reação desenvolvendo cor púrpura em 15 min. Acetilmetilcarbinol é produzido a partir de glicose por membros do grupo *B. cereus*

4.4. Identificação genética dos isolados

4.4.1. Isolamento do DNA

A extração de DNA genômico dos isolados positivos nas provas bioquímicas e morfotintoriais foi realizada com o kit “*Bacterial Genomic DNA Isolation*” (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a extração de DNA, os isolados foram reativados em tubos contendo 10 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 35 °C durante 24 h. A partir de cada tubo inoculado, foram tomadas amostras de 1 mL, para ser transferida a tubos de 1,5 mL os quais foram centrifugados a 14.000 *g* por 2 min para obtenção de um *pellet* de cada amostra, sendo o sobrenadante descartado, após a centrifugação. O *pellet* foi ressuspendido em 480 µL de EDTA 50 mM e misturado com 120 µL de solução de lisozima (400 mg.mL⁻¹) para permitir a degradação da parede celular e a liberação total do DNA bacteriano e submetido ao vortex por 30 s.

Os tubos contendo as amostras foram incubados em banho-maria a 37 °C por 60 min, seguido por centrifugação a 14.000 *g* por 2 min e o sobrenadante descartado, após a centrifugação. Adicionaram-se 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* em cada tubo e foram incubados em banho-maria a 80 °C por 5 min, e após resfriamento à temperatura 25 °C adicionaram-se 3 µL de *RNase Solution* e submetido a vortex por 20 s. Foi feita incubação a 37 °C por 60 min novamente e após resfriamento a temperatura ambiente foram adicionados a cada tubo 200 µL de *Protein Precipitation Solution* e submetidos a vortex por 20 s e incubados em gelo por 5 min.

As amostras foram centrifugadas novamente a 14.000 *g* por 3 min e o sobrenadante contendo DNA transferido a tubo limpos contendo 600 µL de isopropanol, os quais foram centrifugados a 14.000 *g* por 2 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 600 µL de etanol 70 % para submeter as amostras novamente à centrifugação a 14.000 *g* por 2 min e após essa etapa permitiu-se a evaporação do etanol de cada tubo. Foram

adicionados a cada tubo seco, 100 µL de *DNA Rehydration Solution* e armazenados a 4 °C até utilização.

4.4.2. Análise de PCR dos isolados

O DNA extraído dos isolados positivos foi submetido a identificação genética por análise de PCR convencional, utilizando um par de primers universais designados 27F e 1378R identificados na Tabela 6, para determinação de gênero e espécie que amplificam o gene ribossomal bacteriano 16S.

Tabela 6 - Primers utilizados para detecção do gene 16s Ribossomal

Primer	Gene	Fragmento amplificado tamanho (bp)	Sequência (5'→3')	Fonte
27F	16s	1400	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	SIGMA
1378R	16s	1400	CGG TGT GTA CAA GGCCCGGGA ACG	

Fonte: Ehling-Schulz et al., 2006.

A PCR foi realizada em microtubos apropriados de 0,2 mL, com tampa plástica, onde foram adicionados 25 µL de uma mistura de reagentes para a promoção de reação do PCR. Essa mistura é composta de 5 µL do reagente *5X Colorless Go Taq® Flexi buffer* (Promega, Estados Unidos), 3 µL de MgCl₂ (Promega, Estados Unidos) na concentração de 25 mM, 2 µL de dNTP a 0,4 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega, Estados Unidos), 0,2 µL de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* na concentração de 5 unidades/µL (Promega, Estados Unidos), 0,5 µL do *primer iniciador*, 0,5 µL do *primer reverso*, 4 µL de DNA e 9,8 µL de água Mili Q esterilizada a 121 °C. A PCR foi realizada no termociclador ATC 401 (CLP, Estados Unidos) disponível no laboratório de Hematozoários, de acordo com o seguinte protocolo: 5 min de desnaturação a 95 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 7 min. Confirmação da identificação genética dos isolados foi feita mediante o sequenciamento dos produtos

amplificados do PCR para o gene 16s e sua comparação no banco de seqüências da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

4.4.3. Eletroforese

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,4% em tampão TEB (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) usando marcador de 100 pb DNAladder (Invitrogen, Inglaterra) para observar as bandas dos fragmentos de DNA contidos nos isolados.

4.4.4. Purificação do DNA

A purificação do produto de PCR foi feita utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos). Um volume de agarose contendo o fragmento de DNA, previamente visualizado no gel, foi recortado com ajuda de um bisturi e transferido para um tubo de 1.5 mL esterilizado de peso conhecido. Foi subtraído o peso de tubo vazio do peso do tubo total para obter a porção de gel.

Após da determinação do peso, foi adicionado à solução de ligação em uma proporção de 10 µL de solução por cada 10 mg de agarose. Após adição a solução de ligação foi misturada no vortex por 30 s e incubada a 57 °C por 10 min até o gel ficar completamente diluído na solução.

A solução contendo o fragmento de gel diluído foi transferido para uma Microcoluna SV montada junto a um tubo coletor. Após de transferir a mistura para a coluna, foi centrifugada a 16.000 g durante 1 min. O líquido permeado depositado no tubo coletor foi descartado e montado novamente o tubo coletor na coluna. Para a etapa de limpeza, foram adicionados 700 µL de etanol (95%) e a coluna foi centrifugada novamente a 16.000 g por 1 min.

Após da centrifugação, o permeado foi descartado e a coluna montada no tubo coletor. Foram adicionados 500 µL de etanol (95%) e centrifugado novamente a 16.000 g por 5 min, para evaporar o etanol que poderia ficar na coluna. Após centrifugação, foi descartado o tubo coletor e a coluna montada a um novo tubo.

Para diluir o DNA, foram adicionados 50 µL de água livre de ácidos nucléicos no centro da sílica que fica no interior da microcoluna, tendo-se cuidado de não tocá-la com a ponta da ponteira para evitar contaminação da amostra. A coluna foi centrifugada a 16.000 g por 1 min. Após centrifugação a coluna foi descartada e o tubo armazenado até o momento de sua utilização.

4.4.5. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos genes foi realizado no Laboratório da Macrogen inc. na república da Coreia. As sequências foram comparadas com àquelas depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTN. O programa BLASTN compara as sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento, com sequências depositadas no banco de dados.

4.5. Inoculação de esporos de *Bacillus cereus* ao arroz cru branco e vitaminado, cocção de arroz e cinética de multiplicação do micro-organismo nas diferentes temperaturas de estocagem

4.5.1. Produção dos esporos

Foi utilizada uma cultura de células vegetativas de *B. cereus* Ribotipo 1-222-173-S4 isolada de ambiente de indústria de Laticínios, pertencente ao estoque do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, (LHMA) (SALUSTIANO, 2009). As suspensões de esporos desse micro-organismo foram preparadas utilizando-se adaptação da metodologia proposta pela *National Canners Association/USA* conforme a descrição a seguir.

Inicialmente, o isolado foi repicado por três vezes consecutivas em ágar nutriente, solidificado na posição inclinada em tubo de ensaio de 15 x 160 mm e incubações de 24 h a 30 °C. Uma suspensão de células vegetativas foi obtida pela adição de 10 mL solução tampão fosfato (0,1 M) e agitação manual.

