

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROORGANISMOS ESPOROGÊNICOS EM PRODUTOS
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÉRMICO POR ULTRA-
ALTA TEMPERATURA: LEITE DE CABRA, ALIMENTO COM
SOJA E BEBIDA DE LEITE DE CABRA E SOJA**

**Taís Ramalho dos Anjos
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROORGANISMOS ESPOROGÊNICOS EM PRODUTOS
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÉRMICO POR ULTRA-
ALTA TEMPERATURA: LEITE DE CABRA, ALIMENTO COM
SOJA E BEBIDA DE LEITE DE CABRA E SOJA**

Taís Ramalho dos Anjos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva

2017

Anjos, Taís Ramalho dos
A599m Microrganismos esporogênicos em produtos submetidos ao
tratamento térmico por ultra-alta temperatura : leite de cabra, alimento
com soja e bebida de leite de cabra e soja / Taís Ramalho dos Anjos.
-- Jaboticabal, 2017
ix, 78 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Ana Maria Centola Vidal
Banca examinadora: Andréia Cristina Nakashima Vaz, Karina Paes
Bürger
Bibliografia

1. *Bacillus cereus*. 2. *Clostridium perfringens*. 3. Esporos. 4.
Fatores de virulência. 5. Produtos UAT I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.3:637.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

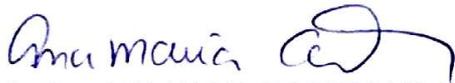
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MICRORGANISMOS ESPOROGÊNICOS EM PRODUTOS
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÉRMICO POR ULTRA - ALTA
TEMPERATURA: LEITE DE CABRA, ALIMENTO COM SOJA E
BEBIDA DE LEITE DE CABRA E SOJA

AUTORA: TAÍS RAMALHO DOS ANJOS

ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



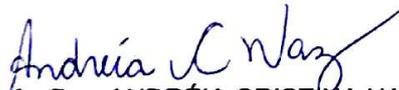
Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP



Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV/UNESP/Jaboticabal



Profa. Dra. ANDRÉIA CRISTINA NAKASHIMA VAZ

Departamento de Medicina Veterinária / FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 18 de abril de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TAÍS RAMALHO DOS ANJOS - Nascida no dia 07 de abril de 1989, na cidade de Alta Floresta, Estado de Mato Grosso. Iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária, em 2008, na Universidade Federal do Mato Grosso/UFMT, Câmpus de Sinop - MT, concluindo em 2013. Durante a graduação participou de treinamentos em diagnóstico microbiológico veterinário e projetos de pesquisa na área de microbiologia dos produtos de origem animal, nos anos de 2010 e 2011. Realizou o estágio supervisionado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Viçosa/UFV - MG, no ano de 2013. Após a graduação, participou dos projetos de pesquisa e da rotina diária do Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da FZEA/USP, Câmpus Pirassununga - SP, ano de 2014. Durante a pós-graduação (mestrado), além do projeto de pesquisa proposto, participou e apresentou trabalhos em Simpósios sobre a qualidade do leite e outros eventos. Participou de intercâmbio nacional na Universidade Federal de Viçosa/UFV - MG, executando uma parte do projeto de mestrado.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus. “Pois me alegraste, SENHOR, com os teus feitos; exultarei nas obras das tuas mãos. Quão grandes, SENHOR, são as tuas obras! Os teus pensamentos, que profundos! O inepto não compreende, e o estulto não percebe isto (Salmo 92:4-6).

Aos meus pais, Luiz Tadeu e Maria Inês, que doaram suas vidas e muitas vezes renunciaram seus sonhos para que pudesse realizar o meu. Essa conquista é nossa. Obrigado pelo apoio, ensino e dedicação que sempre ofereceram a mim. Meu muitíssimo obrigado, amo vocês.

Ao meu esposo, Walenton, pelo amor, compreensão pela minha ausência durante esta jornada, pelo respeito, apoio e incentivo. Obrigado por dividir comigo os momentos de sofrimento e também de alegrias. Te amo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a capacidade de iniciar e concluir este trabalho, pois minha suficiência vem Dele, como diz um versículo: “não que, por nós mesmos, sejamos capazes de pensar alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário à nossa suficiência vem de Deus ” (2 Coríntios 3:5).

A minha família, Maria Inês Ramalho dos Anjos (mãe) e Luís Tadeu dos Anjos (pai), pelo apoio e incentivo, principalmente da minha mãe que sempre me orientou a continuar os estudos não olhar para os obstáculos e nunca desistir.

Ao meu esposo Walenton Gonçalves de Paula, sempre com uma palavra de incentivo, carinho e paciência por causa da distância.

Aos amigos e irmãos em Cristo Jesus, pelas orações incessantes, principalmente Rita de Cássia Ribeiro Nunes de Oliveira por me hospedar durante toda a pós-graduação, amiga para todas as horas.

A Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal, pela oportunidade, confiança, pela sua orientação, dedicação, paciência e conhecimentos oferecidos a mim. Obrigado também por compartilhar muito da sua experiência pessoal e profissional, em relação aos estudos e família.

A todos que auxiliaram na execução do projeto de pesquisa, os estagiários e a técnica do laboratório Andréa Cristina Nakashima Vaz.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores: Luís Antonio Mathias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - UNESP, obrigado pela contribuição na estatística deste trabalho e sugestões. Ao Ruben Pablo Schocken-Iturrino, do Departamento de Patologia Veterinária - UNESP, por disponibilizar o laboratório para execução de parte deste trabalho e pelas suas contribuições científicas. Ao Luís Augusto Nero, do Departamento da Veterinária - UFV, por me receber e ceder o laboratório para execução de parte deste trabalho.

Aos pós-graduandos: Valéria Quintana Cavicchioli, por oferecer seu conhecimento e auxílio neste trabalho entre outras contribuições pessoais, Maria

Emilene Campos-Galvão e Svetoslav Dimitrov Todorov, obrigado a todos pela ajuda especial que cada um ofereceu.

Agradecimento à seção de pós-graduação da FCAV - UNESP.

Enfim a todos que de alguma forma cooperaram, obrigado, pois: "Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe." (Clarice Lispector).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Leite de cabra.....	12
2.2 Alimento com soja.....	17
2.3 Bebida de leite de cabra e soja.....	20
2.4 Características dos microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i>	22
2.5 Características do <i>Clostridium perfringens</i>	27
2.6 Características do tratamento por ultra-alta temperatura (UAT/UHT)..	29
2.7 Relação entre os microrganismos esporulados e os produtos UAT.....	31
3 OBJETIVOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Colheita das amostras.....	34
4.2 Análises microbiológicas.....	34
4.2.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos.	34
4.2.2 Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de bactérias do grupo <i>Bacillus cereus</i>	35
4.2.3 Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	36
4.4 Identificação genética dos isolados característicos do grupo do <i>B.</i> <i>cereus</i>	37
4.4.1 Extração de DNA.....	38
4.4.2 Identificação genética de bactérias do grupo do <i>B. cereus</i> usando a amplificação dos genes 16s rRNA.....	39

4.4.3 Identificação dos fatores de virulência dos isolados de bactérias do grupo do <i>B. cereus</i>	39
4.3 Análises estatísticas.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	63
8 IMPLICAÇÕES.....	78

MICROORGANISMOS ESPOROGÊNICOS EM PRODUTOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÉRMICO POR ULTRA-ALTA TEMPERATURA: LEITE DE CABRA, ALIMENTO COM SOJA E BEBIDA DE LEITE DE CABRA E SOJA

RESUMO - O tratamento térmico por UAT elimina formas vegetativas dos microrganismos, porém, formas esporuladas altamente resistentes ao calor podem permanecer nos produtos e após a germinação dos esporos são capazes de liberar toxinas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). No presente estudo, objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica de produtos tratados por UAT, por meio da contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, isolamento e contagem de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* e de *Clostridium perfringens*, comparar lotes dos três produtos quanto a tais microrganismos, identificar a espécie dos isolados e a presença dos fatores de virulência de bactérias do grupo do *B. cereus*. Para isso, foram obtidas 75 amostras, sendo 25 de cada produto (de leite de cabra UAT, alimento com soja UAT e bebida de leite de cabra e soja UAT), de 5 diferentes lotes, no comércio do interior do Estado de São Paulo. Os resultados evidenciaram possíveis falhas de processamento e utilização de matéria-prima inadequada, uma vez que altas populações ($>10^4$ UFC/mL) de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos foram verificadas em 100% dos lotes de alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja e 80% dos lotes de leite de cabra. Microrganismos do grupo do *B. cereus* foram isolados de 80% dos lotes de alimento com soja, e 60% dos lotes de bebida de leite de cabra e soja e leite de cabra, com populações superiores a 10^{18} UFC/mL. *C. perfringens* foi isolado de 20% dos lotes de alimento com soja, com populações superiores a 10^3 UFC/mL. Na comparação entre os lotes, a data de validade não influenciou nas populações dos microrganismos analisados. Dos isolados de bactérias do grupo do *B. cereus*, 100% (29/29) apresentaram amplificação para o gene do complexo *hbl*, 96,5% (28/29) para o gene do complexo *nhe* e 75,8% (22/29) para o gene *bceT*. Tais resultados devem servir de alerta às autoridades sanitárias, pois leite de cabra e produtos à base de soja são normalmente consumidos por crianças e alérgicos, e o leite de cabra adicionado de soja apresentou maiores cargas de microrganismos patogênicos potencialmente causadores de intoxicações alimentares.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, esporos, fatores de virulência, produtos UAT.

