



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

Fabiana O. Perini

Porto Alegre

2014/2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

Fabiana O. Perini

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para obtenção do título de
Engenheiro de alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César
Tondo

Coorientadora: Susana de Oliveira
Elias

Porto Alegre

2014/2

Avaliação da multiplicação de Bacillus thuringiensis no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

Fabiana O. Perini

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Eduardo Cesar Tondo
Dr. em Microbiologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Susana de Oliveira Elias
Me. Em Microbiologia Agrícola e Ambiente

Letícia Sopena Casarin
Dra. em Microbiologia Agrícola
e Ambiente
UFRGS

Patrícia Malheiro
Dra. em Microbiologia Agrícola
e Ambiente
UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão, apoio, enfim, por tudo. Sem vocês eu não teria consigo chegar até aqui.

Às minhas irmãs, pela paciência, carinho e por sempre acreditarem em mim.

Às minhas avós que, cada uma de seu jeito, sempre acreditaram e diziam que eu era capaz.

Às minhas colegas e amigas Ane e Lê, que compartilharam comigo os momentos vividos na faculdade, e que muitas vezes acreditavam mais em mim do que eu.

Agradeço a Letícia por ter me dado a primeira oportunidade de trabalhar com microbiologia e ter dividido comigo o seu conhecimento.

À Mana, pelo carinho e por ter me ajudado tanto na execução do meu experimento, não tenho nem palavras para agradecer. À Elis que também sempre esteve presente e disposta a me ajudar. Agradeço à Claudinha e ao Diego pela amizade, e por terem tornado as horas despendidas no laboratório muito agradáveis. À Vera e pela companhia e pela ajuda sempre que precisei.

À Su, por ter me coorientado e ter dividido seus conhecimentos comigo.

Enfim, todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Ao Professor Eduardo, minha gratidão, pelo seu voto de confiança, espero que tenha correspondido as suas expectativas.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1 LEITE	2
3.2 PRODUÇÃO E MERCADO DE LEITE.....	3
3.3 PROCESSAMENTO DE LEITE CRU.....	5
3.3.1 RECEPÇÃO DO LEITE CRU.....	6
3.3.2 RESFRIAMENTO.....	6
3.3.3 ARMAZENAMENTO.....	7
3.3.4 PRÉ-AQUECIMENTO.....	7
3.3.5 CENTRIFUGAÇÃO.....	7
3.3.6 HOMOGENEIZAÇÃO.....	7
3.3.7 PASTEURIZAÇÃO.....	7
3.3.8 TRATAMENTO UHT	8
3.3.9 ENVASE ASSÉPTICO.....	8
3.3.10 ESTOCAGEM	8
3.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO.....	9
3.5 <i>Bacillus</i> spp.	11
3.5.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3.6 MODELAGEM MATEMÁTICA E MICROBIOLOGIA PREDITIVA	14
4. ARTIGO CIENTÍFICO	17
4.1 INTRODUÇÃO.....	18
4.1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
4.1.2 <i>Bacillus</i> spp. E CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE.	19
4.2 OBJETIVO.....	20
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.3.1 OBTENÇÃO DOS DADOS DE MULTIPLICAÇÃO DA BACTÉRIA <i>Bacillus thuringiensis</i> ..	20
4.3.2 MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO de <i>B. thuringiensis</i> EM LEITE UHT	22
4.3.3 AVALIAÇÃO DO AJUSTE PREDITIVO DA MULTIPLICAÇÃO DE <i>B. thuringiensis</i> EM LEITE UHT.....	23
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO.....	29
6. BIBLIOGRAFIA	29
7. DISCUSSÃO GERAL.....	33
8. BIBLIOGRAFIA	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estados com maior volume de leite produzido no Brasil.....	4
Tabela 2: Análises físico-químicas de rotina na indústria de laticínios.	6
Tabela 3: Programas de Auto Controle que devem ser implementados em estabelecimentos beneficiadores de produtos de origem animal (DIPOA, 2009)	10

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Modelo básico para equação de Barany.....	22
Equação 2: Variação da concentração de substrato em função do tempo.	22
Equação 3: Taxa de crescimento μ	23
Equação 4: tempo de geração	23
Equação 5: Logaritmo da densidade máxima da população microbiana.	23
Equação 6. Equação para o cálculo do valor de R^2	24
Equação 7, Equação para cálculo do valor RMSE.	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva típica do comportamento de desenvolvimento microbiano (SWINNEN et al., 2004).....	16
Figura 2..Curva de multiplicação microbiana de <i>B. thuringiensis</i> em leite UHT a 26°C, ajustada aos dados do DMFit. A linha representa o modelo primário. Cada ponto representa a média entre a duplicata, repetido duas vezes.	25
Figura 3. Curvas do modelo experimental ajustado aos dados do DmFit, e do modelo pré-definido pelo ComBase, respectivamente.....	27

Resumo: *Bacillus spp.* são bactérias esporuladas, as quais têm a capacidade de resistir a tratamentos com temperaturas elevadas e frequentemente estão envolvidas em surtos alimentares. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria pertencente a esse grupo comumente utilizada no controle de pragas da agricultura, contudo já foi responsável por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). O presente trabalho teve por objetivo analisar a multiplicação de uma cepa de *B. thuringiensis* advinda de uma contaminação de leite UHT, utilizando modelagem matemática e microbiologia preditiva. A cepa de *B. thuringiensis* foi artificialmente inoculada em leite UHT e armazenada a 26°C. Pelo programa ComBase DMFit construiu-se uma curva de multiplicação que resultou em um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9901 e um erro quadrático médio (RMSE) de 0,1989. Os resultados demonstraram que a multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT alcançou uma concentração de 10^7 log UFC/mL em aproximadamente 15 horas. A fase lag desta multiplicação durou um período de 6 horas, o que significa que esta bactéria se desenvolve bem em leite UHT. O modelo obtido experimentalmente foi comparado com uma curva obtida pelo ComBase *predictor* para *Bacillus spp.*, e observou-se que os parâmetros cinéticos foram semelhantes. Isto significa que a cepa de *B. thuringiensis* analisada apresentou modelo de multiplicação similar ao gênero *Bacillus spp.* como referenciado em diversos estudos. Por fim, o modelo obtido experimentalmente foi compatível com os modelos preditos, podendo ser utilizado no estudo da multiplicação do *B. thuringiensis* em leite UHT.

Palavras-chave: *B. thuringiensis*, microbiologia preditiva, leite UHT, modelo matemático primário, ComBase.

1. INTRODUÇÃO

O leite longa vida está presente em 86% dos lares brasileiros e representa 76% do volume consumido. Assim esse produto supera as vendas dos segmentos dos leites pasteurizados e leite em pó, que muitas vezes têm sua demanda aumentada pela baixa disponibilidade de matéria-prima para beneficiamento (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA, 2014).

O leite é composto por lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas e enzimas (ORDÓÑEZ, 2005). Esta composição muito rica faz com este tipo de produto se torne vulnerável à contaminação por microrganismos. Visto isso, é necessária a implementação de procedimentos que assegurem a inocuidade e qualidade durante a cadeia de beneficiamento (Oliveira, 2008).

O gênero *Bacillus spp.* está frequentemente associado a surtos alimentares envolvendo lácteos, principalmente por sobreviverem a tratamentos a altas temperaturas. A falta de boas práticas agropecuárias durante a ordenha aumenta a carga microbiana do leite cru, o que pode tornar ineficiente o processo térmico ao qual o leite será submetido.

É neste contexto de segurança dos alimentos que se insere a modelagem matemática e a microbiologia preditiva, que podem ser utilizadas como ferramentas para gestão de riscos, auxiliando na otimização dos planos de segurança dos alimentos, avaliando processos e na vida de prateleira dos produtos. Além disso, a utilização deste tipo de ferramenta matemática permite desenvolver modelos para o comportamento dos microrganismos por meio de parâmetros cinéticos de multiplicação.

Uma cepa de *B. thuringiensis* foi isolada de uma amostra de leite UHT no Rio Grande do Sul, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. O *B. thuringiensis* é um microrganismo com atividade entomopatogênica, ou seja, possui atividade inseticida contra alguns insetos. O *B. thuringiensis* é muito semelhante genotipicamente e fenotipicamente ao *B. cereus*, sendo diferenciados apenas pela

produção cristais pelo *B. thuringiensis*. A análise por métodos moleculares demonstram que não há distinção entre estas cepas. Esta semelhança também está na presença de toxinas enterotoxigênicas, que podem causar surtos alimentares. Foi esta razão que motivou o estudo dos parâmetros cinéticos da multiplicação deste microrganismo e suas implicações, por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a curva de multiplicação de *Bacillus thuringiensis* extraído de uma amostra de leite UHT, por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO

-Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT;

- Construir o modelo primário de multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT.