Em seguida, volumes de 1 mL dessa suspensão foram inoculados nas superfícies de 50 mL de meio de esporulação: 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de triptona, 1,0 g de amido, 10,0 mg de sulfato de manganês e 20,0 g de ágar em 1000 mL de água destilada em pH final entre 6,9 e 7,1 contidos em quatro erlenmeyers de 500 mL a produção de esporos foi acompanhada até que a formação de 90% a 95% de esporos nos campos microscópicos observados em lâminas coradas pela coloração de Gram (ANDRADE, 1993).

Ao fim da incubação, foram adicionados 20 mL de água destilada sobre as superfícies do meio de cultura dos erlenmeyers e pérolas de vidro esterilizadas. Os erlenmeyers foram agitados manualmente; o sobrenadante foi coletado separadamente em quatro tubos de centrifuga com capacidade de cerca de 25 mL e foram centrifugados a 2500 g durante 15 min, a 4 °C. Foi feita ressuspensão dos sedimentos de esporos em água destilada esterilizada, novamente foi centrifugada e o processo foi repetido cinco vezes. Ao final, os esporos de cada tubo de centrifuga foram suspensos em glicerol e água (18:85) e, em seguida, coletados num único tubo de ensaio com capacidade de cerca de 60 mL, o que constituiu um lote.

O lote de esporos foi padronizado para conter em torno de 10^9 esporos por mL, usando espectrofotômetro. Esse número foi obtido quando 1 mL dessa suspensão de esporos diluída em 30 mL de água destilada originava uma absorbância entre 0,4 e 0,5, a 600 nm. A confirmação final de número de esporos no lote, após choque térmico de 80 °C por 15 min, foi feita em placas com ágar para contagem total (PCA), incubadas a 30 °C por 48 h. Foram preparados três lotes de esporos (ANDRADE, 1993).

4.5.2. Inoculação dos esporos ao arroz cru e cocção do arroz

Imediatamente antes da cocção, 350 g de amostras de cada tipo de arroz (arroz branco e arroz vitaminado) foram inoculados com 10 mL de suspensão de esporos contendo 10^5 esporos por mL e foi realizada uma homogeneização para distribuir os micro-organismos nas amostras com uma espátula esterilizada.

As amostras de arroz inoculadas com suspensões de esporos, foram adicionadas de 650 mL de água esterilizada, 4 mL de óleo vegetal e 2 g de cloreto de sódio e submetidas à cocção por 80 °C por 15 min ou até no ponto para consumo, em frasco erlenmeyers de 1000 mL. Foi pesado o arroz após cocção e determinada concentração final de esporos bacteriano por grama de alimento. O arroz cozido foi resfriado entre 20 °C e 25 °C em estufas incubadoras para demanda bioquímica de Oxigênio (B.O.D).

4.5.3. Cinética de multiplicação de *Bacillus cereus* no arroz sob duas temperaturas de armazenamento, tempos de geração do micro-organismo e estimativa de tempo para produção de toxina.

Porções do arroz foram armazenadas a 10 °C e 25 °C e o número de células vegetativas de *B. cereus* foi determinada após 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Foi feita a análise microbiológica do arroz para determinação de presença *B. cereus* com meio de cultura seletivo MYP como descrito no item 4.2. O experimento foi realizado em três repetições para elaborar curvas de crescimento e por regressão linear, foram selecionados os segmento com os maiores coeficientes angulares, correspondentes as fases de crescimento exponencial para o arroz vitaminado e arroz branco para cada temperatura teste (AZEREDO, 1998).

Os coeficientes angulares, representam as taxas máximas de crescimento (μ máximo) e expressam o crescimento populacional em ciclos logarítmicos por hora. Os valores de tempo de geração (TG) foram calculados com o inverso do valor μ máximo, o valor de TG expressa o tempo em horas que o *B. cereus* precisa para duplicar sua população.

A estimativa de tempo para produção de toxina, considerando que contagens de $1,0 \times 10^5$ do micro-organismo são perigosas de causar as síndromes emética ou diarreica, foi calculada com a equação (2) considerando 5 log UFC/g o valor mínimo necessário para a produção de toxina.

$$x = \frac{5 - a}{b} \quad (2)$$

x: Tempo estimado para atingir os 5 log UFC/g

5: população necessária para a produção de toxina determinado em log UFC/g

a: coeficiente definido pela reta na regressão linear

b: μ máximo

4.5.4. Análise estatística

O experimento desafio foi realizado em três repetições, com inoculação de esporos de *B. cereus* foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, (DIC), com três tratamentos (arroz branco e arroz vitaminado contaminados com suspensão de esporos e arroz controle sem adição de esporos), duas temperaturas de armazenamento (10 °C e 25 °C) e cinco tempos de armazenamento (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Foram elaboradas curvas de crescimento por regressão linear, e selecionados os segmentos com os maiores coeficientes angulares, correspondentes as fases de crescimento exponencial para o arroz vitaminado e arroz branco para cada temperatura teste (AZEREDO, 1998). Os coeficientes angulares, representam as taxas máximas de crescimento (μ máximo) expressam o crescimento populacional em ciclos logarítmicos por hora. Os valores μ máximo foram comparados pela análise de variância e Teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.2, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de *Bacillus cereus* nos diferentes tipos de arroz

5.1.1. Características morfológicas e bioquímicas

Isolados suspeitos nas análises microbiológicas no meio MYP, evidenciaram crescimento típico de *B. cereus* (Figura 4). Esse micro-organismo não consegue fermentar o manitol e as suas colônias ficam cor-de-rosa devido ao vermelho de fenol. Devido à produção de lecitinase pela maior parte de estirpes de *B. cereus*, verifica-se uma zona de precipitação em torno das colônias típicas.

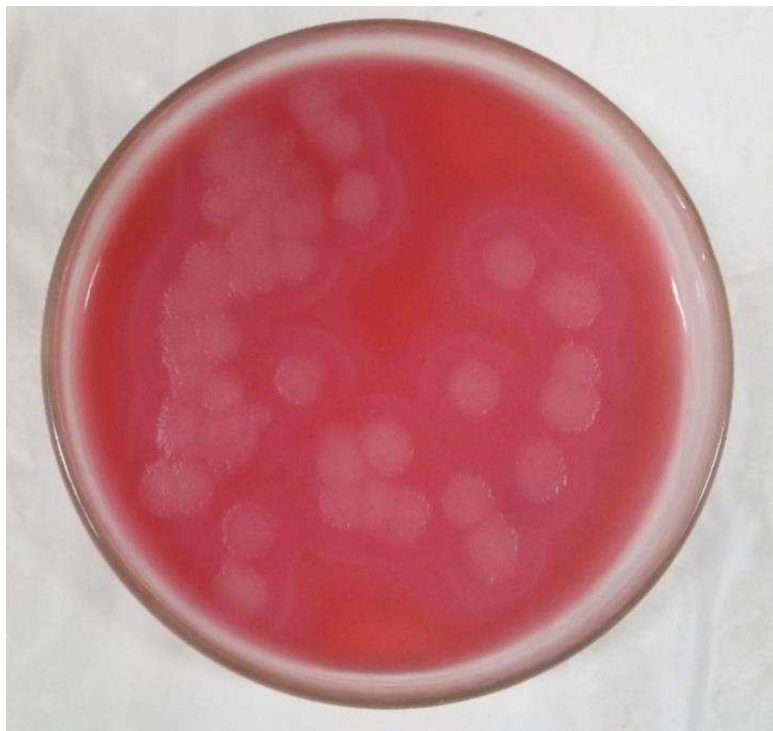


Figura 4 - Colônia cor-de-rosa típica de *Bacillus cereus* em meio MYP: apresentam halo de lecitinase, não há formação de ácido devido a incapacidade da bactéria de fermentar o manitol.

