

PESQUISA DE *Bacillus cereus* EM PRODUTOS FARINÁCEOS E A BASE DE SOJA

W. F. MARTINS¹, G. NICOLETTI¹, C. SILVEIRA¹, F.S.N. MELO², M.S.A. RODRIGUES³,
D.S. SEVERO³, COSTA, W. M³ e A. dos S. ARAUJO³

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia

³ Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar E-mail para contato: wiaslanmartins@gmail.com

RESUMO – A presença de *Bacillus cereus* em alimentos é relativamente frequente. Certas cepas são importantes por provocarem toxifecções alimentares. São encontradas, principalmente, em cereais e produtos amiláceos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação por *B. cereus* em produtos farináceos e a base de soja. Na análise de *B. cereus* utilizou-se o meio de cultura ágar MYP (*Mannitol yolk polymixin Agar*), as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. As colônias presuntivas de *B. cereus* foram isoladas e, realizados os testes de coloração de gram, catalase, motilidade, liquefação da gelatina, crescimento rizoide e hidrólise do amido. A contaminação por *B. cereus* atingiu valor máximo de $3,95 \times 10^4$ UFC/g⁻¹ nos produtos farináceos e de $7,99 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ nos produtos a base de soja. As elevadas contagens indicam falhas nos processos de fabricação e riscos a saúde de quem os consome. Todos os produtos encontram-se fora dos padrões microbiológicos permitidos pela legislação vigente.

1. INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é um microrganismo gram positivo amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. A presença da bactéria ou de seus esporos em alimentos é relativamente frequente (Soares *et al.*, 2008). Este gênero possui células em bastonetes, móveis ou não, incluindo espécies aeróbias e facultativas. Produzem esporos, sendo, por isso, importantes nos casos de alimentos que sofreram tratamentos térmicos (esterilização ou pasteurização) ou aquecimentos (cocção, fritura), isto porque os esporos são resistentes a temperaturas elevadas, podendo sobreviver a certos tipos de aquecimento. Posteriormente podem germinar (dependendo das condições) e se multiplicar, provocando deteriorações ou doenças de origem alimentar.

Certas cepas de *B.cereus* são importantes por provocarem toxifecções alimentares. São encontradas, principalmente, em cereais e produtos amiláceos. Outras podem causar toxinose, sendo encontradas principalmente no arroz (Gava *et al.*, 2008).

Dentre as formas esporuladas, *Bacillus cereus* destaca-se na indústria alimentícia como agente causador de toxinfecção alimentar, além de provocar grandes prejuízos econômicos por ser um potencial deteriorante de alimentos (Cosentino *et al.*, 1997).

Os fatores que contribuem para a presença deste microrganismo estão relacionados à higiene inadequada dos manipuladores e manutenção do alimento à temperatura ambiente por longo intervalo de tempo. Sendo assim, são importantes as características e propriedades do alimento seguro, a importância dos manipuladores de alimento e as necessidades de utilização de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, é destacada a importância da alimentação como necessidade humana, as exigências por qualidade alimentar e as regras de higiene propostas pela ANVISA.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação por *B. cereus* em diferentes produtos farináceos e a base de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do centro Vocacional Tecnológico (CVT-Pombal/PB). Os produtos farináceos e a base de soja foram obtidos no comércio de Pombal-PB. Os produtos farináceos foram identificados como as amostras de 1 a 4 e os produtos a base de soja como as amostras de 5 a 10. As amostras de farinha continham os seguintes cereais: trigo, milho e arroz (amostra 1), trigo, aveia, arroz, cevada e milho (amostra 2), trigo, cevada e aveia (amostra 3) e trigo, arroz, aveia, cevada e milho (amostra 4). Os produtos a base de soja foram: grãos de soja (amostra 5), farinha de soja (amostra 6), farofa de soja (amostra 7), extrato de soja (amostra 8), proteína texturizada de soja (amostra 9) e bebida de soja (amostra 10)

Para a realização da análise de *B. cereus*, as amostras (25 g/amostra) foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizadas em mesa agitadora orbital marca NOVA ÉTICA® em 200rpm durante 25 min. Alíquotas de diluições sucessivas das amostras (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MYP (*Mannitol yolk polymixin Agar*) e incubadas a 30°C por 24 h, em duplicata.

Cinquenta a duzentos e cinquenta colônias presuntivas de *B. cereus* não fermentadoras de manitol e produtoras de lecitinase (Figura 1) foram isoladas e estocadas em tubo inclinado contendo ágar nutriente (*Nutrient Agar*) a 35°C. A partir do tubo inclinado foram realizados os testes de catalase, motilidade, liquefação da gelatina, hidrólise do amido e crescimento rizóide.