SPOROGENIC MICROORGANISMS ON PRODUCTS UNDERGOING ULTRA-HIGH TEMPERATURE TREATMENT: GOAT MILK, SOY FOOD, AND GOAT AND SOY MILK DRINKS

ABSTRACT - Heat treatment by UHT (ultra-high temperature) eliminates the vegetative forms of microorganisms, however, sporulated forms highly resistant to heat can remain in the products and following spore germination are capable of releasing toxins that cause foodborne diseases (FD's). The objective of this study is to evaluate the microbiological quality of products submitted to UHT, namely goat milk, soy food, and goat and soy milk drinks, by the counting of heterotrophic aerobic mesophilic microorganisms, the isolation and counting of bacteria from the *Bacillus cereus* groups and *Clostridium perfringens*, comparing batches of the three products for such microorganisms, to identify the species of the isolated and the presence of the virulence factors of bacteria of the *B. cereus* group. For this, 75 samples were obtained, 25 of each product (from UAT goat milk, food with UAT soy and drink from goat milk and UAT soy) from 5 different lots, in the interior trade of the State of São Paulo. The results demonstrated possible failures in the processing and use of inadequate raw material since high population ($>10^4$) of heterotrophic aerobic mesophilic microorganisms were found in 100% of the lots of soy food and goat and soy milk drinks and 80% of the lots of goat milk. Microorganisms from the *B. cereus* group were isolated from 80% of the lots of soy food and 60% of the lots of goat and soy milk drinks, with population above 10^{18} . The *C. perfringens* microorganisms were isolated from 20% of the soy food lots, with population above 10^3 . In the comparison between the lots, the expiration date did not influence the population of the analyzed microorganisms, therefore, they were conveyed by the raw material used. Of the *B. cereus* isolated, 100% (29/29) showed amplification for the *hbl* complex gene, 96,5% (28/29) for the *nhe* complex gene and 75,8% (22/29) for the *bceT* gene. These results should serve as a warning to the health authorities because goat milk and soy-based products are generally consumed by children and individuals with allergies and goat milk added to soy was capable of carrying even higher doses of pathogenic microorganisms that may potentially cause food poisoning.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, products UHT, spore, virulence factors,

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavra/Termos	Abreviatura
Ágar Manitol- Gema de Ovo- Polimixina B.....	MYP
Ágar Padrão para Contagem.....	PCA
Ágar Triptose Sulfito Cicloserina.....	TSC
Agência Nacional de Vigilância Sanitária.....	ANVISA
<i>Bacillus cereus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Bacillus cereus</i> enterotoxin T.....	BCET
<i>Brain Heart Infusion</i>	BHI
Caldo Triptona de Soja.....	TSB
<i>Center for Disease Control</i>	CDC
Citotoxina K.....	CYTK
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>
Doenças Transmitidas por Alimentos.....	DTAs
Eterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>	CPE
Enterotoxina não-hemolítica.....	NHE
Extrato Seco Total.....	EST
Hemolisina BL.....	HBL
<i>Highly Heat Resistente Spores</i>	HHRS
Imunoglobulina E.....	IGE
<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> ...	I.C.M.S F
Instrução Normativa.....	IN
<i>National Center for Biotechnology Information</i>	NCBI
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	MAPA
Perigos de Pontos Críticos de Controle.....	PPCs
Reação em Cadeia da Polimerase.....	PCR
Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade.....	RTIQ
Resolução da Diretoria Colegiada.....	RDC
Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura.....	S.D.A/MA
Trato Gastrointestinal.....	TGI
Ultra-alta Temperatura.....	UAT

<i>Ultra-high Temperature</i>	UHT
Unidades Formadoras de Colônias.....	UFC

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição básica do leite de cabra, ovelha, vaca e humano.....	13
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos leites de cabra e vaca.....	14
Tabela 3. Composição química do leite e alimento com soja.....	19
Tabela 4. Informações nutricionais da bebida de leite de cabra e soja UAT.....	21
Tabela 5. Características das espécies do grupo do <i>Bacillus cereus</i>	23
Tabela 6. Características dos tipos de doenças causadas por <i>Bacillus cereus</i>	24
Tabela 7. Classificação de <i>Clostridium perfringens</i> baseada na produção de toxinas.....	28
Tabela 8. Características dos primers usados neste estudo.....	40
Tabela 9. Características de cepas causadoras de intoxicações alimentares..	53
Tabela 10. Resultado do perfil genético dos isolados positivos para os genes de virulência produtores de enterotoxinas, dos 29 isolados de bactéria do grupo do <i>B. cereus</i> em produtos tratados por UAT. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura do operon hbl. O operon inclui três proteínas do hbl: L2 proteína codificada por hblC, L1, proteína do hblD, e a proteína B pelo hblA e proteína B' pelo hblB.....	26
Figura 2. Característica das colônias (A) e coloração dos bastonetes Gram-positivos (B) de bactérias do grupo do <i>B. cereus</i> isolado de produtos UAT.....	36
Figura 3. Característica das colônias (A e B) e coloração dos bastonetes Gram-positivos (C) de <i>C. perfringens</i> isolados de alimento com soja.....	37
Figura 4. Distribuição e porcentagem dos lotes analisados segundo a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos nos produtos UAT (leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja). As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. Legenda: 1, 2, 3, 4, 5 = Lotes; A (1A, 2A, 3A, 4A, 5A) = $<10 \text{ UFC.mL}^{-1}$; B (1B, 2B, 3B, 4B, 5B) = $1,0 \times 10 - 3,5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (LC); $1,0 \times 10$ e/ou $1,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (BL); $1,0 \times 10$ e/ou $1,0 \times 10^2 - 3,7 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (AS).....	42
Figura 5. Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de bactérias do grupo do <i>B. cereus</i> em leite de cabra UAT, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. Legenda 1, 2, 3, 4, 5 = Lotes; A (1A, 2A, 3A, 4A, 5A) = $<1,0 \text{ UFC.mL}^{-1}$; B (1B, 2B, 3B, 4B, 5B) = $1,0 - 1,0 \times 10^{19} \text{ UFC.mL}^{-1}$ (LC); $1,0 - >10^{18} \text{ UFC.mL}^{-1}$ (BL); $1,0 - >10^{18} \text{ UFC.mL}^{-1}$ (AS).....	48
Figura 6. Ocorrência de bactérias do grupo do <i>B. cereus</i> em produtos UAT (leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja) comercializados no interior do Estado de São Paulo. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.....	48

- Figura 7. Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de *C. perfringens* em lotes de alimento com soja. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. 51
- Figura 8. Distribuição dos genes *hblA*, *hblB*, *hblC*, *hbl*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT* nos produtos UAT analisados. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. 55

1 INTRODUÇÃO

Os produtos tratados por ultra-alta temperatura (UAT), como, produtos lácteos e à base de soja, são de fácil conservação, e com isso, apresentam alta disponibilidade no mercado e grande aceitação por parte dos consumidores.

Os produtos à base de soja, são, geralmente consumidos por indivíduos alérgicos à proteína (porção da caseína alfa-s1 e beta-lactoglobulina) do leite e intolerantes à lactose, principalmente crianças e idosos.

O alimento com soja UAT, usualmente conhecido como “leite” de soja, apresenta propriedade hipolipêmica, baixa alergenicidade e propriedade anticolesterol. Os produtos à base de soja são considerados funcionais, ou seja, trazem benefícios para a manutenção da saúde, como por exemplo, redução do colesterol, do risco de doenças cardiovasculares, e também mantêm um bom funcionamento do intestino, entre outros.

O leite de cabra é outro produto submetido ao tratamento UAT que está disponível no mercado. Tem característica de alta digestibilidade, baixa alergenicidade, menor quantidade de lactose do que o leite, entre outros benefícios. É cada vez mais utilizado como uma alternativa para substituição do leite.

Produtos como, bebidas lácteas produzidas com leite de cabra e soja submetidas ao tratamento por UAT, consistem em uma mistura de proteína vegetal e animal, visando melhorar o valor nutricional do produto e tornar acessível às pessoas alérgicas à proteína do leite ou intolerantes à lactose.

Os produtos UAT, geralmente não são fervidos antes do seu consumo. Embora o leite submetido ao tratamento por UAT alcance uma temperatura de 130 a 150°C durante 2 a 4 segundos, o leite e seus derivados são alimentos ricos em nutrientes, sendo um ótimo meio de cultura para microrganismos. Esse tratamento térmico elimina totalmente as formas vegetativas de microrganismos presentes no leite, porém formas esporuladas, altamente resistentes ao calor, denominadas termorresistentes ou esporulados, podem ainda estar presentes no produto. Em condições adequadas, esses esporos germinam, as células vegetativas se multiplicam e podem produzir toxinas capazes de causar DTAs (Doenças

Transmitidas por Alimentos), sendo um risco potencial para a saúde dos consumidores.

Os gêneros de microrganismos que se destacam em produtos submetidos ao tratamento por UAT são *Bacillus* e *Clostridium*, pois são microrganismos esporulados e termorresistentes. As bactérias do grupo do *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. Com isso, contaminam facilmente alimentos como vegetais e cereais, são capazes de produzir toxinas responsáveis por DTAs.

Com isso, foram avaliados produtos tratados por UAT, comercializados no interior do Estado de São Paulo. Os produtos leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja, foram avaliados quanto sua qualidade microbiológica, por meio da contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, isolamento e contagem de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* e de *Clostridium perfringens*, bem como comparou os lotes dos três produtos quanto aos referidos microrganismos. Adicionalmente, isolados característicos de *B. cereus* foram identificados por meio do sequenciamento da região 16s rRNA, e verificado a presença de genes (*hblA*, *hblB*, *hblC*, *hbl*, *nheA*, *nheB*, *nheC* e *bceT*) de virulência relacionado a produção de toxinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite de cabra

O leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, de animais da espécie caprina, em condições de higiene, sadios, bem alimentados e descansados (BRASIL, 2000). Pessoas que tem alergia às proteínas (porção da caseína alfa-s1 e beta-lactoglobulina) do leite, podem tentar substituí-lo pelo leite de cabra, pois as reações alérgicas ocorrem com menor frequência (CATUNDA, 2016).

Os produtos lácteos caprinos industrializados, mais frequentes no Brasil, são leite de cabra integral pasteurizado e/ou congelado, queijos, sorvetes, leite em pó, leite esterilizado e UAT (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009).

A Turquia, é um dos principais países em produção de leite de cabra e o consumo de queijo e outros derivados do leite de cabra, é maior do que o leite fluido. Os consumidores são na grande maioria, de alto nível socioeconômico; segundo eles há poucos produtos disponíveis no comércio e com alto valor comercial (Guney; Ocak, 2013).

No sul do Brasil, os derivados do leite de cabra mais consumidos são queijo e iogurte. O leite de cabra UAT, é mais consumido do que o leite em pó, pois o sabor é diferente e influencia na escolha dos consumidores (CELIA; MORAES; SCHMIDT, 2012).

Alguns fatores podem alterar a composição do leite de cabra, por exemplo, a raça dos animais, alimentação, fisiologia, idade, período de lactação e as estações do ano. Outra maneira de alterar a composição do leite de cabra são as fraudes que o burlam, sendo contra os padrões estabelecido pela legislação vigente (COSTA et al., 2007).

A qualidade do leite depende de características físico-químicas, microbiológicas, bem como das condições higiênico-sanitárias na obtenção. Por isso, são necessárias exigências quanto à produção, manejo, transporte e comercialização, para que seja fornecido um alimento de qualidade ao consumidor (FREITAS; OLIVEIRA; GALINDO, 2005).