Na Figura 5, verificam-se as características morfo-tintoriais de isolado suspeito em MYP: bastonete longo, com bordas retangulares, gram-positivo, conforme observado no microscópio ótico.

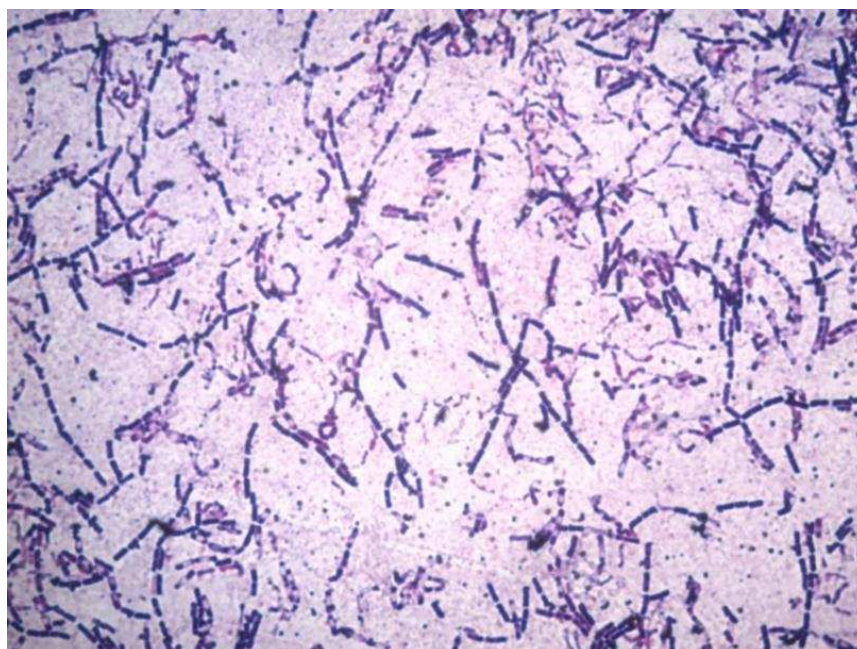


Figura 5 - Células vegetativas de *Bacillus cereus*: bastonete longo, com bordas retangulares, gram-positivas, observadas no microscópio ótico.

Na Tabela 7, observam-se os resultados das provas bioquímicas das 26 isolados suspeitos nas análises microbiológicas em meio de cultura MYP) que evidenciaram crescimento típico de *B. cereus*.

Constata-se que, dos 26 isolados de amostras de arroz inicialmente encontrados, 24 apresentaram resultados positivos nas provas bioquímicas de redução de nitrato e motilidade, Voges-Proskauer, decomposição de tirosina, fermentação anaeróbica de glicose e resultados negativos para o teste de crescimento rizoide.

Tabela 7 - Resultados de provas Bioquímicas dos isolados coletados de Arroz Branco (AB), Ultra Rice® (UR), e Arroz Vitaminado (AV).

Produto	Lote	Gram	Nitrato/ Motilidade	Glicose	Tirosina	C. Rizoide	Voges- Proskauer
Arroz Branco	AB1	+	-	+	-	-	-
Arroz Branco	AB2	+	-	+	-	-	-
Arroz Branco	AB3	+	+	+	+	-	+
Arroz Branco	AB4	+	+	+	+	-	+
Arroz Branco	AB25	+	+	+	+	-	+
Arroz Branco	AB26	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR2	+	+	+	+	-	+

Arroz Ultra Rice®	UR5	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR12	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR15	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR17	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR20	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR25	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR26	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR27	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR28	+	+	+	+	-	+
Arroz Ultra Rice®	UR30	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT6	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT9	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT10	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT11	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT12	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT17	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT20	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT23	+	+	+	+	-	+
Arroz Vitaminado	VIT27	+	+	+	+	-	+

Legenda: +, positivos; -, negativo.

5.2. Confirmação genética dos isolados de *Bacillus cereus* do arroz.

Os resultados das análises de PCR confirmaram aqueles encontrados nos testes bioquímicos. Os 24 isolados foram identificados como *B. cereus* nos testes de biologia molecular. Na eletroforese em gel de agarose, foi observada amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1400 pb, para os isolados dos diferentes tipos de arroz (Figura 6). A amplificação foi compatível com a de uma estirpe de *B. cereus*, utilizada como controle positivo. Por outro lado, foi incompatível com a amplificação de fragmentos de DNA de uma estirpe de *Salmonella* Enteritidis, usada como controle negativo.

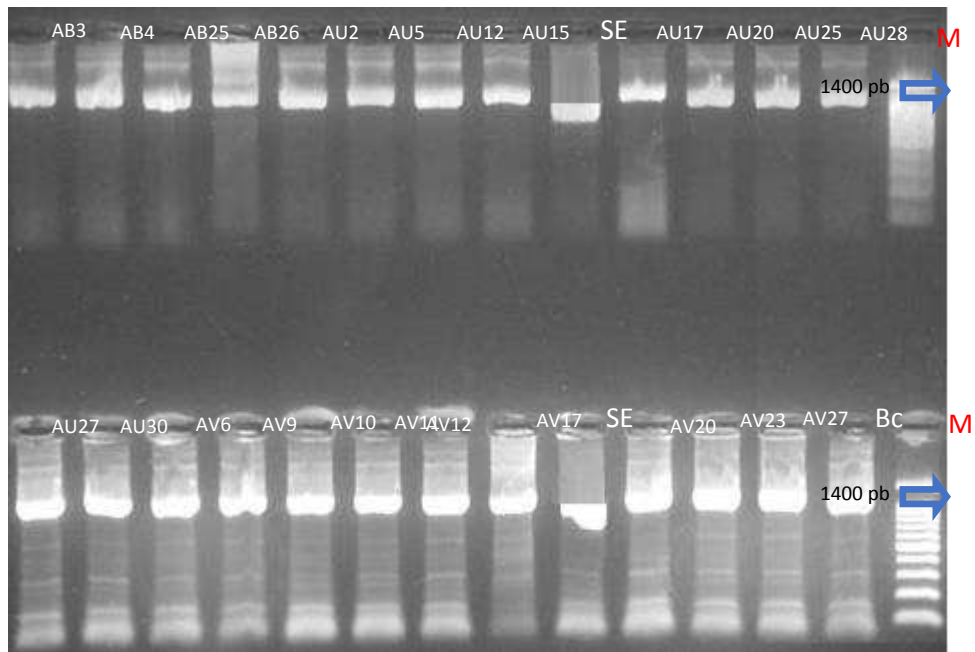


Figura 6 - Eletroforeses em gel de agarose com marcador molecular de 100 pb (M), do produto de PCR amplificado para o gene 16s em *Bacillus cereus*. Amostras de arroz branco (AB) Ultra Rice® (AU) e arroz vitaminado (AV), *Salmonella* Enteritidis (SE) controle negativo e *Bacillus cereus* (Bc) Ribotipo 1-222-173-S4 controle positivo.