Figura 1 - Colônias de *Bacillus cereus* em placas de Petri contendo ágar MYP (*Mannitol yolk polymixin Agar*)

No teste de catalase foi adicionado gotas de peróxido de hidrogênio a 3% nas cepas e verificou-se a produção ou não de bolhas. No teste de motilidade, as cepas foram inoculadas com alça de platina em tubos contendo ágar motilidade (*Agar Motility Medium*) e incubadas a 35° C por 18 a 24 h. Após a incubação, verificou-se o tipo de crescimento. No teste de liquefação da gelatina utilizou-se Ágar Gelatina em tubos de ensaio esterilizados e em seguida as cepas foram inoculadas com auxílio de uma alça platina e incubadas a 35°C por 24 h. Após a incubação os tubos foram colocados em geladeira durante 30 min, em seguida verificou-se se o meio permanece sólido ou não. Para o teste de hidrólise do amido utilizou-se o meio de cultura Agar Amido que foi adicionado em placa estéril com e após solidificar, inoculou-se em forma de estria as colônias do tubo inclinado, incubou-se de 30 a 35°C durante 24 h. Em seguida foi adicionado na placa cerca de 3 a 4 mL de solução de lugol. Após alguns segundos observou-se o escurecimento do meio, e a presença ou ausência de uma zona clara ao redor da colônia. No teste de crescimento rizóide utilizou-se o meio de cultura ágar nutriente (*Nutrient Agar*) foi adicionado em placa estéril com e após solidificar, inoculou-se a cepa no centro da placa e incubou-se a 35°C por 48 a 72 h. Após incubação verificou-se o tipo de crescimento. Os procedimentos analíticos microbiológicos foram realizados de acordo as diretrizes e metodologias recomendadas pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação indicativa de *B. cereus* nas farinhas atingiu valor máximo de $3,95 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ (Amostra 2) e nos produtos a base de soja valor máximo de $7,99 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ (Amostra 10) (Figura 2). Foram considerados positivos os isolados que apresentaram colônias rugosas, secas, com coloração rosada, rodeada por halo de precipitação branco e dentro dos testes, foi móvel, crescimento rizóide negativo, Gram-positiva, catalase positiva (Figura 3), hidrólise do amido positiva (Figura 4), liquefação de gelatina positiva e produziram lecitinase. As outras amostras que tiveram crescimento de espécies do gênero *Bacillus* que não se enquadraram nestas características foram consideradas negativas (amostra 1), a mesma apresentou hidrólise do amido negativa.

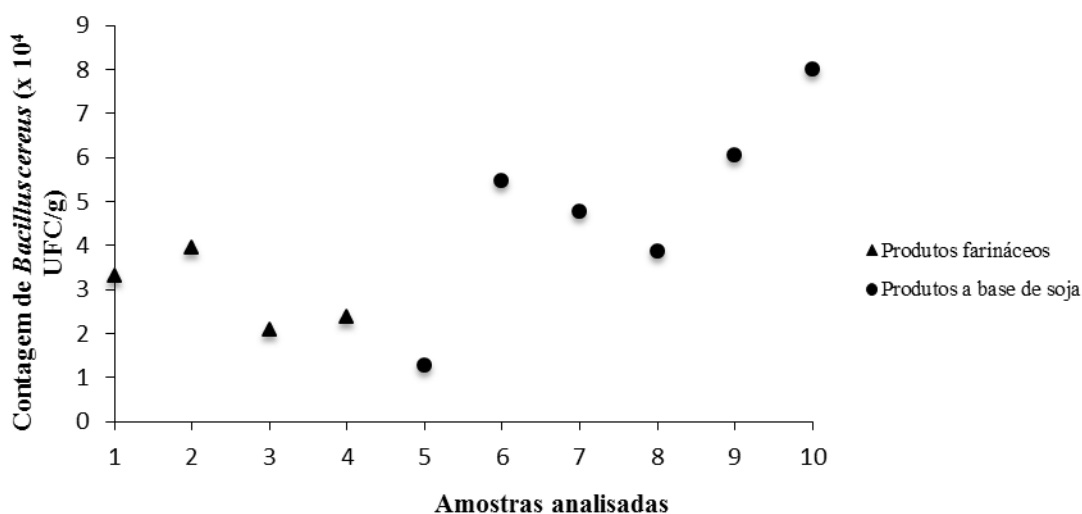


Figura 2- Contagens de *Bacillus cereus* em unidades formadoras de colônias por grama

(UFC/g) das amostras de farinha de multicereais (amostras de 1 a 4) e produtos a base de soja (amostras de 5 a 10)



Figura 3 - Teste de catalase nas colônias de *B. cereus* realizado com adição de gotas de peróxido de hidrogênio a 3% nas cepas



Figura 4 - Colônias de *B. cereus* em Agar Amido e adicionadas de lugol (teste de hidrólise do amido positivo)

No entanto todas as amostras apresentaram contaminação na ordem de 10^4 UFC.g⁻¹ como mostra a Figura 2, o que indica falhas no processo de fabricação dos produtos, principalmente do ambiente de processamento, visto que o *B. cereus* encontra-se no ambiente em geral.