Com isso, padrões higiênico-sanitário devem ser estabelecidos para evitar alterações do leite, tendo como foco os cuidados necessários na obtenção, seguida do acondicionamento e processamento, para que as qualidades nutricionais, sensoriais e microbiológicas não sejam alteradas (COSTA et al., 2007).

A legislação brasileira, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº37 (BRASIL, 2000), regulamenta a produção do leite de cabra. É estabelecido para o produto UAT de leite de cabra, que de cinco amostras analisadas, nenhuma deve ter populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos iguais ou superiores a 10 UFC.mL^{-1} (Unidades Formadoras de Colônias), ausência de coliformes (30-35°C e 45°C) e de *Salmonella* spp.. Esses parâmetros devem ser obtidos no produto imediatamente após a sua fabricação, e as amostras devem ser colhidas no estabelecimento processador.

Porém, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001), os padrões microbiológicos sanitários para leite UAT e produtos à base de leite UAT (de todas as espécies), estabelece que após 7 dias de incubação a 35-37°C da embalagem fechada, não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.

As características físico-químicas do leite de cada espécie animal estão relacionadas com sua composição (PARK et al., 2007), que estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição básica do leite de cabra, ovelha, vaca e humano.

Composição	Cabra	Ovelha	Vaca	Humano
Gordura (%)	3,8	7,9	3,6	4,0
Sólidos não gordurosos (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Caseína (%)	2,4	4,2	2,6	0,4
Albumina (%), globulinas (%)	0,6	1,0	0,6	0,7
Proteína não nitrogenada (%)	0,4	0,8	0,2	0,5
Cinzas (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Calorias/ 100mL	70	105	69	68

Fonte: Park et al. (2007).

O leite de cabra, em comparação com o leite, tem 0,2 a 0,5% menos lactose, o tamanho dos glóbulos de gorduras no leite de cabra é de 3,5 μm e no leite é de 4,5 μm (CHANDAN; ATTAIE; SHAHANI, 1992; CENACHI et al., 2011). Isso, explica a melhor digestibilidade do leite de cabra quando comparado com o leite (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001), pois os glóbulos de gordura sendo pequenos são absorvidos diretamente pelos eritrócitos no organismo (CHILLIARD et al., 2003). Também, tem maior proporção de ácidos graxos de cadeia pequena e média, ou seja, de 6 a 14 carbonos, e menor proporção de proteína do tipo caseína alfa-s1, que resulta em maior digestibilidade comparado com o leite (JENNESS, 1980; CATUNDA, 2016).

A lactose é o principal carboidrato no leite de cabra, mas outros carboidratos também estão presentes, como oligossacarídeos, glicopeptídeos, glicoproteínas e açúcares nucleotídeos. Os oligossacarídeos possuem propriedades anti-infecciosas e prébióticas que fazem a proteção da mucosa intestinal, o que favorece a microbiota intestinal humana e protege contra patógenos oportunistas (CENACHI et al., 2011).

Dos dez aminoácidos essenciais do leite de cabra, seis são mais elevados do que no leite, são eles, treonina, lisina, isoleucina, cistina, tirosina e valina. Além do que, os aminoácidos do leite de cabra têm melhor absorção pelo trato gastrointestinal humano (TGI) em comparação com o leite (HAENLEIN, 2004).

A composição e estruturas dos lipídios lácteos, presentes no leite de cabra, são o que mais se diferenciam do leite, sendo que oferecem as características físicas e sensoriais, pois influenciam no sabor, consistência e textura dos produtos lácteos. O leite de cabra, tem elevados teores de ácidos graxos em sua composição, tais como, o ácido butírico, cáprico, caprílico, capróico, láurico e mirístico, correspondente a 35% de ácidos graxos de cadeia média e o leite com apenas 17% desses ácidos graxos (CENACHI et al., 2011).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos leites de cabra e vaca.

Propriedades Físico-químicas básicas	Leite de cabra	Leite de vaca
Densidade Kg.m ³	1029-1039	1023-1039
Viscosidade (Pa.s)	2,12x10 ⁻³	2,0x10 ⁻³
Índice de refração	1,450 ± 0,39	1,451 ± 0,35
Ponto de congelamento (-°C)	0,540 – 0,573	0,530 – 0,570
Acidez titulável (g.Kg de ácido láctico)	1,4 – 2,3	1,5 – 1,8
pH	6,50 – 6,80	6,65 – 6,71

Fonte: Cenachi et al. (2011).

O leite de cabra é mais benéfico para a saúde do que o leite, pois possui mais ácido graxos poli-insaturados e monoinsaturados, que auxiliam nas doenças cardiovasculares, tem a capacidade de reduzir e inibir a deposição de colesterol nos vasos sanguíneos. O leite de cabra, também é indicado para crianças e idosos com desnutrição, pessoas com problemas gastrointestinais e nutricionais, pois o leite de cabra não possui aglutinina, substância que dificulta a digestão e que está presente no leite (CENACHI et al., 2011).

O leite é rico em caseína alfa-s1, que é responsável pela alergia observada em algumas pessoas, porém não é relatada quando consome leite de cabra (REMEUF; LENOIR, 1986, CATUNDA, 2016). Binsfeld et al. (2009), afirmaram que, além da alfa caseína, a beta-lactoglobulina, seguida da beta-caseína, alfa-lactoglobulina, albumina sérica e gamaglobulina, são proteínas do leite que também podem causar as alergias.

Kapila, Kavadi e Kapila (2013), avaliaram a resposta imune em ratos, da alergenicidade associada com as principais proteínas do leite (caseína e beta-lactoglobulina) de vaca, cabra e búfala. As caseínas de todas as espécies indicaram ser menos imunogênica e alergênica do que as beta-lactoglobulinas, afirmaram que as proteínas do leite de vaca são altamente alergênicas dentre as três espécies de animais leiteiros.

Segundo Park (1994), a alergia à proteína do leite é uma reação do sistema imune, mediada pela imunoglobulina E (IgE), principalmente em resposta à beta-lactoglobulina. Os sintomas clínicos dos pacientes alérgicos são colite, dores gastrointestinais, enxaqueca, vômitos, diarreias, urticária, rinite, asma e anafilaxia. O sistema imune não reconhece as proteínas do leite, embora o organismo tenha a capacidade de digerir-las, com isso, há a necessidade da terapia nutricional que é a substituição do leite por outros alimentos, como por exemplo, à base de soja e hidrolisados proteicos (GASPARIN; CARVALHO; ARAUJO, 2010).

Já, a intolerância a lactose, ocorre devido a má digestão do açúcar do leite (lactose), caracterizado pela insuficiência da ação de uma enzima chamada lactase, responsável por hidrolisar a lactose em glicose e galactose. Com isso, este açúcar não é absorvido pelo organismo, ocasionando assim a fermentação do açúcar pelos microrganismos presentes no intestino, que resultará nos sintomas, como

flatulências, distensão abdominal, dores abdominais e diarreia (GASPARIN; CARVALHO; ARAUJO, 2010).

Portanto, o leite de cabra, é cada vez mais utilizado como uma alternativa para substituição do leite, por sua composição química, alta digestibilidade e baixa alergenicidade (KUCHTÍK, 2015).

Segundo resultados de Pellegrini et al. (2012), em que avaliaram as características físico-químicas do leite bovino, caprino e ovino; verificaram que não diferiram estatisticamente o leite bovino e o leite caprino em relação ao pH e acidez Dornic, porém, em relação a densidade, gordura, proteína, lactose, estrato seco total (EST) e índice crioscópico diferiram estatisticamente. O leite de cabra apresentou menor porcentagem de lactose, menor densidade e EST, maior porcentagem de proteína e gordura.

Além das análises físico-químicas, o leite de cabra destinado ao consumo humano, deve passar por processos de tratamento térmico antes de seu beneficiamento, como a pasteurização lenta seguida de congelamento e tratamento térmico UAT. Pois o leite é um alimento extremamente susceptível à contaminação microbiana, e já foi relatado, em estudos feitos por Foschino et al. (2002) e Morgan et al. (2003), por exemplo, a presença de microrganismos patogênicos no leite de cabra *in natura*. Portanto, quando há falhas no processamento, transporte e/ou armazenamento do leite e os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação não são atendidos, torna-se um risco à saúde do consumidor (OLIVEIRA, 2005).

Os contaminantes do leite podem originar-se da água quando contaminada, da falta de higiene, da mastite e da obtenção inadequada. Portanto, deve-se obter uma matéria-prima de boa qualidade, sanidade dos animais, associado aos procedimentos de higienização em toda a cadeia produtiva (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Os microrganismos influenciam a qualidade do leite *in natura*, e conseqüentemente, os derivados lácteos, pois algumas espécies de microrganismos são os causadores de deterioração dos produtos. O processo inicial do leite é a refrigeração, a qual é usada para a conservação do leite e limitar a multiplicação microbiana, no entanto, alguns microrganismos ainda são capazes de se multiplicarem em baixas temperaturas. Esses microrganismos são chamados de

psicrotróficos, tais como, bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* (FONSECA et al., 2006), *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*; e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbactérias* (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Bacillus cereus, por exemplo, são bactérias termolábeis, que na maioria das vezes, são destruídas pelo tratamento térmico de pasteurização. Mas, as lipases e proteases, que são enzimas extracelulares, produzidas por essas bactérias, são termorresistentes. Com isso, a persistências dessas enzimas mesmo após o tratamento térmico causa alterações de sabor e odor do leite, bem como altera a bioquímica dos seus constituintes levando a diminuição da vida de prateleira (VIDAL-MARTINS, 2005).

2.2 Alimento com soja

Segundo a Resolução RDC nº91 (BRASIL, 2000) o alimento com soja é o produto em que a soja é a principal fonte de proteína. Na sua composição, os ingredientes obrigatórios são “extrato de soja (integral e ou desengordurado), e/ou proteína concentrada de soja, e/ou proteína isolada de soja, e/ou proteína texturizada de soja, e/ou outras fontes proteicas de soja, excluindo o farelo tostado de soja”. Os ingredientes opcionais do alimento com soja são “açúcares, mel, sal (cloreto de sódio), água, leite e derivados, ovos, carnes e derivados, amidos e derivados, cereais e derivados, cacau e derivados, café, gorduras e óleos, coco e derivados, extrato de malte, polpas, sucos e concentrados de frutas, microrganismos para fins específicos e outros ingredientes isolados ou em combinação, que não descaracterizem o produto”, sendo que é vedada a utilização da expressão “leite de soja”, portanto usa-se a expressão “Alimento com Soja” (BRASIL, 2000).

