

• Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na Capital do Estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988.

- *Occurrence and levels of Bacillus cereus in powder milk marketed in the city of São Paulo (SP), Brazil -1987/1988*

*Rua: Bela Flor, 67 – apto. 12
Vila Mariana – São Paulo – SP
CEP: 04128-050 – São Paulo – SP.

* Vera Regina Monteiro de Barros¹ - CRMV-SP - nº 0838

José César Panetta² - CRMV-SP - nº 0013

Omar Miguel³ - CRMV-SP - nº 0035

¹ Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento / SP.

² Prof. Titular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP.

³ Prof. Titular da UNIBAN/SP.

RESUMO

O leite em pó, ainda que considerado um alimento com baixos níveis de contaminação, pode conter esporos bacterianos como o do *Bacillus cereus*. Se após sua reconstituição, o leite for mantido armazenado em condições inadequadas de temperatura, os esporos, quando presentes, podem germinar e multiplicar-se podendo causar toxiinfecção alimentar nos consumidores. Com a finalidade de isolar e quantificar os microrganismos da espécie *B. cereus* no leite em pó integral, estudou-se 72 amostras do produto, reconstituído em sua forma líquida, provenientes do comércio da Capital de São Paulo, nos anos de 1987 e 1988. Estudou-se também o comportamento de 36 dessas amostras em relação a contagem de *B. cereus*, quando a amostra reconstituída era mantida em armazenamento inadequado, em temperatura de 20°C por 24 horas. Das 72 amostras estudadas, 2 apresentaram resultados acima dos padrões do Ministério da Saúde do Brasil (1987). 91,67% das amostras armazenadas em temperatura inadequada (20 °C / 24 horas) apresentaram níveis de contaminação acima dos permitidos pela legislação. Os resultados obtidos das análises permitem-nos afirmar que 97,22% do leite em pó integral analisado, apresentava-se em condições adequadas para o consumo. Entretanto, pode-se concluir que quando o leite foi armazenado em condições inadequadas, 91,67% das amostras foram consideradas potencialmente capazes de provocarem intoxicação alimentar, devido aos níveis elevados *B. cereus*.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, leite em pó.

Introdução

Dentre os processos destinados à conservação do leite, destacam-se os que se valem do aquecimento e da dessecação extrema, transformando-o em leite em pó.

Em termos de preservação de alimentos, esse processo vem sendo largamente utilizado e, como consequência, uma série de estudos, sob o ponto de vista bacteriológico, têm sido realizados para avaliar os efeitos desse processo sobre a microbiota contaminante (DELAZARI *et al.*, 1978).

Do ponto de vista microbiológico, o leite em pó, quando comparado aos alimentos protéicos, pode ser considerado como um produto que contém baixa contaminação. Pode, porém ocorrer, no produto a presença de bactérias na forma esporulada, como as pertencentes ao gênero *Bacillus*. Este gênero, por sua característica de formar esporos, evolui, ao encontrar condições favoráveis de temperatura e umidade, para a forma vegetativa, momento em que, na dependência do número de microorganismos proliferados, pode representar risco à saúde pública, determinando quadro clínico de toxinfecções alimentares (HARMON e GOEPFERT, 1984).

Atualmente, o *Bacillus cereus* tem sido responsabilizado como agente capaz de promover surtos de toxinfecções alimentares de maior gravidade, principalmente em indivíduos de baixa faixa etária (ICMSF 1983).

Esse fato despertou nossa preocupação em investigar, no leite em pó normalmente comercializado na capital do Estado de São Paulo, a presença desse agente, bem como sua ocorrência, após a reconstituição na forma líquida e após armazenagem em temperatura ambiente inadequada.

Segundo HARMON e GOEPFERT (1984), o *Bacillus cereus* encontra-se classificado no Grupo I, em virtude das características de seu corpo vegetativo não se apresentar aumentado pelo endosporo, por apresentar esse endosporo morfologia elipsoidal subterminal ou terminal e ainda por ser considerado como um grande bacilo, com células vegetativas de diâmetro maiores ou iguais a 0,9µm. A espécie *Bacillus cereus* encontrada nos alimentos tem sido relatada por diversos pesquisadores no mundo (KIM e GOEPFERT, 1971a; MACHADO, 1975; CORRY *et al.*, 1982; ICMSF, 1983; HARMON e GOEPFERT, 1984).

No leite existem inúmeras observações de presença de *Bacillus cereus* tanto no leite sob a forma *in natura* em animais sadios, como naqueles provenientes de vacas acometidas por mastite.