- Avaliar o modelo de multiplicação obtido nesse estudo por meio dos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE);

-Comparar o modelo de multiplicação obtido nesse estudo a modelos gerados por programas ComBase Predictive;

-Avaliar o comportamento do *B. thuringiensis* durante o período de incubação e suas implicações para a indústria e para o consumidor.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

Segundo a Instrução Normativa IN 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), o leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênico-sanitárias, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite obtido da ordenha de animais sadios deve ser ordenhado em ambiente com práticas higiênicas e isento de colostro

O leite é constituído basicamente por água, carboidratos, gorduras, proteínas, vitaminas e minerais, sendo a água o componente presente em maior quantidade. Segundo Ordonez 2005, o leite é uma mistura homogênea de substâncias como proteínas, gorduras e carboidratos. Algumas destas substâncias encontram-se em emulsão, que é o caso da gordura e compostos associados. Outras se encontram em suspensão, caso das proteínas e minerais, e ainda algumas estão em forma de dissolução verdadeira, que é o caso das proteínas e vitaminas hidrossolúveis.

3.2 PRODUÇÃO E MERCADO DE LEITE

Segundo o censo Agropecuário do IBGE existem no Brasil aproximadamente 5,2 milhões de propriedades rurais, e que deste total, 25% se dedicam à produção de leite. As regiões que apresentam maior percentual das propriedades fornecedoras de leite são a Região Sul que apresenta 41% do número de estabelecimentos, seguida das regiões Centro-oeste com 39%, Sudeste com 33%, Norte 18% e região Nordeste com 16% (IBGE, 2014).

Os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná figuram entre os principais produtores de leite cru do país. Na Tabela 1 são apresentados os 10 principais produtores de leite do Brasil.

Tabela 1: Estados com maior volume de leite produzido no Brasil.

Unidades da federação com as maiores produções de leite.	
1 ^o	Minas Gerais
2 ^o	Rio Grande do Sul
3 ^o	Paraná
4 ^o	Goiás
5 ^o	Santa Catarina
6 ^o	São Paulo
7 ^o	Bahia
8 ^o	Mato Grosso
9 ^o	Rondônia
10 ^o	Pernambuco

Fonte: IBGE - Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal (2012).

O volume de leite produzido por esses 10 estados representa 86,6% da produção do país, o que corresponde a aproximadamente 28 bilhões de litros de leite (IBGE, 2012). O Brasil no ano de 2011 chegou a uma produção de 32 bilhões de litros de leite (MAIA, 2013) com uma previsão para o ano de 2014 de 37 bilhões (MILKPOINT, 2014).

Em meados dos anos 90 começou no Brasil um processo de desenvolvimento da produção leiteira que foi estimulado pela expansão da economia do país por meio da participação no mercado externo e também pelo aumento notável do poder de compra da população (JANK et al, 1999). Desde então o Brasil vem apresentando elevação no montante de produção, ainda que em taxas constantes, destacando o país no cenário internacional de mercado leiteiro. Segundo dados da FAO (2012) em 2010 o Brasil foi o quinto maior produtor de leite cru, sendo o volume de leite produzido igual a 31 bilhões de litros, enquanto Estados Unidos, Índia, China e Rússia foram os quatro primeiros colocados.

O potencial de expansão do mercado de pecuária de leite seria maior em países em desenvolvimento segundo Berlezi (2013), visto que em países já desenvolvidos a produção iria variar pouco já que a demanda do produto seria suprida pelo comércio local e que o mercado nesta classe de países já estaria saturado. No Brasil, a situação seria oposta a ocorrida em países desenvolvidos visto à possibilidade da população mudar de uma classe de menor poder aquisitivo para

uma de maior poder aquisitivo. Concomitantemente ao aumento do poder aquisitivo da população ocorre uma mudança nos hábitos alimentares. O aumento da renda per capita das classes C e D faz com que estas classes mudem seus hábitos alimentares, consumindo em maior quantidade produtos lácteos, o que reflete o crescimento da produção de leite no país. (SILVA, 2012; SCHIAVI, s.d.).

Segundo Berlezi (2013), o Brasil poderia vir a se tornar um país influente no mercado externo de lácteos já que a oferta de leite no país tende a crescer significativamente nos próximos anos; para tanto seria necessário que o foco do mercado de laticínios no país estivesse voltado para exportação (SPEROTTO, 2012). Para atingir o mercado externo e consolidar a atividade leiteira nacional no exterior seria necessário à implementação de políticas que prospectassem novos compradores para nossos produtos, pela inserção de práticas higiênicas e de qualidade que assegurem o padrão de qualidade exigido pelos mercados importadores (TRENNEPOHL, 2011). Visto isso, acredita-se que seja necessário que o mercado atual passe por mudanças na forma de gerir esse setor da indústria de alimentos a fim de atender ao mercado consumidor cada vez mais exigente.

3.3 PROCESSAMENTO DE LEITE CRU

Como mencionado anteriormente, durante a década de noventa, o Brasil passou por mudanças significativas no volume de produção de leite devido a mudanças salariais e a novos hábitos alimentares dos brasileiros. A partir deste momento viu-se a necessidade de alteração da gestão da cadeia de pecuária de leite, e que uma das mudanças a ser implementada seria a estocagem refrigerada de leite cru (BRASIL, 2002).

Atualmente o processamento do leite é constituído basicamente das etapas de recepção do leite cru, resfriamento, armazenamento, pré-aquecimento, centrifugação, homogeneização, pasteurização, tratamento UHT, envase asséptico e estocagem.

3.3.1 RECEPÇÃO DO LEITE CRU

Início do processo produtivo, no qual os caminhões isotérmicos chegam até a plataforma de recepção do laticínio para descarregar o produto. Nesta etapa são realizadas todas as análises físico-químicas apresentadas na Tabela 2 que são exigidas pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), somente após a aprovação da matéria-prima dá-se início ao procedimento de descarga do leite.

O leite cru deve ser recebido a uma temperatura de até 10°C, e o procedimento de descarregamento deve ser realizado com mangueiras coletoras de fácil higienização. Já os tanques para armazenamento devem ser de material inoxidável.

Tabela 2: Análises físico-químicas de rotina na indústria de laticínios.
CONTROLE DIÁRIO DE ANÁLISES NO RECEBIMENTO

Temperatura
Índice Crioscópico
Acidez Titulável
Densidade Relativa, a 15/15°C
Teor de Gordura
% de Sólidos Totais e de Sólidos não gordurosos
Teste do Álcool /Alizarol na concentração mínima de 72% v/v (setenta e dois por cento volume/volume)
Pesquisa de Fosfatase Alcalina (quando a matéria-prima for proveniente de Usina e ou Fábrica)
Pesquisa de Peroxidase (quando a matéria-prima for proveniente de Usina e ou Fábrica)
Pesquisa de Neutralizantes da Acidez e de Reconstituintes da Densidade

3.3.2 RESFRIAMENTO

O leite pode chegar à plataforma com uma temperatura de até 10°C, contudo deve ser armazenado em uma temperatura de no máximo 7°C (BRASIL, 2002). Por essa razão, logo após a aprovação das análises físico-químicas o leite deve passar por um processo de resfriamento, para que a sua temperatura fique em um valor menor ou igual a 7°C. Esta temperatura deve ser mantida para que não haja a

multiplicação exagerada de bactérias que possam acidificar a matéria-prima.

3.3.3 ARMAZENAMENTO

O leite cru é refrigerado em silos de aço inoxidável 304 ou 316, podendo ser estocado por um período de até 48 horas a temperaturas de no máximo 7°C, para que não haja multiplicação de microrganismos ou formação de toxinas.

3.3.4 PRÉ-AQUECIMENTO

O leite deve ser aquecido a uma temperatura de aproximadamente 32°C a fim de aumentar a eficiência do processo de centrifugação.

3.3.5 CENTRIFUGAÇÃO

Esta etapa é realizada para promover a remoção de sólidos indesejáveis, a diminuição da contagem de microrganismo e de células somáticas pela bactofugação e padronização do leite (GEA, 2014).

3.3.6 HOMOGENEIZAÇÃO

A homogeneização do leite ocorre na saída da centrífuga, quando este é submetido a altas pressões e velocidades. A pressão a qual o leite é submetido deixa os glóbulos de gordura menores, diminuindo a tendência à aglomeração desses glóbulos durante o armazenamento do produto.

3.3.7 PASTEURIZAÇÃO

Na pasteurização o leite é submetido a uma temperatura entre 72°C e 75°C, por um período entre 15 e 20 segundos, seguido de resfriamento imediato a 4°C (BRASIL, 2002). Esta etapa do processamento deve ser realizada em um trocador de calor de placas, com painel de controle equipado com termorregistrador automático, válvulas de desvios e termômetros. O intuito da pasteurização é

diminuir a contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes sensíveis a tratamentos térmicos, aumentando a vida útil do produto visto que elimina os microrganismos que podem alterar a composição nutricional do leite.