O alimento com soja é uma opção nutritiva que pode atender as necessidades das pessoas que procuram alimentos mais saudáveis (livre de colesterol, por exemplo). Além disso, pessoas intolerantes a lactose e alérgicas a proteína do leite

podem optar em consumir produtos à base de soja, pois a soja não tem lactose, é de fácil digestão e tem baixo teor de gordura comparado ao leite (BLUM; RAMONI; BALBI, 2016).

No comércio a soja é encontrada como alimento com soja em pó ou fluido (extrato de soja), em derivados como farinha de soja, proteína texturizada (“carne de soja”), na forma de grão, tofu (“queijo de soja”), também está presente em vários produtos como, margarinas, óleos vegetais, massas, biscoitos e molhos (PAPALEO, 2004; EMBRAPA SOJA).

Em estudo realizado por Behrens e Silva (2004), afirmaram que os produtos consumidos com maior frequência são a proteína texturizada e o alimento com soja, sendo que 8% dos 100 entrevistados, consumiam o alimento com soja mais de uma vez por semana. Segundo os autores, o consumo do alimento com soja é aumentado pelo favorecimento do sabor dos produtos à base soja, pela combinação com sucos de frutas, por exemplo.

A legislação que estabelece padrões microbiológicos para o alimento com soja é a Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001), pelo Ministério da Saúde – ANVISA. Para bebida à base de extrato de soja, aromatizada ou não, desengordurada ou não, refrigerada ou similares, extrato desidratado e proteína texturizada de soja, desengordurada ou não e similares, preconiza-se 10 UFC.mL⁻¹ de coliformes a 45°C, 5x10² UFC.mL⁻¹ de *Bacillus cereus* e ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL. Sabidamente, os grãos de soja são geralmente contaminados por microrganismos, principalmente esporulados, pois estão em contato direto com a terra, podendo os grãos serem contaminados facilmente, por esse motivo é permitida uma carga microbiana mais alta, pela legislação vigente.

A soja é uma leguminosa (*Glycine max*) com alto valor nutritivo (ZAKIR, 2015), sendo rica em vitaminas (complexo B), minerais (ferro, potássio, zinco, manganês, magnésio, fósforo e cobre), proteínas e fibras. Em sua composição a soja apresenta composição 40% de proteína, 34% de carboidratos (açúcares como frutose, glicose e sacarose), 20% de lipídios e 5% de minerais (MANDARINO; RUFINO, 2003; ZAKIR, 2015). Este alimento é considerado funcional, porque contribui na redução do risco de desenvolver doenças crônicas e degenerativas, e apresenta diversos benefícios à saúde (ZAKIR, 2015; PENHA et al., 2007).

Alguns dos seus benefícios, além de seu elevado teor de proteínas, minerais e fibras são, a ausência do colesterol, pouca quantidade de gordura saturada, ajuda na redução dos riscos de doenças como, por exemplo, doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose, pela presença de flavonóides, uma substância fitoquímica (SILVA et al., 2006).

Os produtos à base de soja são de baixa alergenicidade e tem propriedades hipolipêmicas. Por causa do seu valor nutricional a soja é utilizada na formulação de suplementos substituindo a proteína do leite parcialmente ou totalmente (CAMARGO et al., 2000). Na Tabela 3 está demonstrada a composição química do alimento com soja comparado ao leite.

Tabela 3. Composição química do leite e alimento com soja.

Composição Média (100g)	Alimento com Soja		Leite	
	Líquido	Em pó	Líquido	Em pó
Calorias	52	429	63	450,5
Proteína (g)	3,4	41,8	3,1	28,7
Lipídios (g)	2,3	20,3	3,5	21,7
Carboidratos (g)	2,5	28	5	35,1
Cálcio (g)	40	275	114	909
Fósforo (g)	105	674	102	708
Ferro (g)	1,2	5	0,1	0,5
Vitamina A (µg)	0	4	38	270
Vitamina B1 (µg)	40	300	40	290
Vitamina B2 (µg)	120	250	653	1460
Niacina (mg)	0,1	0,4	0,2	0,7
Vitamina C (mg)	0	0	1	6

Fonte: CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998; CUNHA; CUNHA; HIROOKA, 1996; FRANCO, 1986.

Segundo Carrão-Panizzi e Mandarino (1998), o alimento com soja é uma alternativa viável para alimentação pois apresenta, alta digestibilidade (95%) comparado ao leite (91%), é uma excelente fonte proteica, apesar de ter baixa quantidade de cálcio e vitaminas A e C.

A parte externa do grão de soja contém microrganismos naturais e contaminantes do solo, ar e água. Os principais microrganismos presentes na soja são pertencentes às famílias *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Bacillaceae*. A presença de *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*, em amostras de farinha de soja já foi demonstrada previamente (CUNHA; CUNHA; HIROOKA, 1996).

2.3 Bebida de leite de cabra e soja

De acordo com o MAPA, na Instrução Normativa nº16 (BRASIL, 2005), a “bebida láctea é o produto lácteo resultante da mistura do leite (“in natura”, pasteurizado, esterilizado, UAT, reconstituído, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido concentrado e em pó), adicionado ou não de produto (s) ou substância (s) alimentícia (s), gordura vegetal, leite (s) fermentado (s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos, sendo que a base láctea deve representar no mínimo 51% do total de ingredientes do produto”. E a bebida láctea UAT com adição é caracterizada como, o produto que foi adicionado ao leite, sendo produto (s) ou substância (s) alimentícia (s), gordura vegetal e outros produtos lácteos.

O desenvolvimento de produtos lácteos caprinos funcionais é uma alternativa para o sucesso da produção do leite de cabra, pois torna o produto competitivo. Mesmo com maior custo de produção, comparado aos produtos de origem bovina, é compensado pela sua característica funcional. Por ser considerado um alimento funcional, porque tem maior digestibilidade em comparação ao leite, é indicado por médicos e nutricionistas às pessoas, em especial os intolerantes a lactose, crianças, idosos, e àqueles que desejam ter uma alimentação mais equilibrada (VERGNE, 2014).

O MAPA (IN nº16) regulamenta a bebida láctea UAT, o qual estabelece que de cinco amostras analisadas nenhuma pode estar acima de 100 UFC.mL⁻¹ microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos (BRASIL, 2005).

Já, a ANVISA pela Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001) estabelece o mesmo que para leite UAT, ou seja, para produtos à base de leite UAT (creme de leite, bebidas lácteas fermentadas e não, e similares), em embalagens herméticas, após 7 dias de incubação a 35-37°C, não devem apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.

Em relação ao valor nutricional das bebidas lácteas, são consideradas nutritivas, pois contêm proteínas, vitaminas, minerais, lactose e gorduras. Devido a

isso, ganharam popularidade pela procura dos consumidores brasileiros por produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de uso prático (THAMER; PENNA, 2006).

As informações nutricionais da bebida UAT de leite de cabra e soja estão apresentados na Tabela 4, sendo que os dados foram obtidos da embalagem do produto, pois a literatura é escassa pelo fato de ser um produto lácteo novo no mercado.

Tabela 4. Informações nutricionais da bebida de leite de cabra e soja UAT.

Valor Calórico	100 kcal
Carboidratos	10 g
Proteínas	6 g
Gorduras total	4 g
Gorduras saturadas	1 g
Gorduras <i>Trans</i>	0 g
Fibra Alimentar	0 g
Sódio	53 mg

*Informações nutricionais para uma porção de 200 mL.

Fonte: Dados obtidos da embalagem do produto.

Os ingredientes utilizados no produto bebida de leite de cabra e soja, são leite de cabra integral, água, açúcar, extrato de soja, estabilizantes carboximetilcelulose sódica, citrato de sódio, trifosfato de sódio, difosfato de sódio e monofosfato de sódio, aroma idêntico ao natural de baunilha, espessante goma xantana e aroma idêntico ao natural de leite (Dados obtidos na embalagem do produto).

Cassanego et al. (2012), desenvolveram dois produtos experimentais de bebida láctea achocolatadas, um a base de leite de cabra e outro de leite, os quais avaliaram as características físico-químicas e sensoriais. Os parâmetros físico-químicos como, gordura e umidade diferiram estatisticamente, apresentaram ambos em maior quantidade na bebida láctea de leite de cabra. Porém, os outros parâmetros como, pH, proteína e ácido láctico não diferiram estatisticamente. Na avaliação sensorial, houve diferença estatística em relação ao sabor e aparência, porém não na relação de textura e aroma. No teste de preferência entre um produto e outro, não houve diferença estatisticamente significativa avaliados pelos consumidores.

Segundo Berti e Santos (2016), com frequência são notificados casos de produtos industrializados contaminados com bactérias, fungos, insetos e produtos de

limpeza, decorrentes de falhas em diversas etapas do processo de industrialização, como falhas na manutenção dos equipamentos, falha na higienização, falha nas análises químicas e microbiológicas. Em relação a contaminação microbiológica, há relatos de bebida láctea achocolata UAT contaminada por *Bacillus cereus*, sendo que a origem da contaminação foi da falha de vedação da conexão entre dois tubos na indústria, e pelo fato deste microrganismo estar presente no meio ambiente contaminou o produto (BRASIL, 2015).

Bürger et al. (2011) avaliaram as características microbiológicas de bebida láctea UAT e verificaram a presença de microrganismos psicrótrópicos, sendo que após a abertura do produto, os quais foram mantidos sob refrigeração por 48 horas, a população de psicrótrópicos aumentou em 36% das amostras. Segundo os autores, a presença de microrganismos pode ser atribuída a esporos de bactérias termorresistentes presentes na matéria-prima e/ou na contaminação após o tratamento térmico UAT.

2.4 Características dos microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*

De acordo com MAPA, na Portaria n° 101 (BRASIL, 1993), o *Bacillus cereus* é um microrganismo na forma de bastonete, gram-positivo, capaz de formar esporos, aeróbio e anaeróbio facultativo, com uma temperatura ótima de multiplicação entre 28°C a 35°C. Pode ser encontrado facilmente no solo, nos vegetais, nos alimentos crus e processados; podendo produzir intoxicação alimentar quando em contagens superiores a 10^6 UFC/g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento) nos alimentos. Silva et al. (2010) afirmaram que somente populações de *B. cereus* maiores do que 10^5 UFC/g⁻¹ podem apresentar risco à saúde dos consumidores. Franco e Landgraf (2008), porém afirmaram ser necessário um alto número de células viáveis (10^7 e 10^9 células) de *B. cereus* em um alimento para ocorrer a intoxicação alimentar.