O *Bacillus cereus* tem sido responsabilizado por alterações apresentadas em produtos lácteos, tal como o

amargor do creme e a coagulação doce no leite pasteurizado.

Os relatos responsabilizando o *B. cereus* como agente causador de toxinfecção alimentar no homem datam de 1947, ocasião em que Plazikowski concluiu que os surtos de toxinfecções ocorridos em Copenhague haviam sido causados pelo *Bacillus cereus*, assim como os estudos realizados por HAUGE (1955), em pacientes acometidos por gastroenterite, demonstraram que a origem da contaminação com o *B. cereus* foi a ingestão de creme de baunilha.

MOSSEL e MORENO GARCIA (1985) consideram o *B. cereus* genericamente, como um agente de periculosidade moderada e difusão limitada, sendo necessário um grande número de células para causar enfermidade, ou seja, da ordem de 10⁷ ufc/g ou ml, para provocar o surgimento dos sintomas da doença.

Clinicamente são descritas duas formas características de intoxicação alimentar por *B. cereus*. Uma delas denominada forma clássica (forma diarréica), com período de incubação de 8 a 6 horas, mais comumente de 12 a 13 horas, cujos principais sintomas são náuseas, dores abdominais intermitentes e defecação aquosa, geralmente não ocorre febre ou vômito. A outra forma descrita é a emética, como relatam MOSSEL e MORENO GARCIA (1985), cujos sintomas são náuseas com vômitos agudos, seguidos de diarreia leve.

Dos inquéritos epidemiológicos realizados, observou-se como principais responsáveis pela forma clássica, alimentos que continham amido de milho, purê de batatas, verduras, carne picada, salsichas de fígado, arroz indonésio e sopas (GILBERT e PARRY, 1977). A forma emética foi causada principalmente por ingestão de arroz fervido ou frito, massa para pastel indonésio (MOSSEL e MORENO GARCIA, 1985). O leite em pó desnatado, maltado, foi incriminado em surtos eméticos no Canadá (JOHNSON, 1984). HOLMES *et al.* (1981) relatam a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar emética, onde 13 pessoas, após a ingestão de macarrão preparado com leite em pó integral, apresentaram, decorridas 2 horas da ingestão, sintomas tais como tontura, dores abdominais, vômitos e diarreia suave. A análise do leite em pó demonstrou a presença de endósporos de *B. cereus*.

O fato de o *B. cereus* ser uma bactéria ubiqüitária, a habilidade dos endósporos de sobreviver por longo tempo em produtos dessecados e estocados, bem como sua termorresistência, permite que o microorganismo esteja presente em uma variedade de alimentos, os quais podem ser eventualmente veículos de intoxicações alimentares por essa bactéria.

JOHNSON (1984) recomenda que, uma vez determinada a presença de *B. cereus* no leite em pó, devam ser tomadas medidas para prevenir-lhes o desenvolvimento, durante e depois de sua reconstituição na forma líquida.

Material e Métodos Amostragem

Foram avaliadas 4 marcas de leite em pó comercializadas na capital do Estado de São Paulo, que representavam 98% do mercado consumidor dessa apresentação de leite.

Essas marcas foram codificadas como A, B, C e D, e utilizou-se para o cálculo de amostragem a distribuição dos eventos casuais de Poisson (MIGUEL, 1982), com 95% de confiança de obter-se pelo menos um resultado positivo.

Para maior precisão da amostragem, foram realizadas análises de duas partidas das produções de cada marca. Assim, no estudo, totalizou-se avaliação de 18 amostras por marca, resultando em 72 análises de leite em pó integral.

As amostras foram adquiridas diretamente do mercado varejista, escolhidos por sorteio nas diferentes zonas geográficas da capital do Estado de São Paulo.

Preparo do leite reconstituído

Após assepsia na embalagem do leite em pó, pesou-se, mantendo-se sempre as condições assépticas, 25 g do produto, que era liqüefeito convenientemente adicionando-se uma solução de água peptonada esterilizada, até totalizar um volume de 225 ml, (ICMSF, 1983). Do leite em pó reconstituído foi imediatamente colhida uma amostra para proceder-se o isolamento e a quantificação do *B. cereus*, sendo o restante armazenado em refrigerador a temperatura de 20°C (+/- 1°C), durante 24 horas. O objetivo da estocagem foi o de avaliar os efeitos da estocagem sob temperatura inadequada quanto a multiplicação do *B. cereus*.



Figura 1. Colônias de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* isolados, em meio ágar plimixina-gema de ovo vermelho fenol.



Figura 2. Fotomicrografia de esfregaço em lâmina de microscopia, do *Bacillus* isolado, corado pelo método de Gram (aumento 1250X).