3.3.8 TRATAMENTO UHT

De acordo com a portaria nº 370/1997, o processo de ultra pasteurização consiste em submeter o leite homogeneizado a uma temperatura entre 130°C e 150°C, por um período entre 2 e 4 segundos, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, sendo este imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

3.3.9 ENVASE ASSÉPTICO

Antes de ser envasado o leite passa por um processo de resfriamento, para que assim possa ser envasado (DuPont, 2014). Nesta etapa o leite UHT é envasado em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas, que impedem a passagem de microrganismos e criam uma barreira contra luz, água e ar (TETRAPAK, 2014). As embalagens podem ser de material cartonado, PET (LISITA, 2010) ou flexíveis (CAMPOS, 2014).

3.3.10 ESTOCAGEM

O armazenamento do leite deve ser realizado em lugares secos, com condições higiênicas suficientes, livre de pragas, umidade, luz intensa e calor. É indispensável que durante as etapas do processamento sejam assegurados todos os requisitos do programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Este programa é composto por um conjunto de diretrizes que visam assegurar as condições higiênico-sanitárias do alimento, abrangendo as etapas desde a recepção das matérias-primas até a expedição do produto final.

3.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

A crescente demanda por produtos de melhor qualidade implica na necessidade de implantação de medidas que visem ao aumento na qualidade da matéria-prima e dos produtos prontos. No entanto a ideia de que é necessário implementar procedimentos para aumentar e assegurar a qualidade do insumo a ser vendido ainda é pouco difundida entre os principais responsáveis pelas matérias-primas.

Hoje em dia não é somente os órgãos fiscalizadores que exigem que o padrão de qualidade seja mantido, os consumidores também querem que o produto pelo qual eles pagam seja inócuo e de qualidade. Visto isso, os produtores devem implementar procedimentos de boas práticas de pecuária que maximizem a qualidade de sua matéria-prima, e que esse cuidado durante a pecuária do leite se reflita no produto final que chega ao consumidor. A FAO em 2013 lançou uma segunda edição de um guia de Boas Práticas de Pecuária do leite focado na propriedade rural, que busca por meio da implementação de Boas Práticas nas áreas de saúde, nutrição e bem-estar animal, higiene na ordenha, gestão do meio ambiente e socioeconômica, aumentar a rentabilidade, a produtividade e principalmente garantir um insumo de alta qualidade.

A fiscalização estabelece por meio da Portaria 368/1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os pré-requisitos básicos e necessários para implementação de Boas Práticas em estabelecimentos industrializadores de alimentos. Somado a isso, a Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998, instituiu a obrigatoriedade do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal sob regime do Serviço de Inspeção Federal – SIF e a Resolução do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) nº 10, de 22 de maio de 2003, instituiu a implantação dos programas de PPHO – Procedimento Padrão de Higiene Operacional, definindo pontos essenciais que devem ser controlados pelas empresas a fim de que a segurança dos alimentos seja mantida.

Em 2005 como uma forma de padronizar os procedimentos de fiscalização, o

DIPOA implementou por meio da Circular 175 um programa de fiscalização baseado nas Portarias 368/1997 e 46/1998, e na Resolução 10/2003. Este programa visa garantir os padrões higiênico-sanitários nos estabelecimentos beneficiadores de produtos de origem animal pela fiscalização contínua e sistemática.

Os pré-quesitos estabelecidos por este programa e que são utilizados como elementos fiscalizadores estão descritos na tabela 3:

Tabela 3: Programas de Auto Controle que devem ser implementados em estabelecimentos beneficiadores de produtos de origem animal (DIPOA, 2009)

PROGRAMA	ÁREA DE APLICAÇÃO
PAC 1	Manutenção das instalações e equipamentos industriais
PAC 2	Vestiários, sanitários e barreiras sanitárias
PAC 3	Iluminação
PAC 4	Ventilação
PAC 5	Água de abastecimento
PAC 6	Águas residuais
PAC 7	Controle integrado de pragas
PAC 8	Limpeza e sanitização
PAC 9	Higiene, hábitos higiênicos, treinamento e saúde dos operários
PAC 10	Procedimentos Sanitários das Operações
PAC 11	Controle da matéria-prima, ingredientes e material de embalagem
PAC 12	Controle de temperaturas
PAC 13	Calibração e aferição de instrumentos de controle de processo
PAC 14	Avaliação do Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
PAC 15	Controles laboratoriais e análises
PAC 16	Controle de formulação dos produtos fabricados
PAC 17	Certificação dos produtos exportados

A fiscalização busca com o auxílio destes programas, que abordam princípios e regras, a correta manipulação de alimentos, levando-se em consideração toda linha de produção, desde a matéria-prima até o produto final, envolvendo as condições de armazenamento, condições estruturais de edifícios, condições de equipamentos, sanitização de equipamentos e dependências da empresa, controle de pragas, higiene pessoal e tratamento de efluentes.

Programas de qualidade como APPCC e BPF asseguram por meio de pontos críticos de controle e práticas de produção higiênico-sanitárias que microrganismos mesófilos e psicrotróficos tais quais Coliformes, *Salmonella*, *Listeria* e *Bacillus* não se multipliquem no leite. Dentre estes microrganismos o gênero *Bacillus spp.* se destaca quando falamos de produção de leite UHT pelo fato de ser esporulado e poder permanecer no leite tratado termicamente, mesmo que sejam implementados programas para controle da produção.

3.5 *Bacillus spp.*

Bacillus spp. é um gênero de bactéria Gram (+), formador de esporos, com linhagens psicrotróficas. É considerado um potencial contaminante de alimentos por se desenvolver em ampla faixa de temperatura e ter capacidade de esporulação. Griffiths (1989) estudou a multiplicação desse gênero em temperaturas desde 6°C até 25°C, e observou que as espécies que mais se desenvolveram nesse intervalo de temperatura foram o *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides*. Estas três espécies são muito semelhantes, sendo bastante difícil distingui-las fenotipicamente (DROBNIEWSKI, 1993).

O gênero *Bacillus spp.* está frequentemente associado a surtos alimentares envolvendo produtos lácteos, principalmente pelo fato de serem mesofílicos esporulados, sobrevivendo a tratamentos a altas temperaturas. As bactérias deste gênero são usualmente encontradas em pequenas quantidades nos alimentos, porém acredita-se que o aumento da contaminação se dê por falhas no controle da temperatura do tratamento térmico e no armazenamento (FORSYTHE, 2013). A falta de boas práticas durante a ordenha aumenta a carga microbiana do leite cru, o que pode tornar ineficiente o processo térmico ao qual o leite será submetido. Além disso, os endósporos formados por essas bactérias quando elas são submetidas a condições estressantes, aumentam sua resistência a altas e baixas temperaturas, ambientes secos e diversos sanitizantes.

A espécie mais estudada desse gênero é *B. cereus* que pode causar dois tipos de doenças gastrointestinais são elas: síndrome emética e síndrome diarreica,

ambas causadas por enterotoxinas. Há cepas de *B. cereus* que podem produzir ambas toxinas. A síndrome do tipo diarréica possui sintomas semelhantes à intoxicação por *Clostridium perfringens*, sendo originada pela ingestão de alimentos contaminados com esporos que, no trato gastrintestinal, produzem uma enterotoxina termolábil (com resistência de 5 minutos a 60°C). A síndrome emética é causada pela ingestão de um número elevado de células (mais de 100.000 por grama de alimento) e assemelha-se à intoxicação alimentar causada pelo *Staphylococcus aureus*. Nessa síndrome ocorre a produção de uma toxina termoestável (resistente por 90 minutos a 121 °C, estável em pH entre 2 a 11) (FORSYTHE, 2013).

Segundo Gore et al. (2003), a produção de enterotoxinas pelo *B. cereus* ocorre quando o microrganismo se multiplica a cerca de 32°C, em condições aeróbias, com uma concentração de 1% de carboidratos e pH alcalino. Assim, alimentos que contêm elevados níveis de amido, frutose ou lactose, como produtos lácteos, vegetais e cárneos (KOTIRANTA, LOUNATMAA, HAAPASALO, 2000) quando estocados em temperatura ambiente por longos períodos, estão mais sujeitos ao desenvolvimento de *B. cereus* enterotoxigênicos.

O grupo *Bacillus spp.* é considerado muito semelhante fenotipicamente, sendo a distinção entre as espécies por provas bioquímicas de difícil realização. As espécies de *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* são consideradas subespécies do *B. cereus*. Ahmed et al. (1995) relatam a alta semelhança entre *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, diferenciados apenas pela produção de cristais durante a esporulação pelo gênero *B. thuringiensis*. Contudo, em momentos em que o microrganismo não se encontra na forma de esporos, não haverá distinção entre os gêneros *B. thuringiensis* e *B. cereus*.