5.3. Sequenciamento do DNA positivo para *Bacillus cereus*.

Na Figura 7, observa-se que os micro-organismos isolados de Arroz Branco (AB), Ultra Rice® (UR) e arroz vitaminado (AV) apresentaram seqüências genéticas semelhantes às de *B. cereus* ADI-10, após comparação no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLASTN. ADI-10 é uma estirpe de *B. cereus* encontrada em solos de cultivos de arroz em pesquisas feitas por Mohan e Naveena (2015). A similaridade foi de 99%.

```

AB      -----GATTACTAGAGATCCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG 55
AU      -----TCTCGTGATACCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCC--AACTG 50
AV      -----ACTAGAGTATCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG 51
ADI-10  AGGATGGACGCTGGCGGCGT--GCCTAATACATGCAAGTCG-AGCG---AAT--GGATTA 52
          ** * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AB      AGAAC--GGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTG-TA--CCGT 110
AU      AGAAC--GGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTG-TA--CCGT 105
AV      AGAAC--GGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTG-TA--CCGT 106
ADI-10  AGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGG---ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC 109
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AB      CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA 170
AU      CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCCTCCCCA 165
AV      CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA 166
ADI-10  CCAT---AAGACTGGGATAACTCCGGGAACCGGGGC-TAAT-ACCGGATAACATTTTGA 164
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

ADI-10   ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCC 1013
          ** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AB       GTC-----AGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC 1017
AU       GT-----AGATTGCC----TTGCGGAAGAT-CCCTACGGC-GCCTCCCGTAGGAG-C 968
AV       GTC-----AGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC 1013
ADI-10   TTCGGGAGCAGAGTGACAG--GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT-CGTGTCGTGAGATGT 1070
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC---GATC-----ACCTC-TCAGGTCGGGTA 1067
AU       TGGGCCGTGT--CAGTCCCAGT-TGGCC---GATC-----CCCTC-TCAGGTCGGGTA 1014
AV       TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC---GATC-----ACCTC-TCAGGTCGGGTA 1063
ADI-10   TGGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCA 1130
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       CGC---ATCGTTGCCT-TGGTGAGCCG-----TTACCTCA--CCAAC-TA 1105
AU       CGC---ATCGTTGCCT-TGGTGAGCCG-----T-ACCTCA--CCAAC-TA 1051
AV       CGC---ATCGTTGCCT-TGGTGAGCCG-----TTACCTCA--CCAAC-TA 1101
ADI-10   CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAACCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG 1190
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       GCTAATGCGACGCGGGTC-CAT----CCATAAGTGACAGC-----CGAAGCCG 1148
AU       GCTAATGCGACGCGGGTC-CAT----CCATAAGTGACAGC-----CGAAGCCG 1094
AV       GCTAATGCGACGCGGGTC-CAT----CCATAAGTGACAGC-----CGAAGCCG 1144
ADI-10   CCCCTTATGACCTGGGCTACACACCGTGTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCG 1250
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       CCTT-----TCAATTCG--AACCATGC--AGTTCAAA-TGTTATCCGGTATTAGCC- 1195
AU       CCTT-----TCAATTCG--AACCATGC--AGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCC- 1142
AV       CCTT-----TCAATTCG--AACCATGC--GGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCC- 1192
ADI-10   CGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT 1310
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       -----CCGGTTCCCGGAGTTATCCAGTCT--TATG----GGCAGGT---TACCCA 1238
AU       -----CCGGTTCCCG-AGTTATCCAGTCT--TATG----GGCAGGT---TACCCA 1184
AV       -----CCGGTTCCCGGAGTTATCCAGTCT--TATG----GGCAGGT---TACCCA 1235
ADI-10   ACATGAAGCTGGAATCGCT-AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG 1369
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       CGTGTTACTCAC-CCGTCCGCCG-----TAACTTCATAAG-----AGC 1276
AU       CGTGTTACTCAC-CCGTCCGCCG-----AACTTC--AAG-----AGC 1219
AV       CGTGTTACTCAC-CCGTCCGCCG-----TAACTTCATAAG-----AGC 1273
ADI-10   GGCCTTGTACACACGCCCGCTCACACCAGAGGTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGT 1429
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AB       AAGCTCTT--AATCCACTCGCTCGACTTGC-C-CA-----TG----- 1309
AU       AAGCT-TT--AATCCATTGCTCGACTTGC-AGTA-----TAGG--- 1254
AV       AAGCTCTT--AATCCATTGCTCGA----- 1296
ADI-10   AACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGAATAATGATTGGGGTG 1476
          ** * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 7 - Alinhamento e comparação das sequências de DNA de *Bacillus cereus* ADI-10 e as sequências de DNA amplificadas para o gene 16S, isoladas de arroz branco (AB), arroz Ultra Rice® (UR) e arroz vitaminado (AV)

Além da similaridade nas sequências genéticas com *B. cereus* ADI-10, os isolados de *B. cereus* das amostras de arroz apresentaram características genéticas similares (99%) com mais estirpes deste micro-organismo, quando comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados de NCBI. Na Tabela 8, observam-se três tipos de *B. cereus* isolados de diferentes ambientes, que apresentaram similaridade nas sequências genéticas com os isolados de amostras de arroz.