O *B. cereus* faz parte de um grupo chamado grupo do *Bacillus cereus*, que é formado pelas espécies: *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B.*

pseudomycooides, *B. weihenstephanensis* e *B. cytotoxicus*. As espécies de maior relevância e de importância histórica são: *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* (RABINOVITCH; VIVONI, 2016). Griffiths e Schraft (2014), acrescentaram ao grupo do *B. cereus* o *B. toyonensis*, formando, portanto, oito espécies neste grupo.

As investigações de Ash et al. (1991), indicam que as espécies *B. thuringiensis*, *B. mycooides* e *B. anthracis* poderiam ser considerados uma subespécie de *B. cereus*, pois formam um grupo com características fenotípicas muito semelhantes e de difícil diferenciação, embora sejam geneticamente diferentes. Para diferenciar essas espécies existem algumas características que estão descritas na Tabela 5 (TALLENT et al., 2012).

Tabela 5. Características das espécies do grupo do *Bacillus cereus*.

Características	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. anthracis</i>
Coloração de Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-
Redução do nitrato	+/-	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+/-	d
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Reação de gema de ovo	+	+	+	+
Utilização anaeróbia da glicose	+	+	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+
Ácido a partir do manitol	-	-	-	-
Hemólise (carneiro)	+	+	+	d
Outras características conhecidas	Produz enterotoxinas	Produz cristais de enterotoxinas	Crescimento rizóide	Patogênico para o homem e outros animais

+ = 90-100% das cepas positivas, +/- = 50-50% das cepas positivas, - = 90-100% das cepas negativas, d = maioria das cepas negativas.

Fonte: TALLENT et al., 2012.

B. cereus tem a capacidade de sintetizar enzimas, como as proteolíticas e as lipolíticas, responsáveis por causar alterações organolépticas indesejáveis nos produtos lácteos. As enzimas lipolíticas alteram o sabor do leite UAT, desencadeando rancificação. Já, as enzimas proteolíticas podem causar a geleificação do leite UAT, pois atuam, principalmente, sobre a κ -caseína, levando à perda da estabilidade e favorecendo a agregação das micelas de caseína (MAZIERO et al., 2011). *B. cereus* também tem a capacidade de formar biofilme, o que pode contaminar o leite mesmo após o processamento térmico na indústria (REZENDE-LAGO et al., 2007).

Há duas síndromes que o *B. cereus* pode provocar, a síndrome diarreica e a síndrome emética (Tabela 6). A doença ocorre ao ingerir toxinas produzidas pelo *B. cereus* pré-formadas no alimento, após a ingestão ocorrerá multiplicação das células no TGI (PAIVA, 2009).

Tabela 6. Características dos tipos de doenças causadas por *Bacillus cereus*.

	Síndrome diarreica	Síndrome emética
Dose infecciosa	10 ⁵ – 10 ⁷ células/grama	10 ⁵ – 10 ⁸ células/grama
Toxina produzida	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Proteica	Peptídeo cíclico
Período de incubação	8 -16 h (ocasionalmente > 24 h)	0,5 - 6 h
Duração	12 - 24 h (ocasionalmente vários dias)	6 - 24 h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea	Náusea, vômito e mal-estar
Alimentos mais frequentemente contaminados	Produtos à base de carne, sopas, vegetais, pudins, molhos e leite/produtos lácteos	Arroz reaquecido várias vezes, macarrão e alimentos prontos

Fonte: Adaptado de GRANUM, 1994; GRANUM; LAND, 1997.

A síndrome diarreica é caracterizada por período de incubação de 8 a 16 horas, e os sintomas podem durar de 12 a 24 horas. A doença se dá pela toxina diarreica que é uma proteína termolábil, inativada por aquecimento a 56°C por 5 minutos (SILVA et al., 2010). De acordo com Franco e Landgraf (2008) os sintomas principais são diarreia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrendo náuseas e vômitos e os alimentos mais envolvidos nessa síndrome são vegetais crus ou cozidos, produtos cárneos, pescado, massas, leite, sorvete, pudins à base de amido, entre outros.

A síndrome diarreia é uma toxinfecção causada pela ingestão de células vegetativas, viáveis ou esporos, que produzem no intestino delgado uma enterotoxina de origem proteica, e é facilmente confundida com outra doença transmitida por alimentos (DTAs) causada pelo *Clostridium perfringens*, uma bactéria que também é capaz de produzir esporos (GRANUM; O' SULLIVAN; LUND, 1999). O *B. cereus* além de causar toxinfecção alimentar, pode causar infecções sistêmicas e locais, principalmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicodependentes, pacientes com histórico de feridas traumáticas, cirúrgicas e cateteres (EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004).

A síndrome emética causa náuseas e vômitos de 1 a 5 horas após ter consumido um alimento contaminado, pode ocorrer diarreia em alguns casos. A doença é causada pela toxina emética que é um peptídeo altamente resistente ao calor podendo suportar uma temperatura de 126°C por 90 minutos ou 120°C por mais de 1 hora (SILVA et al., 2010). Os sintomas da doença podem durar de 6 a 24 horas. Os alimentos relacionados com esta doença são na maioria das vezes à base de farinha e cereais, principalmente o arroz (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

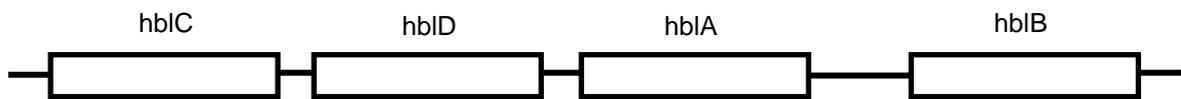
O *B. cereus* é considerado um microrganismo termorresistente, porque seus esporos podem resistir aos tratamentos térmicos que as indústrias de alimentos utilizam, como o UAT (BRADSHAW; PEELER; TWEDT, 1975). O processo de tratamento térmico por UAT elimina as formas vegetativas dos microrganismos, porém formas esporuladas, altamente resistentes ao calor (“*highly heat resistente spores*”- HHRs), poderão permanecer no alimento. Esses microrganismos provêm da matéria-prima obtida em condições de higiene precárias (SCHOKEN-ITURRINO; NADER FILHO; DIMENSTEIN, 1996).

Uma das espécies mais importantes na indústria de alimentos é o *B. cereus*, pois tem a capacidade de produzir toxinas capazes de causar toxinfecções alimentares, pela produção de enzimas extracelulares que determinam a capacidade de deterioração e também porque possuem esporos capazes de resistir ao tratamento térmico pelo método UAT (ROBINSON; PHILL, 1987).

De acordo com Aragon-Alegro et al. (2008), há 3 diferentes toxinas responsáveis por causar a síndrome diarreica causada pelo *B. cereus*. Existem dois complexos de proteínas, uma composta de hemolisina BL (hbl) (BEECHER; SCHOENI; WONG, 1995), uma enterotoxina não-hemolítica (nhe) (GRANUM; O' SULLIVAN; LUND, 1999), e uma proteína enterotóxica chamada de citotoxina k (cytK) (LUND; DE BUYSER; GRANUM, 2000). Agata et al. (1995) designaram um gene de proteína enterotoxigênica de *B. cereus* a qual chamaram de enterotoxina T (bceT), também capaz de causar diarreia de origem alimentar.

A síndrome emética é causada por uma única toxina estável pré-formada no alimento, um peptídeo chamado de cereulide (AGATA et al., 1995). Esse peptídeo é sintetizado por uma enzima sintetase de peptídeo não-ribossômico, que são codificados nos genes chamados de *ces* (EHLING-SCHULZ et al., 2006).

A hemolisina BL (hbl) é um complexo composto de três proteínas chamadas de B, L1 e L2 (BEECHER; WONG, 1994, 1997), os quais são transcritos a partir dos genes *hblA*, *hblD*, *hblC*, respectivamente, são organizados em um operon junto com um quarto gene que é o *hblB*, que codifica a proteína B' (HEINRICHS et al., 1993; RYAN; MACMILLAN; ZILINSKAS, 1997), demonstrados na Figura 1. A massa molecular das proteínas de hbl são acima de 40 kDa (Kilodalton) (RYAN; MACMILLAN; ZILINSKAS, 1997).



Fonte: RYAN; MACMILLAN; ZILINSKAS, 1997.

Figura 1. Estrutura do operon hbl. O operon inclui três proteínas do hbl: L2 proteína codificada por *hblC*, L1, proteína do *hblD*, e a proteína B pelo *hblA* e proteína B' pelo *hblB*.

Hbl tem atividade hemolítica, dermonecrótica, permeabilidade vascular e provoca acúmulo de líquido em alça ileal ligada de coelho (BEECHER; WONG, 1994, 1997).

A enterotoxina não hemolítica (nhe) é um complexo composto de três proteínas diferentes. As proteínas são chamadas de *nheA*, *nheB* e *nheC*, as quais são codificados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente, e da mesma forma que a hemolisina (hbl) também são organizados em um operon (GRANUM; O' SULLIVAN; LUND, 1999).

A citotoxina K é codificada pelo gene sequenciado *cytK*, semelhante a β -toxina do microrganismo *Clostridium perfringens*. A proteína *cytK* tem peso molecular de 34 kDa, tem característica necrótica, hemolítica, capaz de formar poros na dupla camada lipídica e é altamente tóxica para as células epiteliais intestinais humanas (HARDY; LUND; GRANUM, 2001). *CytK* tem similaridade de 30%, em relação a sua sequência de aminoácidos, com toxinas de outros microrganismos, como a α -hemolisina (α -toxina, α -HL), leucocidina e hemolisina-c do *Staphylococcus aureus*, e a β -toxina do *Clostridium perfringens*, sendo que esses são pertencentes à família β -barril toxinas que são formadoras de poros nas membranas celulares

(STEINTHORSDOTTIR; HALLDÓRSSON; ANDRÉSSON, 2000; PRÉVOST, 1999; SONG et al., 1996).

As toxinas formadoras de poros causam danos à membrana alvo, gerando modificações na sua estrutura, o que ocasiona a formação de poros, e conseqüentemente à morte celular (PARKER; FEIL, 2005)

Fagerlund et al. (2004), afirmam que existem duas formas diferentes da citotoxina K (cytK) em cepa de *B. cereus*, a qual denominaram de cytK-1 e cytK-2. Essas toxinas apresentam 89% de homologia em sua sequência de aminoácidos, porém há diferença em seu efeito biológico, pois a cytK-1 demonstrou ser altamente tóxico no intestino humano. Para detectar o gene *cytK*, o método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é validado, capaz de detectar esse e outros genes (GUINEBRETIERE; BROUSSOLLE; NGUYEN, 2002).