3.5.1 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria Gram (+) formadora de esporos que possui atividade inseticida pela produção de cristais formados durante a esporulação. Os cristais de *B. thuringiensis*, também conhecidos por δ -endotoxinas, são formados principalmente por proteínas denominadas Cristal (Cry), (BRAVO; GILLB;

SOBERÓN, 2007). Estes cristais apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos e, por isto, essa bactéria vem sendo utilizada como inseticida natural em lavouras.

A identificação do *B. thuringiensis* é realizada por provas bioquímicas, que segundo a Instrução Normativa 62 consistem em testes de: Coloração de Gram, catalase, motilidade, redução de Nitrato, hemólise em sangue de carneiro, decomposição da tirosina, crescimento de rizoide, e por fim a verificação da presença dos cristais por métodos moleculares. Porém, se as células de *B. thuringiensis* forem submetidas a tratamentos térmicos, pode ocorrer a perda do plasmídeo responsável pela formação dos cristais, e a bactéria pode não ser mais identificada como *B. thuringiensis* (GRANUM, 2002; *European Food Safety Authority*, 2005). Nesse sentido, *B. cereus* e *B. thuringiensis* são geneticamente indistinguíveis, exceto pela presença desse plasmídeo e, conseqüentemente, dos cristais. No entanto, estudos indicam que espécies de *B. cereus* e *B. thuringiensis* podem adquirir ou perder este plasmídeo por troca horizontal, que consiste na troca de genes entre bactérias não descendentes por conjugação, transdução ou transformação (THORNE, 1993).

Estudos demonstram que cepas de *B. thuringiensis* podem causar a mesma síndrome diarréica ocasionada por enterotoxinas de *B. cereus* (RIVERA et al., 2000; HANSEN and HENDRIKSEN, 2001). Além disso, algumas análises laboratoriais demonstraram que vegetais prontos para consumo apresentaram cepas de *B. thuringiensis* (Frederiksen et al., 2006; Hendriksen & Hansen, 2006). Este microrganismo já foi identificado em comidas prontas para consumo, vegetais e frutas (ZHOU, et. al., 2007). Também algumas cepas desta espécie possuem a capacidade de causar diarreia por possuírem genes enterotóxicos iguais aos encontrados nas estirpes de *B. cereus* causadoras de surtos alimentares (WILCKES, 2006). O fato das linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* serem muito semelhantes quanto a genética pode justificar o baixíssimo número de notificações de contaminação alimentar por *B. thuringiensis* que na maioria das vezes, devido a semelhança entre as espécies, acaba confundido com *B. cereus*. Dessa forma o número de surtos alimentares envolvendo o *B. thuringiensis* pode estar subestimado visto que muitas vezes o agente etiológico pode ser erroneamente

identificado como *B. cereus* (PAIVA et. al., 2009).

A bactéria do gênero *B. thuringiensis* é comumente encontrada no solo visto que esta é utilizada como pesticida para controle de pragas (PERANI et al., 1998). Contudo, esta espécie possui a capacidade de produzir toxinas capazes de causar intoxicações em humanos (PESSOA, 2014). Assim, objetiva-se com auxílio de modelagem matemática e microbiologia preditiva estudar o comportamento deste microrganismo em leite UHT por meio da obtenção de parâmetros cinéticos de multiplicação, e a potencialidade deste em causar surtos alimentares.

3.6 MODELAGEM MATEMÁTICA E MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Ao falarmos de modelagem matemática nos referimos a um conjunto de proposições baseadas em simulações, que nos auxiliam no entendimento do comportamento de processos estudados (Baranyi & Roberts, 1995). Este tipo de ferramenta matemática vem se desenvolvendo e se difundindo desde os anos 80 com a popularização dos computadores pessoais. Os modelos matemáticos atualmente são utilizados como uma forma de prever e auxiliar na solução de problemas práticos (ANJOS, 2013).

Whiting e Buchanan (1994) fizeram a diferenciação dos modelos em primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem a evolução da multiplicação microbiana pela determinação dos parâmetros microbiológicos cinéticos correspondentes as fases de multiplicação dos microrganismos. Com a determinação destes parâmetros pode-se gerar um gráfico correspondente as quatro fases do crescimento bacteriano: adaptação, exponencial, estacionária e morte (ALVARENGA, 2008).

Os modelos secundários descrevem a dependência dos parâmetros cinéticos com os fatores ambientais, como por exemplo a mudança causada pela alteração da temperatura; enquanto modelos terciários são representados por *softwares* que se baseiam em modelos primários e secundários para prever o comportamento do microrganismo de interesse em função das condições as quais foram submetidos (MILLER et. al., 2004). Os programas *Pathogen Modeling Program* (PMP), *Food MicroModel*, *Seafood Spoilage Predictor* e *Food Spoilage*

Predictor, fazem parte dos *softwares* disponíveis para estudos de microbiologia preditiva (FERREIRA, 2004); outro exemplo de modelo terciário é programa *ComBase Predictive Model*.

É neste contexto de modelagem matemática que se insere a microbiologia preditiva, que prediz o comportamento do microrganismo por meio da análise de dados experimentais. A microbiologia preditiva de alimentos é uma área com potencial para desenvolvimento por ser considerada uma ferramenta útil na análise de riscos (SHIMONI e LABUZA, 2000).

Assim utilizando-se essas ferramentas juntamente com os dados experimentais de multiplicação microbiana é possível estimar os parâmetros cinéticos como velocidade máxima de multiplicação (μ), duração da fase lag (λ) e população microbiana máxima atingida (\ln) (SARMENTO, 2006). Além disso, os dados laboratoriais podem ser utilizados para construção de um gráfico da curva típica do crescimento bacteriano. Essa curva apresentará três fases:

- Fase lag: Fase na qual o microrganismo está se adaptando ao meio de cultivo;
- Fase exponencial: Fase na qual a multiplicação microbiana cresce de forma exponencial;
- Fase estacionária: Fase com número máximo de células, na qual a taxa de multiplicação é igual a de morte microbiana.

A curva obtida pela modelagem será semelhante a representada na figura 1.

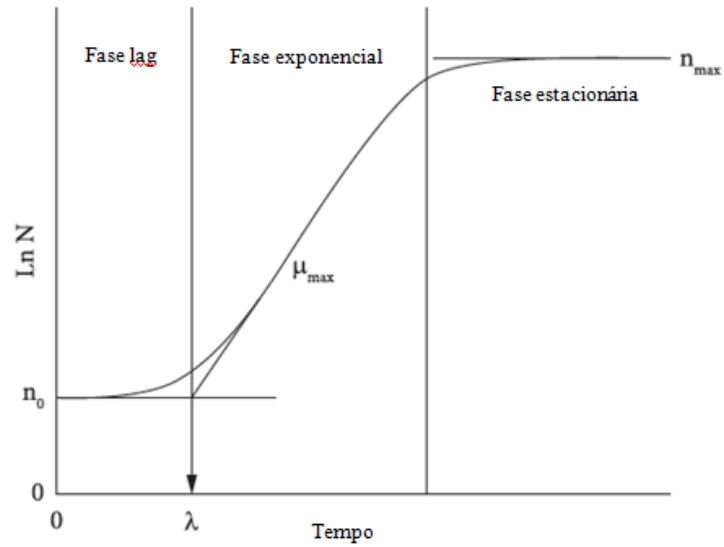


Figura 1: Curva típica do comportamento de desenvolvimento microbiano (SWINNEN et al., 2004).

Segundo Neumeyer et. al. (1997), a microbiologia preditiva possui diversas vantagens, entre as quais pode estimar o tempo de vida de prateleira, avaliar os processos de higienização e determinar níveis microbiológicos seguros para os produtos. O uso de modelagem matemática pode diminuir a necessidade de análises laboratoriais de longo prazo e otimizar processos (DAVEY, 1994).

Fabiana Oliveira Perini¹, Susana de Oliveira Elias¹, Eduardo Cesar Tondo¹

¹Departamento de ciências dos alimentos, Instituto de ciência e tecnologia de alimentos – ICTA. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* em leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva

Resumo: *Bacillus spp.* são bactérias esporuladas, as quais têm a capacidade de resistir a tratamentos com temperaturas elevadas e frequentemente estão envolvidas em surtos alimentares. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria pertencente a esse grupo comumente utilizada no controle de pragas da agricultura, contudo já foi responsável por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) O presente trabalho teve por objetivo analisar a multiplicação de uma cepa de *B. thuringiensis* advinda de uma contaminação de leite UHT, utilizando modelagem matemática e microbiologia preditiva. A cepa de *B. thuringiensis* foi artificialmente inoculada em leite UHT e armazenada a 26°C. Pelo programa ComBase DMFit construiu-se uma curva de multiplicação que resultou em um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9901 e um erro quadrático médio (RMSE) de 0,1989. Os resultados demonstraram que a multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT alcançou uma concentração de 10^7 log UFC/mL em aproximadamente 15 horas. A fase lag desta multiplicação durou um período de 6 horas, o que significa que esta bactéria se desenvolve bem em leite UHT. O modelo obtido experimentalmente foi comparado com uma curva obtida pelo ComBase *predictor* para *Bacillus spp.*, e observou-se que os parâmetros cinéticos foram semelhantes. Isto significa que a cepa de *B. thuringiensis* analisada apresentou modelo de multiplicação similar ao gênero *Bacillus spp.* como referenciado em diversos estudos. Por fim, o modelo obtido experimentalmente foi compatível com os modelos preditos, podendo ser utilizado no estudo da multiplicação do *B. thuringiensis* em leite UHT.