Tabela 8 – Estirpes de *Bacillus cereus* que têm similaridade com as sequências genéticas dos isolados de amostras de arroz.

Amostra	Estirpe comparada	Identificação GenBank	Similaridade (%)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> NRKT	LC049615.1	99
isolados de	<i>Bacillus cereus</i> JMG-03	KR078256.1	99
amostras de Arroz	<i>Bacillus cereus</i> JN157	KF687078.1	99

5.4. Contaminação dos diferentes tipos de arroz com *Bacillus cereus*

Nesta pesquisa, foi encontrada uma prevalência de *B. cereus* de 29%, ou seja, 24 amostras, contendo isolados do micro-organismo, em 90 analisadas (Figura 8). A prevalência do *B. cereus* em arroz é variável, segundo as pesquisas encontradas na literatura.

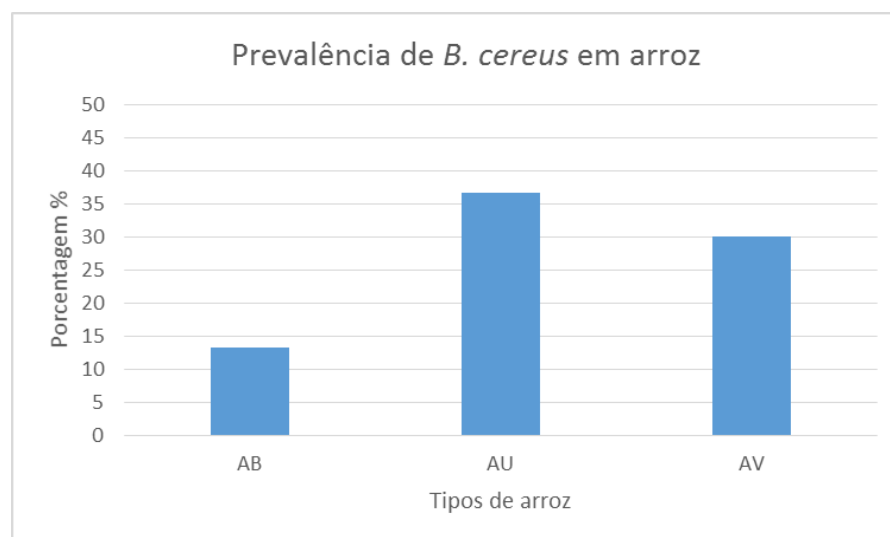


Figura 8 - Distribuição percentual de amostras de arroz contendo isolados de *Bacillus cereus* de cada tipo de arroz. (AB= arroz branco; AU= arroz Ultra Rice® e AV= arroz vitaminado)

Pode-se encontrar resultados em que a presença do micro-organismo foi de 100% das amostras (FANGIO et al., 2010), que difere dos nossos resultados. Levantamentos como o feito por Park et al. (2009) que pesquisaram a ocorrência do *B. cereus* em amostras de arroz cru, coletadas na República de

Coreia, onde encontrou-se que a prevalência deste micro-organismo era de 37%.

Diversas pesquisas no mundo, indicaram *B. cereus* como o micro-organismo de maior prevalência no arroz, desde o cultivo, até o produto processado. Geralmente, o micro-organismo contamina o arroz desde o cultivo, devido a sua presença em todos os ambientes. Embora a Aw seja muito baixa no arroz cru, espécies de *Bacillus* na forma esporulada podem sobreviver por longos períodos e resistir a processos térmicos, como extrusão e cocção, o que determina a presença do micro-organismo tanto no arroz cru como no arroz cozido.

As contagens de *B. cereus* nas amostras indicativas dos diferentes tipos de arroz cru (Tabela 9) atenderam à legislação brasileira (Resolução nº 12 da ANVISA de 2001) que determina um máximo de $3,0 \times 10^3$ UFC/g (3,4 log UFC/g) para considerar esse alimento em condições próprias para consumo, em relação a esse patógeno.

Tabela 9 – Numero de amostras de arroz cru analisadas, número de amostras contendo isolados de *B. cereus*, valores médios da contagem de *B. cereus* (log UFC/g) e desvio padrão em arroz branco (AB), arroz Ultra Rice® (AU) e arroz vitaminado (AV)

Amostra	Número de amostras analisadas	Prevalência de <i>B. cereus</i> nas amostras	Contagem de <i>B. cereus</i> Log UFC/g
AB	30	4	2,58 ± 0,51 ^a
AU	30	11	2,78 ± 0,31 ^a
AV	30	9	2,59 ± 0,49 ^a

*Medias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O arroz Ultra Rice® apresentou o maior número de amostras contendo isolados de *B. cereus*, seguido do arroz vitaminado e do arroz branco. Esta bactéria tem uma necessidade de três L-aminoácidos (treonina, leucina e valina), como fatores de crescimento, mas não precisa de vitaminas (BHUNIA, 2007; JÄÄSKELÄINEN, 2008). No arroz Ultra Rice®, a maior contaminação

com *B. cereus*, pode ser explicada em razão do processo de moagem e extrusão, momento em que o arroz pode entrar em contato com o equipamento contaminado, previamente com *B. cereus*, proveniente da microbiota ambiental, como ar, água e solo.

Como tem sido evidenciado por Jullien et al. (2002), os esporos desta bactéria no contato com superfícies dos equipamentos podem-se aderir e formar biofilmes. Na indústria de alimentos, verificou-se que este micro-organismo pode aderir a superfícies, com afinidade para superfícies hidrofóbicas, incluindo a do aço inoxidável que favorece sua permanência no ambiente de processamento.

Os esporos de *B. cereus* são muito resistentes às condições adversas como, mudanças da temperatura, desidratação, radiação e desinfetantes, além de serem hidrofóbicos, característica que permite sua adesão a superfícies, causando problemas (KLAVENES, 2002). Assim, quando o arroz passar pelos equipamentos, os esporos aderidos podem contaminá-lo, elevando as contagens quando comparadas àqueles que não foram submetidos ao processo de moagem ou extrusão.

Embora o arroz Ultra Rice® tenha a adição de nutrientes, nas pesquisas realizadas por Lee et al.(2010), evidenciou-se que a vitamina B1, em adição com desinfetantes químicos pode ser usada para reduzir a quantidade de *B. cereus* em arroz. Segundo esses autores, a vitamina B1 pode também ser usada como um aditivo eficaz que reduz a quantidade de utilização de desinfetantes por meio de um efeito antimicrobiano sinérgico. Portanto, é a contaminação com superfícies dos equipamentos, durante o processamento do produto, que explica o aumento das contagens de *B. cereus* nas amostras do arroz Ultra Rice®, quando comparado ao arroz branco.

5.5. Teste desafio

As suspensões microbianas inicialmente adicionadas ao diferentes tipos de arroz continha esporos, conforme observa-se na fotomicrografia da Figura 9. A adição inicial, foi de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ esporos por grama de arroz.



Figura 9 - Esporos (círculos vermelhos) de *Bacillus cereus* observados em microscópio ótico pela coloração de Gram.