Silva *et al.* (2007) avaliaram a composição microbiológica de farinha de algaroba e valores de *B. cereus* foram inferiores (<10 UFC.g⁻¹) aos limites estabelecidos pela Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 confirmando que o processo utilizado para produção da farinha é satisfatório do ponto de vista da segurança microbiológica. Zanatta *et al.* (2010) avaliaram a presença de *B.cereus* em farinhas de beterraba, cenoura e espinafre, encontrando valores abaixo do permitido pela legislação acima citada ($< 1,0 \times 10^3$ UFC/g) para todas as farinhas, indicando boas condições higiênicas-sanitárias da matéria-prima e da manipulação das amostras desidratadas. Chisté *et al.* (2007) identificaram os contaminantes microbiológicos em farinha de mandioca durante as etapas do processamento e o *B. cereus* não foi encontrado nas etapas de lavagem, trituração e prensa, mas, encontrado valor de $< 1,0 \times 10^1$ UFC/g na farinha de mandioca, dentro do limite permitido pela legislação já citada. Não há trabalhos na literatura sobre pesquisa de *B. cereus* em produtos a base de soja.

O *B.cereus* é largamente distribuído na natureza, sendo o solo o seu reservatório natural. Por esta razão, contamina facilmente alimentos como: vegetais, cereais, etc. (Franco, 1996). A contaminação de alimentos por *B.cereus* constitui não somente uma importante causa de

deterioração, mas também está associada à ocorrência de dois tipos de síndrome, devidos à ingestão de alimentos contaminados com cepas patogênicas produtoras de toxinas, uma emética e outra diarreica (Agata *et al.*, 2002; Mcelroy *et al.*, 2000; Tsen *et al.*, 2000). A toxina do tipo diarreico é, muito possivelmente, produzida no trato intestinal, sendo os fatores de virulência ainda não completamente caracterizados (Ghelardi *et al.*, 2002; Granum, 1994; Minnaard *et al.*, 2001).

No presente estudo, a presença de *B. cereus* nas amostras de farinhas de multicereais e nos produtos a base de soja encontra-se fora dos padrões permitidos pela legislação (Resolução RDC nº 12 de 02.01.01 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), que é de 5×10^2 UFC.g⁻¹ (Brasil, 2001).

4. CONCLUSÕES

O *B. cereus* foi encontrado nos produtos farináceos (amostras 2, 3 e 4) e nos produtos base de soja (amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10) confirmada através das análises bioquímicas realizadas. Considerando que a bactéria exige grande capacidade de sobrevivência e se multiplica em ampla faixa de temperatura, a transferência de um pequeno número de células pode dar origem a populações causadoras de doenças de origem alimentar, desde que o alimento fique estocado por períodos que assim o permitam.

As elevadas contagens indicam falhas nos processos de fabricação e riscos a saúde de quem os consomem. Todos os produtos encontram-se fora dos padrões microbiológicos permitidos pela legislação vigente.

5. REFERÊNCIAS

AGATA, N.; OHTA, M; YOKOYAMA K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.*, n. 73, p. 23-27, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18/09/2003.

CHISTÉ, R.C.; Kelly de Oliveira COHEN, K.O.; Erla de Assunção MATHIAS, E.A.; RAMOA JÚNIOR, A.G.A. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, 27(2): 265-269, abr.-jun. 2007.

COSENTINO, S.; MULARGIA, A.F.; PISANO, B. et al. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, v.38, p.235-238, 1997.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. 1996. 215p. São Paulo: Editora Atheneu

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. *Tecnologia de alimentos: Princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 2008.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVATTI, C.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*. v. 208. n. 1. p. 129-134, 2002.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. bacterial.*, v. 76. p. 61-66. 1994.

SOARES, C. M.; VALADARES, G. F.; AZEREDO, R. M. C.; KUAYE, A. Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.2, p.504-510, mar-abr, 2008.

MCELROY, D. M.; JAYKUS, L. A.; FOEGEDING, P. M. Validation and Analysis of Modeled Predictions of Growth of *Bacillus cereus* Spores in Boiled Rice. *J. Food. Protec.*, v. 2, n. 63, p. 268-272, 2000.

MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P.F. Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Food. Protec.*, v. 10. N. 64 p. 1535-1541, 2001.

SILVA, C.G.M.; MELO FILHO, A.B.; PIRES, E.F; STAMFORD, T.L.M. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). *Ciência e Tecnologia Alimentar.*, Campinas, 27(4): 733-736, out.-dez. 2007.

TSEN, H. Y.; CHEN, M. L.; HSIEH, Y. M.; SHEU, S. J.; CHEN, Y. L. *Bacillus cereus* Group Strains, their Hemolysin BL Activity, and their Detection in Foods Using a 16s RNA and Hemolysin BL Gene-Targeted Multiplex Polymerase Chain Reaction System. *J. Food Protec.*, v. 11, n. 63, p. 1496-1502, 2000.

ZANATTA, C. L.; SCHLABITZ, C.; ETHUR, E. M. Physico-chemical and microbiological evaluation of flour obtained from vegetable not conforming to marketing. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 459-468, jul./set. 2010.