Palavras-chave: *B. thuringiensis*, microbiologia preditiva, leite UHT, modelo matemático primário, ComBase.

4.1 INTRODUÇÃO

Bacillus spp. são bactérias Gram-positivas, aeróbias, formadoras de endósporos, consideradas ubíquas, ou seja, estão presentes no solo, água e poeira. Esses microrganismos têm a capacidade de resistir a tratamentos com temperaturas elevadas e podem estar envolvidos em surtos alimentares. Espécies desse gênero podem ser identificadas em produtos “in natura”, frescos ou processados, derivados do leite e em cereais (JAY, 2005).

A espécie *Bacillus cereus* é considerada a mais importante deste gênero, contudo existem relatos que incluem a ocorrência de contaminação alimentar, devido à presença de *B. mycooides*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (COSENTINO, et. al., 1997; PRUB et. al., 1999; SWIECICKA e MAHILLON, 2006). Além disso, diversos autores destacam que esses microrganismos são bastante similares quanto à morfologia, aspectos bioquímicos e produção de enterotoxinas, responsáveis pelas possíveis intoxicações alimentares (FORSYTHE, 2013; LAGO, 2002; PESSOA, 2014).

4.1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é um bastonete Gram-positivo entomopatogênico (causa doenças em insetos), esporulado e que produz cristais tóxicos durante a esporulação. *B. thuringiensis* é uma bactéria aeróbia, porém não estrita, com faixa de temperatura de multiplicação entre 10 e 45 °C. Ela pode utilizar uma variedade de substratos como fonte energética são exemplos a lactose, a glicose e a sacarose (PANAROTTO, 2006).

A principal característica que difere o *B. thuringiensis* das demais espécies do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal protéico (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; HABIB; ANDRADE, 1998; MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 2001; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). A produção de cristais proteicos representa uma característica típica de *B. thuringiensis* e, em geral, ocorre durante

a esporulação.

Estudos demonstram que algumas cepas de *B. thuringiensis* são capazes de produzirem enterotoxinas e que esses microrganismos foram isolados de vários alimentos, como por exemplo, produtos lácteos e uvas (BAE, et al., 2004; BIDOCHKA, et al., 1987). O aumento do uso dessa bactéria como inseticida natural pode ser um dos fatores para o aumento dos casos de intoxicação alimentar, visto que os esporos posteriormente poderão germinar e produzir enterotoxinas (COSENTINO et. al., 1997). Pesquisas apontam que foram encontradas em espécies de *B. thuringiensis* enterotoxinas codificadas pelos genes *hbl*, *nhe* e *bceT*. Estas toxinas também são encontradas em linhagens de *B. cereus* e são comumente envolvidas em surtos alimentares. O envolvimento deste microrganismo em relatos de surtos alimentares é considerado esporádico, mesmo com a comprovação da produção desta toxina pelo *B. thuringiensis*, (JACKSON et al., 1995).

4.1.2 *Bacillus spp.* E CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE.

O leite é um alimento com valor nutritivo muito elevado (SANTIAGO, 2008), o que favorece o desenvolvimento de inúmeros microrganismos, tornando-o altamente perecível, além de um importante veículo de agentes de toxinfecção alimentar (PONSANO et al., 2001). Muitos desses agentes, no entanto, são destruídos por altas temperaturas às quais o leite é submetido durante o seu processamento (MIJACVIC e SAMARDZIJA, 1996).

Contudo, alguns microrganismos esporulados conseguem permanecer nos alimentos mesmo se eles forem submetidos a tratamentos térmicos, como a fervura e a pasteurização. Dentre as formas esporuladas, *Bacillus spp.* destaca-se na indústria alimentícia como agente causador de intoxicação alimentar, além de provocar grandes prejuízos econômicos por ser um potencial deteriorante de alimentos (COSENTINO et al., 1997). Em um estudo conduzido por (WONG et al., 1998), a maioria das cepas de *Bacillus spp.* isoladas de produtos derivados do leite, incluindo leite pasteurizado, sorvete e leite em pó foram capazes de produzir

toxinas. Desses microrganismos, foram identificadas espécies de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycooides*. Turnbull (1989) descreve que *B. thuringiensis* e *B. mycooides* são fortemente relacionados ao *B. cereus*, e que eles têm a capacidade de produzir toxina enterotoxigênica.

Acredita-se que a contaminação por esta espécie de microrganismos venha diretamente do solo, ar e água, sendo que a presença destes em equipamentos pode contribuir para recontaminação do leite tratado termicamente. Além do mais, Gordon (1977) relatou o envolvimento de *B. thuringiensis* em um caso de mastite bovina, o qual resultou na morte do animal. Além deste caso envolvendo um animal, há indicação do envolvimento de *B. thuringiensis* em casos de surtos com frutas, vegetais, sobremesas (sorvetes, pudins e bolos), pratos prontos, produtos tratados termicamente, molhos, arroz, carnes, queijo, maionese e pastas (ROSENQUIST et. al., 2005).

4.2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo analisar a multiplicação de uma cepa de *B. thuringiensis* em leite UHT com o auxílio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 OBTENÇÃO DOS DADOS DE MULTIPLICAÇÃO DA BACTÉRIA *Bacillus thuringiensis*

A cepa de *B. thuringiensis* foi isolada de uma amostra de leite UHT no Rio Grande do Sul. O microrganismo foi identificado pela análise de PCR e sequenciamento no MegaBACE™ 500 (APBiotech, Japão) seguido por análise *in silico* nos bancos de dados do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e do Ribosomal Database Project (RPD). Essa identificação foi realizada no Laboratório de Imunovirologia Molecular e Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Viçosa (MG) e a análise da multiplicação dessa bactéria em leite foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, do Instituto de Ciência e

Depois da identificação, o isolado bacteriano foi cultivado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), a 37°C, por 24 horas, e, depois do período de incubação, realizou-se a lavagem da cultura, utilizando água peptonada (0,1 % m/v) autoclavada para a realização do inóculo. A análise da multiplicação foi realizada em uma amostra de leite UHT adquirida em um supermercado de Porto Alegre (RS), a embalagem foi desinfetada com álcool etílico 70%. Uma amostra de 200 mL de leite UHT foi colocada em um Erlenmeyer previamente esterilizado, no qual se inoculou 0,1 mL de uma cultura contendo 10^2 UFC/mL do microrganismo estudado. Após a inoculação do microrganismo na amostra de leite, retirou-se alíquotas de 1,0 mL, nos tempos 0; 2,5; 5; 6; 7; 8,5; 10; 11,5; 13; 14; 15; 16; 24 e 26 horas, durante a coleta dos pontos a amostra de leite permaneceu sob uma temperatura de 26°C e um recipiente fechado. A temperatura de 26°C foi escolhida pelo fato do microrganismo ser mesofílico. Cada alíquota retirada foi submetida ao método de diluição em água peptonada (0,1 % m/v). Logo após fez-se a semeadura das diluições pelo método de espalhamento em placas de Petri contendo ágar BHI e ágar mossel, que foram incubadas a 37°C, por 24 horas.

Após este período de incubação, foi realizada a avaliação quantitativa do número de células viáveis obtidas para cada ponto analisado, obteve-se assim o número de colônias por mL (UFC/mL). Este número em UFC/mL foi transformado para base log e submetido à análise matemática. Além das contagens bacterianas, mediu-se o pH e a temperatura do leite inoculado no decorrer do experimento.

Foram realizadas duas curvas de multiplicação, independentes, para avaliar o comportamento da bactéria em leite UHT, sendo as contagens de cada uma delas executadas em duplicata. Concomitantemente a esse experimento realizou-se a coloração de Gram dos microrganismos que se multiplicaram nas placas de ágar BHI e mossel, em todos os pontos analisados, a fim de verificar uma possível contaminação das amostras.

4.3.2 MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO de *B. thuringiensis* EM LEITE UHT

A multiplicação da bactéria foi investigada com o auxílio de um programa de modelagem matemática chamado ComBase DMFit (<http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>), o qual descreve o crescimento de microrganismos baseado na análise quantitativa e modelagem matemática dos dados experimentais.