Nas Figuras 10,11,12 e 13, observa-se a multiplicação de *B. cereus* do Arroz Branco e do Arroz Vitaminado, após cocção em condições domésticas, em função da temperatura e do tempo de armazenamento. Quando armazenado, a 10 °C, a multiplicação de *B. cereus* nos diferentes tipos de arroz mostrou um comportamento linear, entre 24 h e 120 h. No armazenamento a 25 °C, a contagem máxima foi atingida com 96 h e manteve-se a mesma após 120 h. Foi evidenciada a influência da temperatura na multiplicação de *B. cereus* nos dois tipos de arroz. A 25 °C, a população bacteriana atingiu 10^9 UFC/g após 24 h, e a 10 °C, esse número ocorreu com 72 h de armazenamento.

A população máxima de *B. cereus* quando os diferentes tipos de arroz foram armazenados a 10 °C atingiu 4,8 log UFC/g, para o arroz vitaminado. A 25 °C, esse valor foi de 8,4 log UFC/g. Na temperatura mais elevada, o número do micro-organismo foi maior 3,6 ciclos log. Isso indica a importância da refrigeração na multiplicação do *B. cereus*.

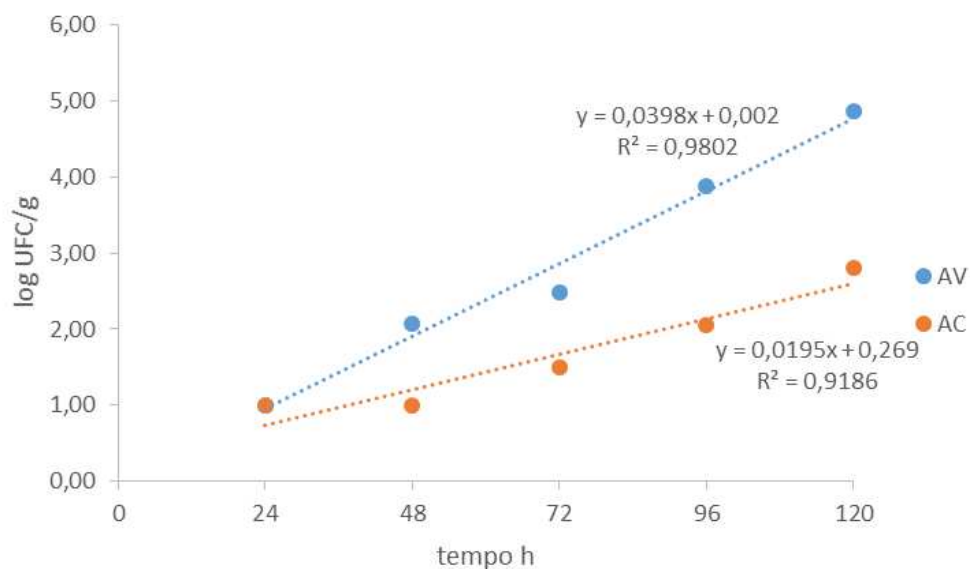


Figura 10 – Curva de multiplicação de *Bacillus cereus* em arroz cozido vitaminado (AV) e arroz controle (cozido, sem esporo) estocados a temperatura de 10 °C. Média de três repetições.

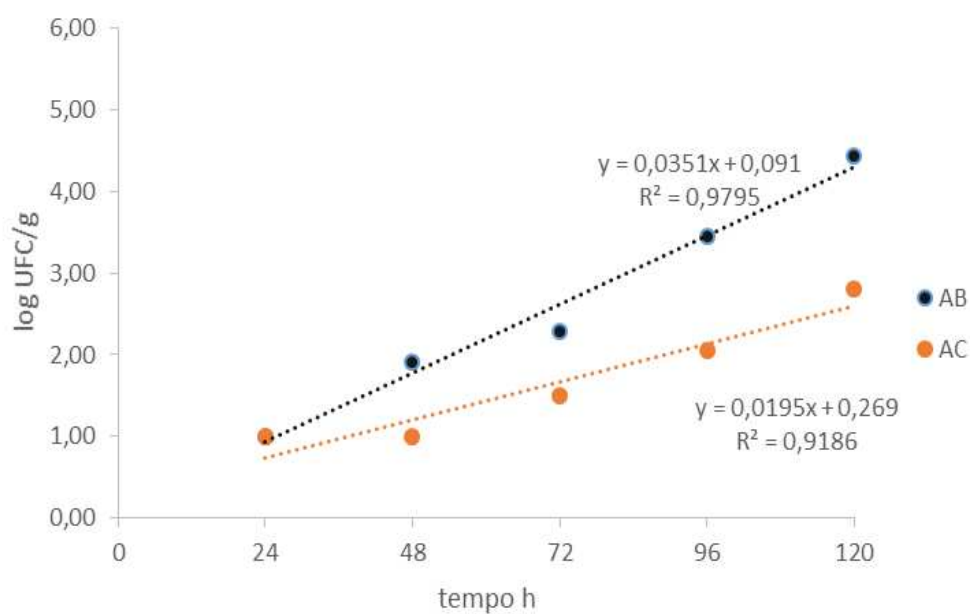


Figura 11 – Curva de multiplicação de *Bacillus cereus* em arroz cozido branco (AB) e arroz controle (cozido, sem esporo) estocados a temperatura de 10 °C. Média de três repetições.

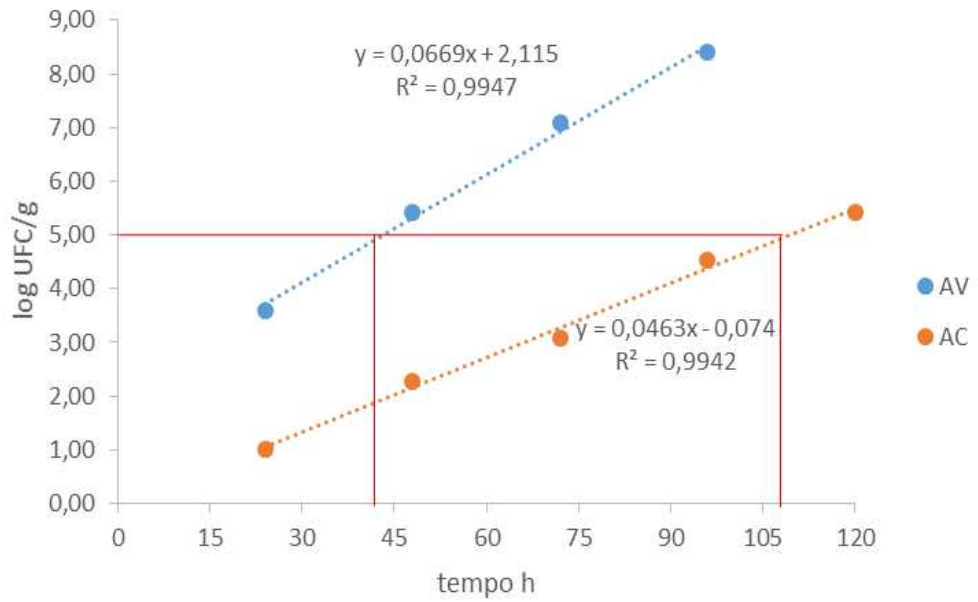


Figura 12 – Curva de multiplicação de *Bacillus cereus* em arroz cozido vitaminado (AV) e arroz controle (cozido, sem esporo) estocados a temperatura de 25 °C. Média de três repetições.

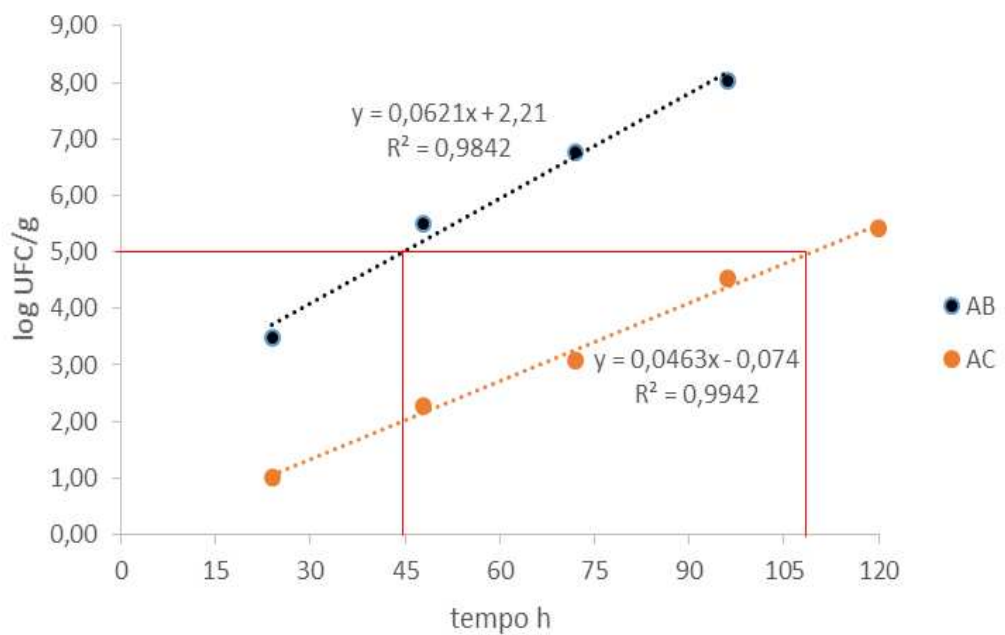


Figura 13 – Curva de multiplicação de *Bacillus cereus* em arroz cozido branco (AB) e arroz controle (cozido, sem esporo) estocados a temperatura de 25 °C. Média de três repetições.

Os resultados obtidos para o arroz branco controle sem adição de esporos confirmam que os números das contagens para os demais tipos de arroz foi devido à adição de esporos de *B. cereus*. Por exemplo, a 10 °C, a contagem máxima de esporos foi de 2,8 log UFC/g para o arroz controle e 4,8 log UFC/g para o arroz vitaminado adicionado dos esporos, um aumento de 2 ciclos log. A 25 °C, esses valores atingiram 5,4 log UFC/g e 8,4 log UFC g, respectivamente, o que corresponde um aumento de 3 ciclos log. Resultados similares também foram encontrados nas pesquisas desenvolvidas por Finlay (2002) que inocularam esporos de *B. cereus* em arroz e avaliaram o crescimento do micro-organismo em uma faixa de temperatura de 15 °C a 30 °C, obtendo contagem de até 8,3 log UFC/g.

Deve-se ressaltar que contagens de *B. cereus* no arroz branco controle era esperada, uma vez nas análises iniciais foram determinadas números de esporos de *B. cereus* em torno de 2 log de UFC/g. Inclusive, essa informação confirma a relevância do número inicial de contaminantes na produção de alimentos seguros microbiologicamente para a população.

Na Tabela 10, verifica-se a estimativa do tempo para produção de toxinas nas condições experimentais pelo *B. cereus*, a 25 °C, considerando que contagens de $1,0 \times 10^5$ do micro-organismo são consideradas como perigosas de causar as síndromes emética ou diarreica. Para o arroz vitaminado e o arroz branco adicionados de esporos, há perigo da produção de toxinas após 43,1 h e 44,9 h, respectivamente. Esse tempo é muito inferior do o arroz controle em que a formação de toxina ocorreria a partir de 106,3 h. Em relação à temperatura de armazenamento de 10 °C, os resultados indicam que não ocorreria produção de toxinas até 120 h de estocagem.

Tabela 10 - Estimativa do tempo para produção de toxina.

Estimativa do tempo (h) para produção de toxinas diarreica e emética por <i>Bacillus cereus</i>	
Amostra	Tempo (h)
Arroz Branco	44,9
Arroz Vitaminado	43,1
Arroz Controle	106,3

*foi considerado que 10^5 UFC/g de *B. cereus* pode produzir a toxina.

Na Tabela 11, pode-se observar os parâmetros cinéticos, μ (máximo) e tempo de geração (TG) da multiplicação do *B. cereus* nas condições experimentais. Quanto ao tempo de armazenamento, verifica-se que os valores de μ para o arroz branco e para o arroz vitaminado adicionados de esporos de *B. cereus* não diferiram ($p < 0,05$) entre si. Por outro lado, houve diferença ($p > 0,05$) entre esses tipos de arroz e o controle - o arroz branco não adicionado de esporos.

Tabela 11 - Taxas de crescimento (μ máximo, expresso em h^{-1}) e tempo de geração (h) de *Bacillus cereus* em arroz vitaminado (AV), arroz branco (AB) e arroz controle (AC) após cocção e armazenados à temperatura de 10 e 25 °C

Parâmetro	Amostra	Temperatura	
		10 °C	25 °C
μ máximo (h^{-1})	AB	0,0351 \pm 0,003 B b	0,0621 \pm 0,002 C c
	AV	0,0397 \pm 0,004 B b	0,0669 \pm 0,001 C c
	AC	0,0195 \pm 0,004 A a	0,0463 \pm 0,001 B b
Tempo de geração (h)	AB	28,45 B b	16,10 C c
	AV	25,17 B b	14,93 C c
	AC	62,11 A a	22,47 B C

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha ou na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto à temperatura de armazenamento, constata-se que os valores μ para os tipos de arroz adicionados de esporos de *B. cereus* diferiram ($p < 0,05$) entre si, para as temperaturas de armazenamento de 10 °C e 25 °C sendo que os valores μ foram maiores para a maior temperatura. O mesmo se constatou para o controle, ou seja o arroz branco não adicionado de esporos bacterianos. Pelos resultados do experimento, conclui-se que a adição de arroz Ultra Rice® (contendo vitaminas e minerais) na proporção de 1:99 no arroz branco não favoreceu a multiplicação de *B. cereus*. Foi observado que enriquecimento do arroz com vitaminas e minerais não influenciou a multiplicação de *B. cereus*, fato que é evidenciado nos resultados das contagens e das taxas de crescimento, nas quais os dois tipos de arroz apresentam comportamentos similares. As temperaturas de estocagem foram o fator determinante na multiplicação de *B.*