A *bceT* (*B. cereus enterotoxin T*) é um polipeptídeo com peso molecular de 41kDa (BHUNIA, 2008). Hansen et al. (2003) sugerem que *bceT* não é um único gene, mais sim a junção de quatro genes independentes que se ligaram. Segundo estudos realizados por Choma e Granum (2002), não foi comprovado que *bceT* é citotóxico em células epiteliais, ou que talvez sua atividade citotóxica seja muito baixa em comparação às enterotoxinas *hbl* e *nhe*, também não há evidências de que *bceT* pode causar DTA.

2.5 Características do *Clostridium perfringens*

O *C. perfringens* faz parte do gênero *Clostridium*, onde microrganismos são anaeróbios estritos, com capacidade de formar esporos (LECLERC; MOSSEL, 1989). *C. perfringens* é uma bactéria anaeróbia, Gram-positiva, amplamente distribuída na natureza, faz parte da microbiota intestinal de animais e seres humanos (MCDONEL, 1980). Apresentam-se na forma de bastonete são imóveis, sulfito redutores, capazes de fermentar a glicose, com temperatura ótima para multiplicação de 43°C a 47°C e as células vegetativas suportam até 50°C (SILVA et al., 2010).

Embora *C. perfringens* faça parte da microbiota normal do intestino humano, a doença causada por este microrganismo ocorre ao ingerir alimentos contaminados com um grande número de células vegetativas, que produzem toxinas no intestino em quantidades suficientes para causar a DTA (CDC, 2015).

As células vegetativas do *C. perfringens* podem ser eliminadas ao aquecimento, porém os esporos que são termoresistentes podem resistir a elevadas temperaturas. No momento do resfriamento ou aquecimento os esporos germinam e as células vegetativas se multiplicam (CDC, 2015).

Segundo Silva et al. (2010), nos alimentos incriminados, a população de microrganismos deve ser superior a 10^5 UFC.g⁻¹ para causar doença, ou ser detectado nas fezes de paciente uma população superior ou igual a 10^6 UFC.g⁻¹.

O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos denominados A, B, C, D, e E. De acordo com a enterotoxina produzida, as toxinas são chamadas de alfa, beta, épsilon e iota (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). A alfa toxina é produzida por todos os grupos, porém com maior frequência por *C. perfringens* tipo A. *C. perfringens* tipo B são produtores das toxinas alfa, beta e épsilon. Já, o tipo C produz toxinas alfa e beta. O tipo D produz toxinas alfa e épsilon. Por fim, o tipo E produz toxina alfa e iota (HATHEWAY, 1990), detalhados na Tabela 7.

Tabela 7. Classificação de *Clostridium perfringens* baseada na produção de toxinas.

Tipo	Toxinas			
	Alfa	Beta	Épsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Fonte: MORRIS; FERNANDEZ-MIYAKAWA, 2009.

Há mais de 70 anos McClung (1945) relatou casos de DTAs, causadas por *C. perfringens*. Relatou que pelo menos vinte pessoas estavam envolvidas, sendo que a maioria dos casos foram relatos de que foram alimentados em uma grande cafeteria pública, e os pratos foram preparados, no dia anterior e servidos no dia seguinte, a partir de pratos à base de frango. Os sintomas relatados foram náuseas, vômitos (raro), cólicas intestinais e constante diarreia pronunciada. Nesses casos, relataram que os sintomas iniciaram de 8 a 12 horas após a refeição, com diarreia

de duração de 12 horas, e mesmo que os acometidos estavam fracos, no dia seguinte foram capazes de realizar suas atividades normais, embora um dos acometidos ficou de cama durante 48 horas (MCCLUNG, 1945).

As pessoas podem desenvolver diarreia e cólicas abdominais dentro de 6 a 24 horas, geralmente não apresentam febre ou vômito, crianças e idosos estão em maior risco podendo os sintomas durarem de 1 a 2 semanas. Em casos graves, incluem as complicações devido à desidratação (CDC, 2015).

Há uma enterotoxina chamada de CPE (eterotoxina de *Clostridium perfringens*), um peptídeo de 35 kDa composto de 319 aminoácidos. Essa enterotoxina é o fator de virulência responsável pela DTA causada pelo *C. perfringens* tipo A (MCCLANE, 1996). Esse peptídeo é responsável pelos sintomas predominantes da doença, que são diarreia aguda e cólica (SARKER; CARMAN; MCCLANE, 1999). Estudos de Cornillot et al. (1995) afirmaram que o gene *cpe* pode ser localizado no cromossomo ou em plasmídeo. Sendo que na maioria dos isolados de origem alimentar, teve localização cromossômica, e os que não tiveram origem alimentar foram localizados em plasmídeo.

2.6 Características do tratamento por ultra-alta temperatura (UAT/UHT)

Existem dois métodos alternativos de tratamento UAT, o direto, em que o vapor é injetado no produto e de imediato submetido ao resfriamento, e o indireto, em que o produto é aquecido por meio de trocadores de calor e não entra em contato direto com a fonte de calor (FELLOWS, 2006; TRONCO, 2008).

O tratamento UAT é usado em diversos produtos como, alimentos líquidos, leite, alimentos infantis, ricota, molhos e conservas a base de tomate, frutas e hortaliças, entre outros. Os alimentos com pH menor que 4,5 podem ser aquecidos em água fervente, porque a alta acidez diminui a possibilidade da multiplicação de microrganismos, embora os esporos possam estar presentes e sobreviver ao tratamento térmico. Os alimentos de baixa acidez, por exemplo, leite, soja, feijão,

milho, ervilha, que tem pH igual ou maior que 4,5 são tratados por UAT para eliminar os esporos dos microrganismos (WOJSLAW, 2012).

Por definição, segundo o MAPA, pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UAT, na portaria nº 370 (BRASIL, 1997), entende-se por leite UAT/UHT (ultra-alta temperatura/ “ultra-high temperature”), o leite que foi homogeneizado, submetido por 2 a 4 segundos a uma temperatura de 130°C a 150°C, por um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura abaixo de 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

O leite UAT pela sua praticidade, armazenamento e maior vida de prateleira, está entre os alimentos de origem animal que tem maior consumo (CAMARA; WESCHENFELDER, 2014).

Para obter um produto de qualidade o ponto mais importante no tratamento por UAT é o binômio tempo/ temperatura, o qual vai garantir a obtenção de um processo de esterilização comercial, pois ao passar em uma temperatura acima do preconizado, problemas tecnológicos podem aparecer, como, alterações no sabor do leite devido a ações sobre as proteínas, geleificação, formação de sedimentos, perda do valor nutricional e escurecimento (BASTOS, 1999; VIDAL-MARTINS, 2005).

O leite cru deve passar por um tratamento térmico anterior ao processo de UAT. Geralmente utiliza-se a pasteurização rápida, que consiste na utilização do binômio tempo/temperatura de 15 segundos entre 73-75°C, com o intuito de eliminar as bactérias psicrófilas e enzimas termolábeis produzidas. Após avaliação da densidade, crioscopia, gordura e acidez, o leite é liberado para o tratamento UAT (MARTINS et al., 2008).

No produto alimento com soja as principais etapas envolvidas na sua elaboração corresponde inicialmente na seleção e limpeza dos grãos (com água potável), pesagem, maceração (permanece de molho em bicarbonato de sódio durante 12 a 15 horas em temperatura ambiente), lavagem/drenagem (em água potável, sem esfregar para não causar danos aos grãos), cozimento (em solução de bicarbonato de sódio durante 5 a 10 minutos após fervura), lavagem/drenagem (com água potável), trituração (com água potável em ebulição, durante 3 minutos),

pasteurização (95°C a 98°C durante 10 minutos, sempre em agitação), formulação (adição de produtos) e embalagem. Utilizando o tratamento térmico por UAT, o produto pode ser mantido por um período de 3 meses em temperatura ambiente, em embalagem fechada (GUERREIRO, 2006).

2.7 Relação entre os microrganismos esporulados e os produtos UAT

O tratamento sob altas temperaturas, como o UAT é utilizado com o objetivo de eliminar as formas vegetativas de microrganismos presentes no leite. No entanto as formas esporuladas, que são altamente resistentes ao calor não podem ser eliminadas, e podendo permanecer no produto (BÜRGER et al., 2011; VIDAL-MARTINS; ROSSI; REZENDE-LAGO, 2005).

Segundo Vidal et al. (2016) a contaminação por microrganismos nos produtos tratados por UAT, pode acontecer devido aos esporos presentes na matéria-prima, o acondicionamento inapropriado e a formação de biofilme. Portanto, a contaminação pode ocorrer antes ou após o tratamento térmico, em toda a cadeia produtiva (REZENDE-LAGO et al., 2007)

O biofilme consiste na aderência, em superfícies de aço inoxidável, de células vegetativas ou de esporos de bactérias termorresistentes, formadoras de esporos, como as bactérias do grupo do *B. cereus* (REZENDE-LAGO et al., 2007; VIDAL et al., 2016) e *C. perfringens* (CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2014).

As células vegetativas, nos biofilmes, têm características como aumento da resistência à antibióticos, agregação em superfícies sólidas, proteção contra fagocitose e células imune, com resistência a tensões físicas e estresses ambientais. Portanto, a capacidade das bactérias se multiplicarem como um biofilme favorece sua sobrevivência no ambiente. *C. perfringens*, por exemplo, com a formação de biofilme protege as células vegetativas do estresse ao oxigênio (CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2014).

Segundo Barreto (2016) 80% do leite cru estão contaminados com esporos de *B. cereus*. Isso ocorre porque a pasteurização antes do tratamento térmico por UAT

faz com que os esporos presentes na matéria-prima germinem, e ao eliminar a microbiota competitiva encontra um ambiente favorável, com isso, ocorre a multiplicação.

3 OBJETIVOS

Avaliar a qualidade microbiológica de produtos tratados por UAT, sendo eles, leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja, comercializados no interior do Estado de São Paulo, por meio de:

- Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos;
- Isolamento e contagem de bactérias do grupo do *Bacillus cereus*;
- Isolamento e contagem de *Clostridium perfringens*;
- Comparação de lotes dos produtos amostrados quanto aos microrganismos esporogênicos analisados;
- Identificação da espécie dos isolados característicos do grupo do *B. cereus* por meio do sequenciamento da região 16s rRNA;
- Determinação da presença de genes de virulência relacionados à produção das toxinas hblA, hblB, hblC, nheA, nheB, nheC, bceT e hbl em isolados confirmados como pertencentes ao grupo do *B. cereus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita das amostras

Setenta e cinco amostras de quatro marcas diferentes foram obtidas aleatoriamente no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no período de abril a dezembro de 2015. Dentre os produtos, 25 amostras foram de leite de cabra integral UAT, 25 amostras de alimento com soja UAT e 25 amostras de bebida de leite de cabra e soja UAT, pertencentes a cinco diferentes lotes de cada produto.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Universidade de São Paulo (FZEA/USP), Câmpus USP Fernando Costa, Pirassununga e posteriormente incubadas a 37°C durante sete dias antes da execução das análises, com a embalagem fechada, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001). Em condições assépticas as amostras foram analisadas individualmente.