A equação 1 representa o modelo básico para equação de Baranyi e a equação 2 o valor da fase lag. A taxa de crescimento, tempo de geração e logaritmo da densidade máxima da população (A) são representados pela equação 3, 4 e 5, respectivamente.

Equação 1: Modelo básico para equação de Baranyi.

$$y(t) = y_o + \mu_{\max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{y_{\max} - y_o}}\right)$$

Onde:

y(t) = concentração de células no tempo (t); e:

y = ln(N/No) y_o = concentração inicial de células no tempo 0 (t=0);

y_{max} = concentração máxima de células;

μ_{max} = máxima taxa de crescimento

Equação 2: Variação da concentração de substrato em função do tempo.

$$\lambda = \frac{\ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right)}{v}$$

Onde:

q₀=P₀/K_p; onde q₀ representa o estado fisiológico das células;

p_o = concentração de células no início do processo de crescimento;

K_p = constante de Michaelis-Menten

Equação 3: Taxa de crescimento μ .

$$\mu(t) = \frac{d(\ln x(t))}{dt}$$

Onde:

$x(t)$ = Aumento da concentração celular bacteriana em função do tempo.

Equação 4: Tempo de geração

$$G = \ln 2 / \mu_{\max}$$

Onde:

μ_{\max} = taxa máxima de crescimento atingida pelo microrganismo

Equação 5: Logaritmo da densidade máxima da população microbiana.

$$A(t) = \frac{\ln(e^{-\mu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0})}{\mu_{\max}}$$

Onde:

$h_0 = -\ln \alpha_0$;

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

h_0 = estado fisiológico inicial da célula

4.3.3 AVALIAÇÃO DO AJUSTE PREDITIVO DA MULTIPLICAÇÃO DE *B. thuringiensis* EM LEITE UHT

O programa DMFit foi utilizado para obtenção dos parâmetros cinéticos que representam as respostas do comportamento de multiplicação do microrganismo quando submetido a determinadas condições. Entre os parâmetros calculados e utilizados na avaliação do modelo estão o coeficiente de determinação (R^2) e o erro quadrático médio (RMSE). O R^2 representa o erro médio calculado pelo modelo, enquanto o RMSE indica a adequação do modelo com os dados utilizados na

modelagem. Valores R^2 próximos a 1 sugerem que o modelo é o que mais se adequa ao comportamento de multiplicação do microrganismo. Enquanto valores de RMSE próximos a zero representam a melhor aproximação entre os valores que foram obtidos pela modelagem e observados no experimento (Oh et al., 2012; Wang et al., 2013). As equações 6 e 7 representam os cálculos para valores de R^2 e RMSE, respectivamente.

Equação 6. Equação para o cálculo do valor de R^2 .

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{\hat{N}} (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{\hat{N}} \hat{y}_i^2}$$

onde:

\hat{N} = número de pontos no conjunto de dados;

y_i = valor observado;

\hat{y}_i = valor predito.

Equação 7. Equação para cálculo do valor RMSE.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\mu - \hat{\mu})^2}{n}}$$

onde:

n = número de observações;

μ = valor observado;

$\hat{\mu}$ = valor predito.

Além disso, utilizou-se para modelagem da curva de multiplicação o programa ComBase Predictor ([<http://modelling.combase.cc/>]) com as seguintes variáveis: temperatura 26°C, valor da contagem inicial 2,0 log UFC/mL e microrganismo *Bacillus* spp. Dessa forma, os parâmetros cinéticos obtidos nesse modelo foram utilizados para comparação com os dados obtidos experimentalmente, já que as condições (valores das variáveis) em que ambos foram obtidos são bem semelhantes.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de leite UHT utilizada para o experimento foi testada para

contaminação microbiana antes da inoculação da cepa de *B. thuringiensis*, e estava livre de contaminação por células bacterianas viáveis.

Os resultados da contagem total obtidos pelo plaqueamento direto em meio de cultura foram transformados em base logarítmica e submetidos à modelagem matemática no programa ComBase DMFit. Este programa, utilizando o modelo primário completo de Baranyi e Robson (1994), descreve os parâmetros de multiplicação do microrganismo e modela uma curva de multiplicação microbiana. A curva do experimento está demonstrada na figura 2.

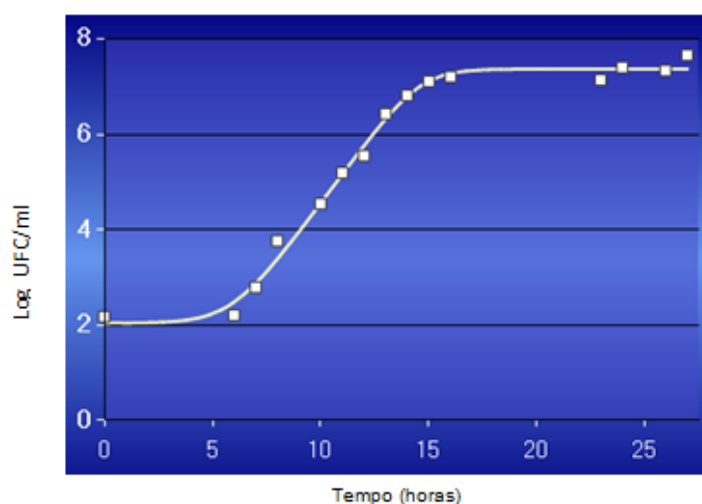


Figura 2. Curva de multiplicação microbiana de *B. thuringiensis* em leite UHT a 26°C, ajustada aos dados do DMFit. A linha representa o modelo primário. Cada ponto representa a média entre a duplicata, repetido duas vezes.

A curva de multiplicação começou com uma contagem de 2,04 UFC log/mL, atingindo uma população final de 7,37 UFC log/mL. Pelo estudo, percebe-se que o *B. thuringiensis* se multiplica rapidamente em temperatura igual a 26°C, sendo que a temperatura ótima de multiplicação varia de 25 a 37°C (KRAMER & GILBERT, 1989; DROBNIOWSKI, 1993; DUFRENNE et al., 1995).

São apresentados na tabela 4 os parâmetros da modelagem de multiplicação obtidos pelo DMFit tais quais: Concentração celular inicial e final, taxa máxima de multiplicação e tempo da fase lag.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos no ComBase *predictive models* para modelagem da multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT a uma temperatura de 26°C.

Parâmetros	Modelagem
R ²	0,9901
RMSE	0,1989
Ln(No)	2.0423
Fase Lag (λ)	5.9274
$\mu_{\text{máx}}$	0.6153
ln(N)	7.3686

R² = Coeficiente de determinação; RMSE = Erro quadrático médio (adequação ao modelo); Ln(No) = logaritmo natural da concentração celular no tempo (to), expresso em UFC/mL; Fase lag (λ) = tempo da fase lag em horas; $\mu_{\text{máx}}$ = taxa máxima específica de multiplicação; expressa em [log(UFC/mL)/h]; ln (N) = logaritmo natural da concentração celular no tempo (t) em horas, expresso em UFC/mL.

Conforme demonstrada na Tabela 4, a fase lag correspondeu a um tempo de 5,92 horas. Este tempo de adaptação indica que o leite é um bom substrato para desenvolvimento de *B. thuringiensis*, e que o período máximo ao qual o leite pode permanecer a uma temperatura de 26°C é 5,92 horas. Segundo Takami et. al. (1990), o *Bacillus spp.* possui facilidade em se adaptar e desenvolver, tanto em meios sintéticos quanto em meios mais complexos. O *Bacillus spp* se desenvolve bem em meios ricos em carbono e nitrogênio, o que é o caso do leite (GIONGO, 2006).

A população final de células foi de 7,36 UFC log/mL, alcançada em um período de aproximadamente 15 horas de incubação a 26°C. De acordo com Albrecht (2014), a dose infectante para *Bacillus spp* é de 10⁵ UFC log/mL, o que significa que ao final de um período de 13 horas a amostra se consumida já causaria surto, caso a cepa fosse patogênica. A dose inicial utilizada para incubação foi de 2 UFC log/mL, caso esta concentração inicial fosse mais alta, a quantidade de células viáveis necessárias para ocasionar um surto poderia ser atingida mais rapidamente visto que este microrganismo apresentou facilidade de multiplicação em leite.

Na Tabela 4 constam os valores obtidos para o coeficiente de determinação

(R^2) e o erro médio (RMSE) para este modelo, e os resultados foram de 0,9901 e 0,1989, respectivamente. Valores de R^2 próximos a 1 indicam melhor desempenho do modelo, e valores de RMSE próximos a zero sugerem a melhor aproximação entre os valores preditos e observados. Visto isso, fica claro a adaptação dos dados experimentais ao modelo primário.