cereus, observando diferenças de contagens e de taxas de crescimento no arroz a 10 °C e 25 °C

6. CONCLUSÕES

As análises de qualidade microbiologia, conforme Resolução nº12 de 2001, evidenciaram que as amostras de arroz vitaminado, arroz branco e arroz Ultra Rice® apresentaram contagens de *B. cereus* abaixo do limite exigido pela legislação brasileira ($<3,0 \times 10^3$ UFC/g).

Do total de 90 amostras, 24 delas (correspondendo a 29 %) apresentaram contaminação com isolados *B. cereus*, confirmados tanto pela técnica tradicional que envolve análises morfológicas e bioquímicas quanto pela técnica de PCR com identificação do gene 16S ribossomal. 11 amostras contendo isolados do micro-organismo foram encontradas no arroz Ultra Rice®, 9 no arroz vitaminado e 4 no arroz branco. Houve maior prevalência de *B. cereus* no arroz Ultra Rice® e vitaminado em comparação com o arroz branco, indicando que ocorre contaminação durante o processamento.

Comparando-se o arroz vitaminado e arroz branco, foi evidenciado nos testes com arroz cozido previamente contaminados com esporos de *B. cereus*, que os valores da taxa de crescimento (μ máximo) não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) à mesma temperatura (10 °C ou 25 °C), em função dos tempos de armazenamento entre 24 e 120 h. No entanto, os parâmetros cinéticos foram diferentes para as diferentes temperaturas de armazenamento.

O fator preponderante para a multiplicação do micro-organismo foi a temperatura de armazenamento. Estimativas baseadas nos parâmetros cinéticos indicam a possibilidade de produção de toxinas no arroz vitaminado, arroz branco, ambos adicionados de esporos e no arroz branco (controle, sem adição de esporos) após 43,1h, 44,9 h e 106,3 h, respectivamente quando armazenados a 25 °C.

Os resultados experimentais permitem concluir que a adição de arroz Ultra Rice® (contendo vitaminas e minerais) na proporção de 1:99 no Arroz Branco não favoreceu a multiplicação de *B. cereus*.

REFERÊNCIAS

- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129 p. 17-20, 1994.
- ANDRADE, N. J.; SERRRANO, A. M. Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. **Revista de Microbiologia/SBM**, São Paulo, v. 24, p. 26-31, 1993.
- ANKOLEKAR C, RAHMATI T, LABBÉ R.G. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 460–466, 2009.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 2005.
- ARAGON-ALEGRO, L.C; PALCICH, C; LOPES, G.V; RIBEIRO, V.B; LANDGRAF, M; DESTRO, M.T. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. **Journal of Food Protection**. v, 71, n10, p. 2115-2118, 2008.
- ARNESEN, L.P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 579–606. 2008.
- AUGER, S., GALLERON, N., BIDNENKO, E., EHRLICH, S. D., LAPIDUS, A., &SOROKIN, A. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of termophilic strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1276-1280, 2008.
- ASHONG J, MUTHAYYA S, DE-REGIL LM, LAILLOU A, GUYONDET C, MOENCH PFANNER R, BURFORD BJ, PEÑA-ROSAS JP. Fortification of rice with vitamins and minerals for addressing micronutrient malnutrition. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 6. Art. No.: CD009902. DOI: 10.1002/14651858.CD009902. 2012.
- AZEREDO, R. M. C de. **Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus***. 1998. 158p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.1998.
- BEINNERMA, VELASQUEZ-MELENDZ G, PESSOA MC, GREINER T. Iron fortified rice is as efficacious as supplemental iron drops in infants and young children. **Journal Nutrition**, v. 140, p. 49–53, 2009.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In BHUNIA, A.K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. West Lafayette, Springer, 2008.

BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens - mechanisms and pathogenesis. **West Lafayette: Springer**. 2007

BLACKBURN, C.; Mc CLURE, P. Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control. England: Cambridge; 513 p. 2000

BRASIL, Ministério da Saúde. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BRASIL, Portaria SVS/MS no 326, de 30/07/1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Brasília, 1997.

BYRNE, B.; DUNNE, G.; BOLTON, D. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. **Food Microbiology**, v. 23, p. 803–808, 2006

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods CAC/GL 21 -1997.

EHLING-SCHULZ, m.; GUINEBRETIÈRE, M. H.; MONTHÁN, A.; BERGE, o.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 232–240, 2006.

EHLING-SCHULZ, M.; VUKOV, N.; SCHULZ, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. Identification and partial characterization of the non ribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 105–113, 2005.

EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. & SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **FEMS microbiology letters**. 2004.

EMBRAPA. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil. Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz**, 2006. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrriadBrasil/Cap01.htm>> Acesso em: 01 setembro 2014.