Figura 3. Fotomicrografia de esfregaço em lâmina de microscopia, do *Bacillus* isolado, corado pelo método de Wirtz-Conklum, para evidenciação de esporos (aumento de 1250X).

Tabela 1. Resultados de análises efetuadas no leite em pó imediatamente após a reconstituição (Contagem de *Bacillus cereus* (ufc/ml) nas 4 marcas estudadas).

TIPO DE OBSERVAÇÃO	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D
Número de amostras	18	18	18	18
Número de amostras positivas para <i>B. cereus</i>	3%	4%	1%	12%
Número de amostra com contagem acima do regulamentar	1%	1%	zero	1%

Tabela 2. Resultado de análises efetuadas no Leite em pó após estocarem por 24 horas a 21° C (Contagem de *Bacillus cereus* (ufc/ml) nas 4 marcas estudadas).

TIPO DE OBSERVAÇÃO	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D
Número de amostras	9	9	9	9
Número de amostras positivas para <i>B. cereus</i>	9(100%)	9(100%)	6(67%)	9(100%)
Número de amostra com contagem acima do regulamentar	9(100%)	9(100%)	6(67%)	9(100%)

Técnica

Foram utilizadas para isolamento e identificação do *Bacillus cereus* as técnicas preconizadas por KIM e GOEPFERT (1971b), CAMPOS (1980) e ICMSF (1983).

A partir da identificação das culturas em ágar-simples inclinado, foram efetuadas 2 lâminas para microscopia e coradas; uma, pelo método de Gram, para a observação da morfologia microscópica e, a outra, pela coloração de Wirtz Conklin, para a observação da forma e coloração dos esporos (Figuras 1, 2 e 3).

A identificação posterior foi bioquímica, tendo sido realizadas provas para catalase, Voges-Proskauer, desaminação de fenilalanina, redução de nitrato, produção de ácidos pela fermentação de açúcares, hidrólise do amido e da caseína, utilização de citrato de Koser como fonte única de carbono, crescimento em anaerobiose, crescimento em 7% de cloreto de sódio, prova de motilidade, prova do crescimento em hidrato de cloral, crescimento em meio de cultura pH 7,0 (GORDON *et al.*, 1973; BIER, 1984).

Resultados

As análises, cujos resultados são apresentados a seguir, são fruto de observações efetuadas nos anos de 1987 e 1988. A atual publicação enseja subsídios para uma comparação com as condições tecnológicas atuais.

O leite em pó das quatro marcas estudadas apresentaram presença do *B. cereus*, conforme podemos observar nas Tabelas 1 e 2.

Discussão

Face à atual legislação brasileira, que regulamenta em 103 ufc/ml de *B. cereus* os níveis máximos permitidos em leite em pó, pode-se observar que das 72 amostras estudadas, logo após sua reconstituição, em 2 (2,78 %) foram observados níveis acima dos padrões legais vigentes.

A contagem de *B. cereus* nas 2 amostras citadas é considerada baixa, conforme observa-se na Tabela 1. Analisando-se essa tabela, pode-se notar que das 18 amostras estudadas de cada marca, 52 (72,2 %) apresentaram resultados negativos. Importante salientar que esse resultado poderia ser positivo se fosse utilizado um meio de enriquecimento.

Os resultados que foram obtidos são semelhantes aos relatados por KIM e GOEPFERT (1971b) e por JOHNSON *et al.* (1982) que, ao pesquisar a presença de *B. cereus* no leite em pó, encontraram números semelhantes aos encontrados no presente estudo.

A presença de *B. cereus* em alimentos pode não ter incisivo significado como agente de intoxicação alimentar, a menos que encontre condições adequadas para multiplicar-se, atingindo níveis para provocar o surgimento de sintomas dessa doença (ICMSF, 1983).

Assim, um produto, considerado inofensivo por apresentar números baixos de *B. cereus*, pode tornar-se perigoso quando mantido, por algum tempo, em condições que permitam a sua multiplicação (JENNINGS, 1975).

A afirmação acima pode ser demonstrada no presente estudo, analisando-se a Tabela 2 que apresenta os

resultados do mesmo produto tanto após sua reconstituição quanto após armazenagem inadequada a 20° C por 24 horas.

Note-se que, após a armazenagem, todas as amostras das marcas A, B e D apresentaram níveis superiores a 105 ufc/ml, enquanto que, na marca C, os níveis foram superiores a 106 ufc/ml.

Esses dados evidenciam a presença de *B. cereus* no leite em pó, mesmo quando não detectado pela metodologia de contagem de placas.