4.2 Análises microbiológicas

4.2.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos

Para tal, foram realizadas diluições seriadas (até 10^{-3}) em que 25 mL de cada amostra foi transferido para 225 mL de água peptonada a 0,1%; deu-se a diluição 10^{-1} e as seguintes diluições foram obtidas a partir da transferência de 1 mL da diluição 10^{-1} para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% e assim sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-3} , de acordo com a Instrução

Normativa nº 62 (BRASIL, 2003). Posteriormente, 0,1 mL de cada diluição foram transferidos para placas contendo ágar padrão para contagem (PCA) e espalhados até completa absorção com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram feitas em duplicata e incubadas a 35°C durante 48 horas. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos como UFC.mL⁻¹(APHA, 2001). Contados em contador de colônias, multiplicados pelo fator de diluição (x10) para se ter o valor por mililitro (mL), dividido por 2 para obter as médias das duplicatas, por fim multiplicado pelo fator de diluição, para se obter o valor em UFC.mL⁻¹.

4.2.2 Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de bactérias do grupo *Bacillus cereus*

Para tal, foi realizado, de acordo com Stadhouders (1992), o enriquecimento seletivo de 10 mL de cada amostra transferida para frasco contendo 90 mL de caldo triptona de soja (TSB) adicionado de polimixina B na proporção de 20 µg/mL, seguido de incubação a 30°C por 24 horas. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (até 10⁻¹⁸) em água peptonada a 0,1% e então foi realizado o plaqueamento seletivo, no qual 0,1 mL das diluições foi semeado em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP) e com o auxílio de alça de Drigalsky foi espalhado o inóculo por toda a superfície do ágar até completa absorção, em duplicata, com incubação a 30°C durante 24 horas, segundo Mossel, Koopman e Jongerius (1967). Após a incubação, foram selecionadas placas que tinham colônias típicas, ou seja, aquelas rodeadas por um halo de precipitação opaco, sobre um fundo róseo (Figura 2 A), e foram contadas. Em seguida, foram realizadas a coloração de Gram para verificação das características morfotintoriais de bastonetes Gram-positivos (Figura 2 B) e o teste da catalase. Para obter os resultados em UFC.mL⁻¹ procedeu-se da mesma forma descrita para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos. As placas que apresentaram colônias características de pertencerem ao grupo *B. cereus* foram selecionadas (3 a 5 colônias típicas) (BRASIL, 1993) para análises

moleculares de sequenciamento da região 16s RNA e verificação da presença de genes de virulência.

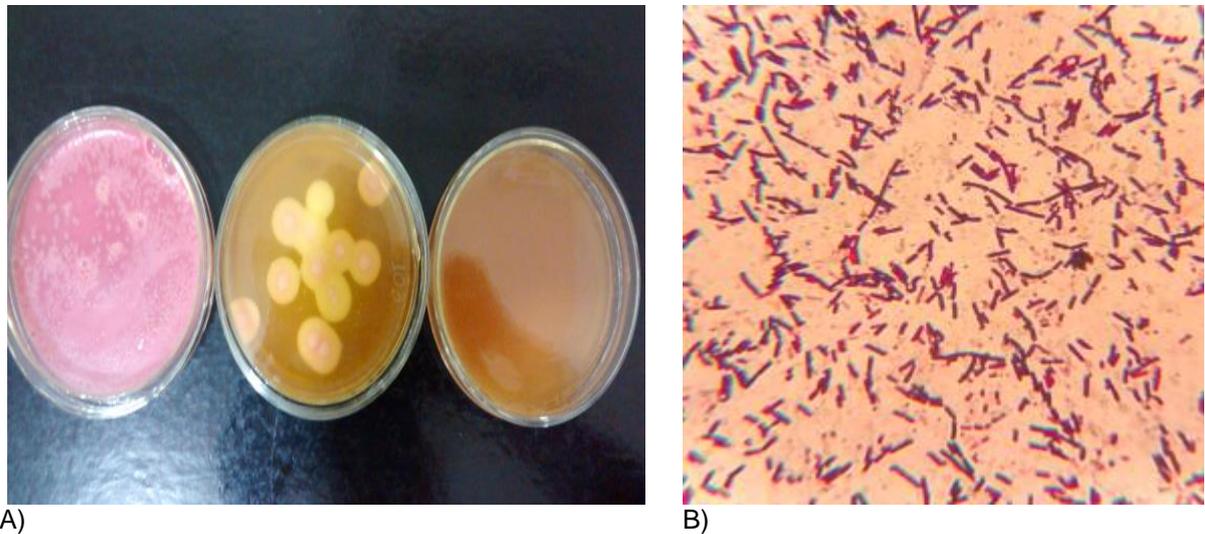


Figura 2. Característica das colônias (A) e coloração dos bastonetes Gram-positivos (B) de bactérias do grupo do *B. cereus* isolado de produtos UAT.

Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

4.2.3 Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de *Clostridium perfringens*

Diluições seriadas (até 10^{-1}) foram realizadas em água peptonada 0,1%. Posteriormente, 1 mL das amostras e 1 mL das diluições 10^{-1} foram inoculados em placas de Petri estéreis e adicionados 20 mL de ágar triptose sulfito cicloserina com gema de ovo (TSC) na temperatura entre 43°C a 48°C, em profundidade e com adição de sobrecamada de TSC. As placas foram preparadas em duplicata e após a homogeneização e solidificação foram incubadas em condição de anaerobiose a 35°C durante 48 horas. Após a incubação, foram selecionadas para contagem placas contendo colônias típicas, caracterizadas por coloração negra, com ou sem halo de precipitação, devido à reação da lecitinase com a gema de ovo presente no ágar TSC (Figuras 3 A e B) (BRASIL, 2003). Os isolados foram submetidos a coloração de Gram (Figura 3 C), teste de catalase e foram selecionadas de 3 a 5 colônias típicas (BRASIL, 1993) para provas bioquímicas (lactose, indol, motilidade,

gelatinase e redução de nitrato) e confirmação de *C. perfringens* (VITTORI et al., 2008). Para obter os resultados em UFC.mL⁻¹ procedeu-se da mesma forma descrita para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos.

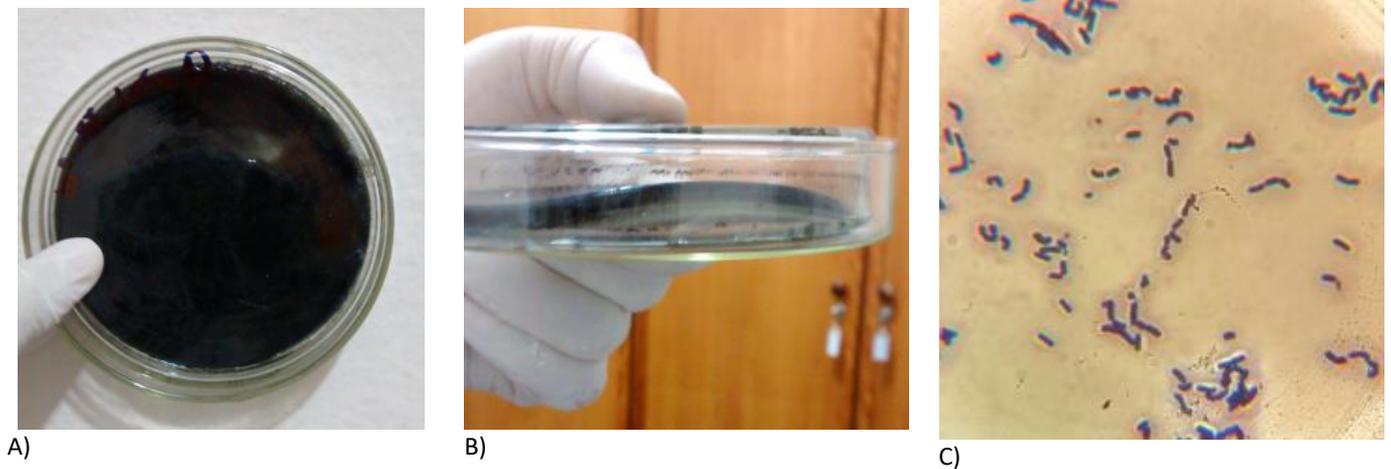


Foto: AQUIVO PESSOAL, 2015.

Figura 3. Característica das colônias (A e B) e coloração dos bastonetes Gram-positivos (C) de *C. perfringens* isolados de alimento com soja.

4.4 Identificação genética dos isolados característicos do grupo do *B. cereus*

Essa etapa foi executada no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com a supervisão do professor Dr. Luís Augusto Nero, no período de janeiro a março de 2016. Foi utilizado 19 isolados característicos do grupo do *B. cereus* para o sequenciamento utilizando amplificação dos genes 16s rRNA para identificação da espécie e 29 isolados para identificação dos genes de virulência utilizando a técnica de PCR.