EMBRAPA. **Qualidade Microbiológica do Arroz Comercializado em Goiânia, Goiás**. 2010

FANGIO M, ROURA S, FRITZ R. Isolation and Identification of *Bacillus* spp. and Related Genera from different Starchy Foods. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 218-221, 2010.

FAO. El arroz en el mundo. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/es/p3.htm>> Acesso em 20 de agosto de 2014.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco B. D. G. M.; **Microbiologia dos alimentos: Atheneu**. Cap. 4, p. 41-43. 2006.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, p. 1245-1248, 2004.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. Produção Agrícola Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <[http://ftp.ibge.gov.br/Producao_agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/Ispta_201403comentarios.pdf](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/Ispta_201403comentarios.pdf)> Acesso em: 12 fevereiro 2015.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD- ICMSF. *Bacillus cereus*. In. **Micro-organismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Acribia, Chap. 2, p. 25-42. 1996.

IRRI. Trends in global rice consumption. Disponível em: <<http://irri.org/rice-today/trends-in-global-rice-consumption>> Acesso em: 01 setembro 2014.

JÄÄSKELÄINEN, E. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. **Department of Applied Chemistry and Microbiology - Division Microbiology. Helsinki, University of Helsinki**: 74, 2008.

JULLIEN C, BENEZECH T, CARPERTIER B, LEBRET V, FAILLE C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77-78, 2002.

KLAVENES A, STALHEIM T, SJOVOLD O, JOSEFSEN K, GRAMUN P. Attachment of *Bacillus cereus* spores with and without appendages to stainless steel surfaces. **Food and Bioproducts Processing**, v. 80, p. 312-318, 2002.

LAKE B, HUDSON A, CRESSEY P. RISK PROFILE: *Bacillus* spp in rice. Christchurch. Mols M, Pier I, Zwietering M, Abee T. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 303-11, 2009

LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRUO, B. M., KAPLAN, T., WIEONER-GUNKEL, E., et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p.1373-1382, 1998.

LEE H, CHAI L, TANG S, JINAP S, MOHAMMAD F, NAKAGUCHI Y, et al. Application of MNP-PCR in biosafety of *Bacillus cereus* s. l. for ready to-eat. **Food control**; v. 20, p. 1068-1071, 2009

LEE M, HA J, HA S. Synergistic effect of vitamin B1 on sanitizer and disinfectant treatments for reduction of *Bacillus cereus* in rice. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 1-11, 2010.

LUND T., DE BUYSER M.L., GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, p.254–261, 2000.

MARTINEZ J, SANCHEZ G, GARAY E, AZNAR R. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 697-709, 2011

MAURER, J., "PCR Methods in Foods", Springer, USA, p 42-48, 2006.

MOHAN N., NAVEENA; L. Isolation and Determination of Efficacy of Acephate Degrading Bacteria from Agricultural Soil. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 9, p. 10-20, 2015

MENDES, R.; AZEREDO, R.; COELHO, A.; OLIVEIRA, S. COELHO, M. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 17, p. 255-261, 2004

MUNIZ, J. A. & ABREU, A. R. **Técnicas de amostragem**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 102, 1999.

OLSEN, J., "Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens", **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p 1-78, 2005.

PARK Y, KIM J, SHIN S, KIM J, CHO S, LEE B, et al. Prevalence, Genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. **Journal of food protection**, v. 72, p. 456-684, 2009.

PRESCOTT, HARLEY, & KLEIN'S. **Microbiology** (7^a ed.). Nova Iorque: McGraw Hill. 2008.

RAJKOWSKI, K.T; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M.D; BIER, J.W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Nova York: Marcel Dekker, 2003.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; ØKSTAD, O. A.; FOUTS, D. E.; JIANG, L.; CER, R. Z.; KOLSTØ, A. B.; GILL, S. R.; RAVEL, J. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 52–64, 2007.

RAY, Bibek, “**Fundamental Food Microbiology**”, Third Edition, CRC Press, Florida, p 359-381, 2004.

SALUSTIANO, V.C; ANDRADE, N.J; SOARES, N.F.F; LIMA, JC; BERNARDE P.C; LUIZ, L.M.P; FERNANDES P.E; Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, p. 439-442, 2009.

SILVA, R. F; LOBO, V. L. D. S., de FILIPPIZ, M. C. C., & PRABHU, A. S. **114. Quantificação da carga microbiana em diferentes tipos de arroz comercial**. EMBRAPA, 2009.

SHINAGAWA, K.; UENO, Y.; HU, D.; UEDA, S.; SUGII, S. Mouse lethal activity of a HEP-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 1027–1029, 1996.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Agricultural Research Service. **National Nutrient Database for Standard Reference USDA**. Disponível em:<<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6569?qllookup=20445&max=25&man=&facet=&new=1>>. Acesso: 01 setembro 2014.

VAN DER Z, PARLEVLIEET G, SAVELKOUL P, STOOF J, KAISER A, VAN FURTH M, et al. Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. **Journal of Clinical microbiology**, v. 38, p. 4131-6, 2000.

VILAS-BÔAS, G. T., PERUCA, A. P. S., &ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 673-687, 2007.