A figura 3 representa a confrontação das curvas obtidas pelo programa Combase Predictor para *Bacillus spp.*, e a curva para *B. thuringiensis* obtida pelo ComBase DMFit por inserção dos dados experimentais.

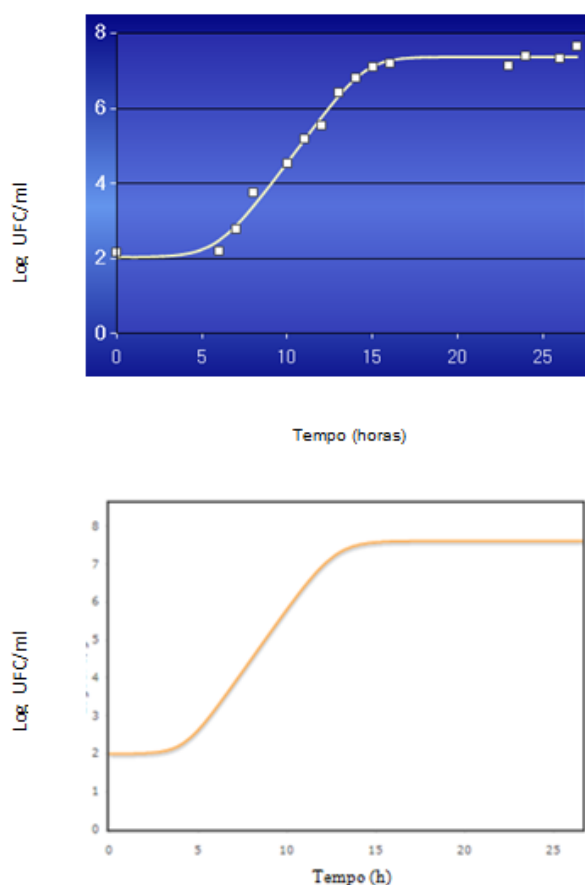


Figura 3. Curvas do modelo experimental ajustado aos dados do DmFit, e do modelo pré-definido pelo ComBase, respectivamente

Por meio de comparação visual, pode-se observar que as curvas modeladas para a multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT e a curva obtida para *Bacillus spp.* são muito semelhantes, o que já era esperado visto que o valor de ajuste da curva foi próximo a um.

Para as curvas obtidas, verificou-se que a fase Lag correspondeu a um período de aproximadamente 5,92 horas. A fase exponencial correspondeu ao intervalo de 5 a 15 horas de cultivo. Após esse período, ocorreu o início da fase estacionária, período no qual não houve mais aumento do número de microrganismos, porém ainda havia bactérias viáveis em grandes quantidades.

O pH do leite oscilou entre um valor inicial entre 6,85 e 7,3 durante um período de 13 horas, e que somente após 24 horas de incubação a amostra apresentou diminuição no valor do pH para 6,75, o que não representa uma mudança expressiva.

O *B. thuringiensis* é um microrganismo ubíquo, podendo estar na água, ar, poeira ou até mesmo no úbere quando a contaminação é muito elevada. O leite UHT de onde foi isolado este microrganismo pode ter sido contaminado por diversas maneiras, como o uso de água contaminada, falta de controle do binômio tempo-temperatura do tratamento térmico ou higienização mal realizada. Os esporos do microrganismo resistem a condições adversas, podendo permanecer em sua forma vegetativa quando submetido ao estresse causado, por exemplo, por tratamentos térmicos e sanitização, e vir a se multiplicar quando as condições ambientais se tornarem favoráveis.

Possivelmente houve falha no controle dos programas de qualidade para justificar a presença dessa bactéria no leite UHT. O leite pode ter sido ordenhado com uma contagem inicial de microrganismos muito alta, o que seria um indicador da falta de condições higiênico-sanitárias e diminuiria a eficácia do tratamento térmico. A utilização de água fora dos padrões microbiológicos exigidos; sanitização realizada com concentração de produtos aquém da necessária, ou por tempo insuficiente; falhas no controle da temperatura de estocagem, pasteurização e tratamento UHT, também podem estar relacionados ao problema de contaminação do leite por *B. thuringiensis*.

Para que não haja contaminação do leite deve-se seguir as diretrizes que são estipuladas pelas legislações em vigor, por meio de práticas higiênicas desde a

ordena do leite até a expedição do produto final. Respeitado as temperaturas indicadas para estocagem e para o tratamento térmico do leite.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente estudo indicam que a cepa de *B. thuringiensis* multiplica-se bem em leite UHT. O período máximo no qual o leite pode permanecer a uma temperatura de 26°C, sem seja atingida uma contagem elevada de células bacterianas viáveis, é de 5,92 horas.

As bibliografias estudadas indicam que embora o *B. thuringiensis* não esteja frequentemente envolvido em surtos alimentares, este pode apresentar toxinas enterotoxigênicas semelhantes às encontradas na espécie *B. cereus*, que podem causar Doenças transmitidas por alimentos (DTA). Também foi possível observar pelas curvas de multiplicação a semelhança entre os parâmetros cinéticos das cepas de *B. thuringiensis* e *Bacillus* spp.

Não existem estudos sobre modelagem matemática e microbiologia preditiva para multiplicação de *B. thuringiensis* em leite UHT e sobre a potencialidade destas cepas em causar surtos alimentares. Sugere-se que em estudos futuros sejam avaliadas outras temperaturas de incubação, inoculação de contagens iniciais mais elevadas e uma análise genotípica das cepas. Para que assim, seja possível maiores afirmações sobre a multiplicação e produção de toxinas enterotoxigênicas por este microrganismo.

6. BIBLIOGRAFIA

ALBRECHT, J. A. *Bacillus cereus*. University of Nebraska Cooperative Extension. Disponível em <http://www.foodsafety.unl.edu/pathogens/bacillus.html>. Acesso: Novembro,2014.

ANGELO, E. A.; VILAS-BOAS, G. T.; CASTRO-GOMES, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. Semina: Ciências Agrárias. Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

AQUARONE, E.; BORZANI; W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, 2001. p.

245-265.

BAE, S., FLEET, G.H. and HEARD, G.M. (2004) Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 301–312.

BIDOCHKA, M.J., SELINGER, L.B. and KHACHATOURIANS, G.G. (1987) A *Bacillus thuringiensis* isolate found on grapes imported from California. *J. Food Prot.* 50, 857–858.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62 de 26 de ago. de 2003. Métodos Analíticos oficiais para Análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia e meio ambiente*. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

COSENTIO, 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.

Environ. Microbiol. 65, 5436–5442. Swiecicka, I., Mahillon, J., 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, Isopoda). *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 132–140.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança dos Alimentos*. 2 ed. Brasil: Artmed, 2013. p. 249-253.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus spp.* Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – PUCRS, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, 2006.

GLARE, T. R.; O'callaghan, M. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350 p.

GORE, H.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. Real-time molecular beacon NASBA reveals hblc expression from *Bacillus* spp. In milk. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, v. 311, p. 386-390, 2003.

GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K. & LUND, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 177, 225–229.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Manole, 1986. p. 130-140.

IN, A. L.; SONENSHEIN, J. A.; HOCH, and R. LOSICK (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 3. ed. Brasil: Artmed, 2005. p. 508-511.

KRAMER, J. M., GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* Species. In: *Food Born Bacterial Pathogens*, Doyle, M. P. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp: 21-70, 1989.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. 2 (189-198), 2000. *Microbiological Societies* 48 (2006) 410–418.

WONG, H-C., M-H. CHANG, and J-Y. Fan. 1988. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:699-702.

MILLER, F. A.; GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. A *Microbiologia Preditiva* como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares. *Boletim de Biotecnologia: Avanços e Aplicações – Alimentar*, n. 78, set. 2004.

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa.

MLJACEVIC, Z.; SAMARDZIJA, S. Heat treatment of milk. *Veterinarski Glasnik*, v.50, p.283-287, 1996.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA. U.A.

OLIVEIRA, A. P. Microbiologia Preditiva. In: Disciplina de Seminários aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2012, Goiânia. 164p.

OLIVEIRA, M. F.; Evolução da carga microbiológica de uma refeição pré-cozinhada – Resultados experimentais e Microbiologia Preditiva. 2009. 177f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química dos Alimentos) - Universidade de Aveiro, Departamento de Química. Aveiro, 2009.

PAIVA, E. P.; FAI, A. E. C.; SOARES, D. S.; STAMFORD, T. L. M. *Bacillus cereus* e suas toxinas em Alimentos. *Higiene Alimentar*, Pernambuco, v. 23, n. 170/171, p. 87-92, mar./abr. 2009.

PANAROTTO, P. Influência de parâmetros operacionais, fontes proteicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. 20 de out. de 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. 2006.