Segundo GILBERT e PARRY (1977), os alimentos que contêm mais do que 105 ufc/ml de *B. cereus*, oferecem risco ao consumidor de contrair toxinfecção alimentar. Nesse caso, deve-se ressaltar que, na presente investigação, quando se analisou o leite armazenado, 33 (91,67 %) amostras apresentaram valores acima de 105 ufc/g, número que pode ser considerado relevante, sob o ponto de vista epidemiológico.

RODRIGUEZ e BARRET (1986), trabalhando com leite em pó reconstituído e estocado a 30°, 20° e 5°, verificaram que, na temperatura entre 20 e 30° C, a população de *B. cereus* atingia níveis de risco à saúde pública, dez horas após a reconstituição, sem que o produto apresentasse qualquer alteração evidente.

No presente estudo, 82 % das amostras armazenadas inadequadamente mantiveram o aspecto normal,

não demonstrando sinais de alterações, apesar de já apresentarem números elevados da bactéria em estudo.

Segundo MOSSEL e GARCIA MORENO (1985), a segurança do leite em pó reconstituído depende da temperatura de estocagem, uma vez que essa temperatura afeta não só a multiplicação bacteriana como também a competição da microbiota presente.

Na Tabela 3, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos para as nove primeiras amostras analisadas após a reconstituição e os números obtidos após a estocagem à temperatura de 20° C por 24 horas. Nesta tabela, notamos que os números encontrados após o armazenamento inadequado são da ordem de 105 a 107 ufc/ml, o que se identifica muito bem com os princípios sobejamente conhecidos de que a temperatura na qual o produto fica exposto é fundamental à segurança e vida útil do alimento.

Sabemos pela recomendação dos fabricantes e pela própria legislação brasileira de 1952 (BRASIL - 1987), que o leite em pó deve ser consumido somente dentro do prazo de validade, proveniente de embalagens íntegras e imediatamente após a reconstituição. Porém, tem-se conhecimento do hábito comum entre a população em preparar o produto para consumo, mantido, algumas vezes, por tempo superior a 48 horas. Tendo em vista as altas temperaturas médias do nosso País, esse procedimento

Tabela 3. Comparação entre os resultados da análise de 4 marcas distintas de leite em pó integral, segundo o número de *B. cereus*, logo após a sua reconstituição e após armazenagem a 20° C por 24 horas, São Paulo, Brasil - 1987 - 1988.

Amostra	A		B		C		D	
	I	II	I	II	I	II	I	II
	ufc/g		ufc/g		ufc/g		ufc/g	
1	-	2,3x10 ⁸	-	2,5x10 ⁷	-	3,0x10 ⁵	-	2,4x10 ⁶
2	-	2,0x10 ⁸	4,0x10 ²	5,0x10 ⁸	-	3,0x10 ⁷	1,5x10 ²	3,0x10 ⁸
3	-	3,0x10 ⁸		4,2x10 ⁸	-	1,5x10 ⁸	-	2,0x10 ⁷
4	-	1,4x10 ⁸	2,0x10 ²	4,3x10 ⁸	-	1,1x10 ⁸	9,5x10 ²	1,6x10 ⁸
5	-	3,5x10 ⁸		7,0x10 ⁸	-	3,0x10 ¹	3,5x10 ²	5,0x10 ⁸
6	-	1,8x10 ⁸		7,5x10 ⁸	-	6,5x10 ⁷	3,0x10 ²	8,0x10 ⁸
7	-	8,0x10 ⁷		7,5x10 ⁸	-	3,0x10 ⁶	-	4,0x10 ⁸
8	-	2,5x10 ⁸		2,4x10 ⁸	3,0x10 ²	3,0x10 ¹	-	5,0x10 ⁸
9	-	8,0x10 ⁸		5,0x10 ⁸	-	3,0x10 ¹	-	5,0x10 ⁸

A, B, C e D - Marcas -de fantasia do leite analisado

Leite em pó integral reconstituído

Leite em pó integral reconstituído e incubado por 24 horas a 20° C

poderá ser perigoso ao consumidor, que corre o risco de contrair toxiinfecção por *B. cereus*, como ficou demonstrado no presente trabalho.