PRU. X. M. B., DIETRICH, R., NIBLER, B., MARTLBAUER, E., Scherer, S., 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of *Bacillus cereus* group. *Appl.*

THORNE, C. B. 1993. *Bacillus anthracis*, p. 113–124.

ROSENQUIST, H.; SMIDT, L.; ANDERSEN, S.; JENSEN, G.; WILCKS, A.

Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiology Letters 2005; 250: 129-136.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKISHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* spp. Applied Microbiology Biothechnology. Heidelberg, GE, v.34, p.157-162, 1990.

VALERO, M., HERNANDEZ-HERRERO, L.A., FERNANDEZ, P.S.; SALMERON, M.C. (2002) Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. Food Microbiol. 19, 491–499.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Bacillus*. In: VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne Pathogens. London:

7. DISCUSSÃO GERAL

O *B. thuringiensis* é usualmente utilizado como biopesticida no controle de pragas, visto sua capacidade entomopatogênica pela síntese de cristais proteicos. Contudo, segundo JAY (2005) mesmo o microrganismo *B. thuringiensis* estando mais frequentemente associado ao controle biológico de insetos e não com surtos alimentares, algumas cepas podem produzir enterotoxinas podendo causar DTA.

O gênero *B. thuringiensis* é muito semelhante ao gênero do *B. cereus*, sendo que em momentos nos quais não existe esporulação estas duas espécies seriam indistinguíveis. O isolamento de uma cepa de *B. thuringiensis* advinda de uma amostra de leite UHT direcionou o foco deste trabalho para análise de multiplicação por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva.

O grupo *Bacillus spp.* está frequentemente envolvido em surtos alimentares com arroz, leite, sorvetes, molhos e queijos. O fato de o *B. thuringiensis* ser muito semelhante fenotipicamente ao *B. cereus*, pode ter subestimado o real envolvimento de *B. thuringiensis* em surtos alimentares, visto que o surto pode ter

sido erroneamente identificado como resultante da contaminação por *B. cereus* enquanto na verdade seria pela contaminação de *B. thuringiensis*.

A positividade para estes pontos sugere a necessidade da revisão do uso deste microrganismo como agente pesticida, visto que no momento no qual este é pulverizado em lavouras pode-se estar espalhando um potencial causador de DTA. Além disto, estudos demonstram que o microrganismo contém os genes que podem causar surtos alimentares.

Os resultados demonstraram que o microrganismo se adapta bem ao leite UHT e multiplica-se em períodos pequenos, atingindo em poucas horas a dose infectiva necessária para causar surtos alimentares. Atualmente não existem estudos relacionados à modelagem de *B. thuringiensis* em leite, portanto este servirá como referência para futuros estudos relacionados a multiplicação deste microrganismo e possíveis causas de contaminação do leite.

8. BIBLIOGRAFIA

ABLV. O setor do leite longa vida. Associação Brasileira de leite longa vida. Disponível em < <http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=set-inf>>. Acesso: Novembro, 2014.

AHMED, A.H. et al. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.3, p.636-640, 1995.

ANJOS, L. D. Modelos de crescimento de psicrotróficos em diferentes temperaturas e pH. 2013. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

BERLEZI, A. C. B. Evolução dos preços do leite e derivados no mercado Brasileiro

e Mundial. 2013. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Ciências Econômicas do Departamento de Ciências Administrativas Contábeis, Econômicas e da Comunicação Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Ijuí, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo B.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo C.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado .

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel .

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Ofício Circular nº 07 DILEI/CGI/DIPOA, de 11 de setembro de 2009. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole em estabelecimentos processadores de leite e derivados, mel e produtos apícolas.

DAVEY, K. R. Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 295-303, 1994.

DuPont Nutrição e Saúde. Bebidas Lácteas Achocolatadas. Disponível < http://www.fermentech.com.br/seminario_jiparana/arquivos/bebidas_lacteas_achocolatadas_julio_lima_dupont.pdf>. Acesso: Novembro, 2014.

FAO. Food and Agricultural Organization. Disponível em < <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/dairy-home/en/#.VF9yFPnF9yQ>>. Acesso: 09 nov. 2014.

FAO/WHO. Food safety risk analysis a guide for national food safety authorities. p. 29-30. Report of a joint FAO/WHO meeting. Rome, Italy, 2006.

FAO e IDF. Guia de boas práticas na pecuária de leite: Produção e Saúde Animal Diretrizes. 8. Roma, 2013. 51 f.

FERREIRA, L. D. Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico, Florianópolis.

FREDERIKSEN, K.; ROSENQUIST, H.; JORGENSEN, K.; WILCKES, A. Occurrence of natural contaminants of *Bacillus thuringiensis* and residues of *Bacillus thuringiensis* based insecticides on fresh fruit and vegetables. Appl Environ Microbiol 72: 3435–3440.2006.

GEA, Mechanical Equipment. Solução para separação em laticínios. Disponível em <http://brasil.westfaliaseparator.com/fileadmin/GEA_WS_Brasil/PDF/Folder_Solucoes_em_Separacao_para_Latici%CC%81nios_final.pdf>. Acesso: Novembro, 2014.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl Environ Microbiol 67: 185–189. 2001.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN B.M. Detection of *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD1 on cabbage for human consumption. FEMS Microbiol Lett 257: 106–111. 2006.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA / Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. SIDRA. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso: 10 set. 2014.

JANK, M. S.; FARINA, E. M. Q.; GALAN, V. B. O agribusiness do leite. São Paulo: Milkbizz, 1999. 108 p.

LAGO, N. C. M. R. Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite e estudo enterotoxigênico das cepas isoladas. 2002. 83f. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária - Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva. Jaboticabal, 2002.

LISITA, M. O. Influência da variação da temperatura de armazenamento de leite cru na vida de prateleira de leite UHT em embalagem flexível e estocagem sob luz. 2010. 151f. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em

Tecnologia de Alimentos. Campinas, 2010.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES, C. Y. T.; ROITMAN, F. B.; LYRA, D. D. Produção Leiteira no Brasil. Inovação na indústria de alimentos: importância e dinâmica no complexo agroindustrial brasileiro. BNDES Setorial 37, p. 371-398. 2013.

MEER, R.R.; BAKER. J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M.W. (1991). Psychrotrophic Bacillus spp in fluid milk products: a review. Journal of Food Protection. v.54, n.12, p.969- 979

MILK POINT. Disponível em <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/comercio-internacional/usda-preve-mais-leite-em-2014-mas-precos-maiores-tambem-87618n.aspx>. Acesso: Novembro, 2014.

MILLER, F. A.; GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. A Microbiologia Preditiva como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares. Boletim de Biotecnologia: Avanços e Aplicações – Alimentar, n. 78, set. 2004. Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa.

NEUMEYER, K. et al. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 55-63, 1997.

OLIVEIRA, M. C. Embalagem de alimentos: Unidade IV, Sistemas de acondicionamento asséptico de alimentos. Ciência e tecnologia de laticínios, UEMG. FRUTAL, Minas Gerais. 2014.

OLIVEIRA, C. A. F. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: Germano P.M.L. & Germano M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 3ª ed. Editora Varela, São Paulo, 115 - 129. 2008.

ORDÓNEZ J.A. 2005. Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. v.2. Editora Artmed, Porto Alegre, p.279.

PESSOA, M. C. F.; S. A. Prevalência de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus thuringiensis* e métodos para sua caracterização genotípica: revisão. *Scientia Amazonia*, v. 3, n.2, 47-64, 2014.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. B. Processamento de Leite. Pernambuco: UFRPE/CODAI, 2012. 171p.

SCHIAVI, S. Gestão da qualidade em laticínios: um estudo multicaso e propostas para melhoria. Universidade Federal de São Carlos: UFSCAR, São Paulo. 19p.

SHIMONI, E. e LABUZA, T. P. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 394-402, 2000.

SPEROTTO, P. Viabilidade dos Contratos de integração na Cadeia Produtiva do leite na Região Noroeste do Rio Grande do Sul. Dissertação (Graduação em Ciências Econômicas). Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS. Ijuí, RS, 2012.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 137-159, 2004. PMID:15193801.

TETRAPAK. Embalagens Assépticas. Disponível em <<http://www.tetrapak.com/br/embalagens/embalagens-assepticas>>. Acesso: Novembro, 2014.

TRENNEPOHL, D. Avaliação de potencialidades econômicas para o desenvolvimento regional. Ijuí, RS: Ed. Unijuí, 2011.

ZHOU, G.; LIU, H.; HE, J.; YUAN, Y.; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, p. 195–200, 2008.

WILCKS, A.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; LICHT, T. R. Persistence of

Bacillus thuringiensis bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. FEMS Immunol Med Microbiol, v. 48, p. 410–418, 2006.

WHITING, R. C., BUCHANAN, R.L. (1994) Microbial Modeling. A scientific status summary by the Institute of Food Technologists. *Food Technology* 48(6): 113-120.