Conclusões

- 1 - Das 72 amostras de leite em pó integral colhidas na Capital do Estado de São Paulo durante os anos de 1987 e 1988, reconstituídas e analisadas quanto à presença e quantificação de *B. cereus*, 97,20% apresentaram contagens de bactérias abaixo dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde e, portanto, podendo ser consideradas aptas para o consumo.
- 2 - Para as 36 amostras de leite em pó integral reconstituído e armazenado à temperatura de 20 °C por 24 horas, 33 (91,67%) apresentaram valores superiores a 105 ufc/ml, podendo ser consideradas como potencialmente capazes de provocar intoxicação alimentar.
- 3 - Das amostras de leite em pó reconstituído que se apresentaram negativas para o *B. cereus*, 52 (72,22%) podem ser consideradas como potencialmente capazes de provocar doença de origem alimentar, caso sejam manipuladas e estocadas em condições inadequadas.

SUMMARY

Although usually considered as a food with low contamination levels, powder milk can present bacterial spores such as *Bacillus cereus*. If the milk is reconstituted and maintained under inadequate temperatures, spores can germinate and the resulting bacterial contamination can cause to food borne infections. To isolate and quantify organisms of the *Bacillus cereus* species in whole milk powder, 72 samples of the product were collected in stores located in the city of São Paulo in 1987 and 1988. After being reconstituted, 32 of these samples were maintained under inadequate storage temperatures (20° C for 24 hours) to determine the *B. cereus* counts. Two of the 72 samples of the study had results above the standards established by the Brazilian Ministry of Health (1987). The samples stored under inadequate temperatures showed levels 91.6% higher than the standards. From the viewpoint of *B. cereus* presence, the results obtained show that 97.22% of the samples of this study were adequate for consumption. However, 91.67% of the samples could potentially result in food borne infections due to the high *B. cereus* levels detected after the storage conditions used in this study.

Key words: *Bacillus cereus*, powder milk.

REFERÊNCIAS

1. BIER, O. **Microbiologia e imunologia**, 23 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1231 p.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria 001**, de 20 de janeiro de 1987.
3. CAMPOS, M.L.C. **Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens e bactérias do gênero Salmonella em carne moída, vendida no Município de São Paulo (1976/1977)**. 1980. 117 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
4. CORRY, J. E. L.; ROBERTS, O.; SKINNER, F. A. **Isolation and identification methods for food poisoning organisms**. London: Academic Press, 1982. (The Society for Applied Bacteriology, Technical Series, n.17).
5. DELAZARI, I.; LEITÃO, M. F. F.; GERALDINI, A. M.; EIROA, M. N. U. **Bacillus cereus em alimentos desidratados. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n. 60, p. 31-40, 1978.
6. GILBERT, R. J.; PARRY, J. U. Serotypes of *Bacillus cereus* from out break of food poisoning and from routine foods. **Journal of Hygiene**, n. 78, p. 69-74, 1977.
7. GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; HORY NAY PANG, C. **The genus Bacillus**. Washington, Agriculture Research Service, Uni-

- ted States Department of Agriculture: (Agriculture handbook, 427), 1973.
8. HARMON, S. M.; GOEPFERT, J. M. *Bacillus cereus*. In: MARVIN, LS ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association. Cap. 25, 1984. P. 458-501.
 9. HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic sporeforming Bacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 3, p. 591-5, 1955.
 10. HOLMES, J. R.; PLUNKETT, T.; PATE, P.; ROPER, W. L.; ALEXANDER, J. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Archives of Internal Medicine**, n. 141, p. 766-7, 1981.
 11. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**. 1. Técnicas de análisis microbiológicas, 2.ed., Zaragoza: Acribia, 1983. 431 p.
 12. JENNINGS, W. E. Food borne illness. In: LIBBY, JA **Meat hygiene**, 4.ed. Philadelphia: Lea Febriger. p. 261-95, 1975.
 13. JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Germination and heat. Resistance of *Bacillus cereus* spores from strain associated with diarrheal and emetic food - borne illnesses. **Journal of Food Science**, n. 47, p. 1268-71, 1982.
 14. JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness: an update. **Journal of Food Protection**, n. 47, p. 145-53, 1984.
 15. KIM, H. U.; GOEPFERT, J. M. Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. **Journal of Milk and Food Technology**, n. 34, p. 12-15, 1971a.
 16. KIM, H. U.; GOEPFERT, J. M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, n. 22, p. 581-587, 1971 b.
 17. MACHADO, E. S. **Flora dominante do leite cru e pasteurizado**. 1975. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 18. MIGUEL, O. Técnicas de amostragem para exames laboratoriais. **Revista Higiene Alimentar**, n. 1. p. 84-6. 1982.
 19. MOSSEL, D. A. A.; MORENO GARCIA, B. M. **Microbiología de los alimentos**, Zaragoza: Acribia, 1985.
 20. RODRIGUEZ, M.H.; BARRET, E. L. Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. **Journal of Food Protection**, n. 49, p. 680-6, 1986.