4.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o kit de extração “Wizard Genomic DNA Purification Kit Protocol - Promega”, conforme as instruções do fabricante. Os isolados foram reativados em tubos contendo 10 mL de BHI (“Brain Heart Infusion Broth”) e incubados a 35°C durante 24 horas. As culturas foram centrifugadas em micro tubos por 2 minutos a 13.000-16.000 xg. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 480 µL 50mM de EDTA, adicionadas de 120 µL de (lisozima) e incubados a 37°C durante 1 hora. Os tubos foram centrifugados novamente a 13.000-16.000 xg e o sobrenadante foi descartado. Após a adição de 600 µL de “Nuclei Lyses Solution”, os tubos foram incubados por cinco minutos a 80°C, depois foi resfriado em temperatura ambiente. Em seguida, 3 µL de “RNase Solution” foram adicionados, para remoção do RNA, inverteu-se os tubos (2 a 5 vezes) para homogeneizar, depois incubou a 37°C por 30 minutos e resfriou em temperatura ambiente. Na fase de *Protein Precipitation* adicionou-se 200 µL de “Protein Precipitation Solution”, homogeneizou durante 20 segundos, incubou em gelo por 5 minutos, e em seguida, centrifugou a 13.000-16.000 xg por 3 minutos. Prosseguiu para a fase de “DNA Precipitation and Rehydration” em que transferiu o sobrenadante para um tubo limpo contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente e homogeneizou invertendo os tubos. Centrifugou 13.000-16.000 xg durante 2 minutos, desprezou cuidadosamente o sobrenadante e deixou escorrer o tubo em um papel absorvente. Adicionou 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente e inverteu os tubos. Centrifugou por 2 minutos a 13.000-16.000 xg, em seguida, aspirou cuidadosamente o etanol e deixou escorrer o tubo em um papel absorvente para o *pellet* secar durante 10-15 minutos. Adicionou 100 µL de “Rehydration Solution” para reidratar o *pellet* de DNA. Incubou durante 1 hora a 65°C ou *overnight* a 4°C, por fim, armazenou o DNA de 2°C a 8°C, de acordo com o kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit Protocol – Promega”, conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, foi feita a quantificação de DNA utilizando o NanoDrop2000 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.4.2 Identificação genética de bactérias do grupo do *B. cereus* usando a amplificação dos genes 16s rRNA

Foram selecionados 19 isolados que apresentaram características fenotípicas de bactérias do grupo do *B. cereus* para identificação genética, provenientes de cada produto amostrado leite de cabra UAT ($n = 4$), alimento com soja UAT ($n = 7$) bebida de leite de cabra e soja UAT ($n = 8$). A técnica de PCR para amplificação da região 16S rRNA foi utilizada, conforme descrito por Favaro et al. (2014).

Os primers utilizados foram 8F (5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG-3') e 1512R (5'-GTG AAG CTT ACG GYT AGC TTG TTA CGA CTT-3'). As reações de amplificações foram preparadas em volume total de 100 μ L, contendo: 5 μ L de DNA dos isolados; 32,9 μ L de H₂O; 10 μ L de buffer; 9,75 μ L dNTPs; 0,5 μ L do primer 8F; 0,5 μ L do primer 1512R; 40 μ L de MgCl₂ (5mM) e 1,35 μ L de Taq polimerase. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C por 10 segundos para desnaturação em 35 ciclos, 61°C por 20 segundos para anelamento, 68°C por 2 minutos para extensão e 72°C por 7 minutos para extensão final e 4°C ∞ (infinito) (TODOROV et al., 2010; FAVARO et al., 2014).

Os produtos de PCR foram purificados com o kit da Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit e Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante, e enviados para sequenciamento genético no Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células Tronco, no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, no Instituto de Biociências (Universidade de São Paulo-USP). Posteriormente, as sequencias foram comparadas às depositadas no Genbank (NCBI), utilizando o algoritmo BlastN.

4.4.3 Identificação dos fatores de virulência dos isolados de bactérias do grupo do *B. cereus*

Os 29 isolados característicos do grupo do *B. cereus* foram submetidos à PCR para identificação de genes relacionados à codificação das enterotoxinas (hblA,

hblB, *hblC*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT* e *hbl*). Para tanto, foram utilizados os primers e condições listados na Tabela 8.

As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 25 µL, contendo: 12,5 µL do kit “GoTaq® Green Master Mix 2X” (Promega Corp.); com 0,5 µL de cada primer (10mM/ µL) (Tabela 8); 9,5 µL de água “nuclease free” e 2 µL do DNA. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto, extensão de 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 5 minutos de acordo com as condições utilizadas por Guinebrière, Broussolle e Nguyen (2002), para os genes *hblA*, *hblB*, *hblC*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT* e *hbl*.

Tabela 8. Características dos primers usados neste estudo.

Primer	Gene	T°C de anelamento do par de primers (°C)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Sequência (5'- 3')	Referência
Forward	<i>hblA</i>	55	1154	5'-AAG CAA TGG AAT ACA ATG GG-3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-AGA ATC TAA ATC ATG CCA CTG C-3'	
Forward	<i>hblB</i>	55	2684	5'-AAG CAA TGG AAT ACA ATG GG -3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-AAT ATG TCC CAG TAC ACC CG-3'	
Forward	<i>hblC</i>	52	740	5'-GAT ACY AAT GTG GCA ACT GC -3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-TTG AGA CTG CTC GYT AGT TG -3'	
Forward	<i>nheA</i>	53	755	5'-GTT AGG ATC ACA ATC ACC GC -3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-ACG AAT GTA ATT TGA GTC GC -3'	
Forward	<i>nheB</i>	48	743	5'-TTT AGT GGA TCT GTA CGC -3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-TTA ATG TTC GTT AAT CCT GC -3'	
Forward	<i>nheC</i>	54	683	5'-TGG ATT CCA AGA TGT AAC G -3'	Guinebrière, Broussolle e Nguyen, 2002
Reverse				5'-ATT ACG ACT TCT GCT TGT GC -3'	
Forward	<i>bceT</i>	58	428	5'-TTA CAT TAC CAG GAC GTG CTT-3'	Rowan et al., 2003
Reverse				5'-TGT TTG TGA TTG TAA TTC AGG-3'	
Forward	<i>hbl</i>	51	1091	5'-GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC -3'	Barreto, 2016; Ehling-Schulz et al., 2006
Reverse				5'- AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT -3'	

Como controle positivo das reações de PCR, foram utilizadas duas cepas de *B. cereus*, sendo uma positiva para o gene *hbl*, que foram cedidas pelo Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e como controle negativo utilizou-se água “*nuclease free*”.

4.3 Análises estatísticas

Os dados quantitativos da análise microbiológica foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilke, para verificação de normalidade. Não havendo normalidade, os dados foram transformados em \log_{10} de $x+1$ e também em raiz quadrada de $x+1$, e novamente submetidos ao teste de normalidade. Como não se observou distribuição normal nem após as transformações, foram utilizados testes não paramétricos para comparar os tipos de amostras e, dentro de cada tipo de amostra, comparar os lotes entre si.

Utilizou-se primeiramente o teste de Kruskal-Wallis para essas comparações. Quando se observou significância ($p < 0,05$), realizou-se a comparação múltipla por meio do teste de Kruskal-Wallis, utilizando o pacote “*pgirmess*” do software R. Quando se verificou significância estatística na análise inicial, porém não na comparação múltipla, empregou-se o teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos que apresentavam maior diferença entre si.

Quanto à análise qualitativa em relação à presença de *B. cereus*, *C. perfringens* e população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, com base nos valores estabelecidos pela legislação, foi aplicado o teste não paramétrico Exato de Fisher.

Todas as avaliações foram feitas com 95% de confiança e foi utilizado o software estatístico livre R, versão 3.3.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos na Figura 4 demonstram a distribuição e a porcentagem dos lotes analisados segundo a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos em produtos tratados por UAT, sendo eles leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja, adquiridos no comércio (supermercados) do interior do Estado de São Paulo. Verificou-se que 80% (4/5) dos lotes de leite de cabra e 100% (5/5) dos lotes de alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja tinham populações acima de 10 UFC.mL^{-1} .

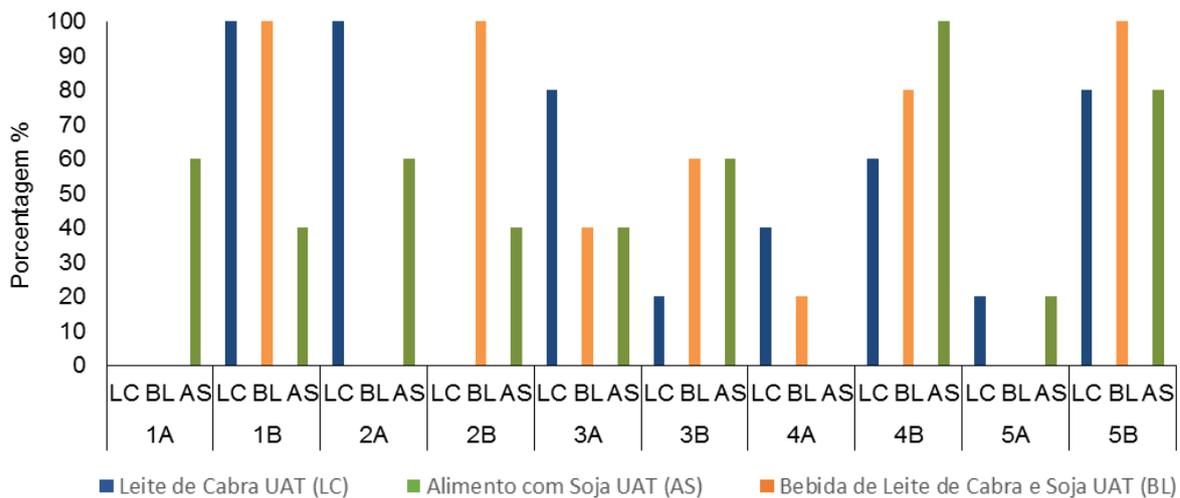


Figura 4. Distribuição e porcentagem dos lotes analisados segundo a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos nos produtos UAT (leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja). As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. Legenda: 1, 2, 3, 4, 5 = Lotes; A (1A, 2A, 3A, 4A, 5A) = $<10 \text{ UFC.mL}^{-1}$; B (1B, 2B, 3B, 4B, 5B) = $1,0 \times 10^1 - 3,5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (LC); $1,0 \times 10^1$ e/ou $1,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (BL); $1,0 \times 10^1$ e/ou $1,0 \times 10^2 - 3,7 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (AS).

Foram encontradas populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos que variaram de $<1,0$ a $3,5 \times 10^4$; $<1,0$ a $3,7 \times 10^4$ e $<1,0$ a $5,5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$, em leite de cabra UAT, alimento com soja UAT e bebida de leite de cabra e soja UAT, respectivamente. Comparando os resultados quantitativos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,113$) entre os três produtos analisados. Deste modo, por serem os microrganismos aeróbios mesófilos indicadores de

condições de processamento, todos os produtos apresentaram má qualidade, pois foram verificadas altas populações de indicadores mesófilos.

Para os resultados qualitativos de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, levando em consideração os produtos que estavam acima de 10 UFC.mL⁻¹ para leite de cabra, bem como alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja, que além de estarem acima de 10 UFC.mL⁻¹ também estavam acima de 100 UFC.mL⁻¹, houve diferença significativa entre os produtos analisados ($p=0,04$), em que o leite de cabra diferiu da bebida de leite de cabra e soja.

Portanto, o leite de cabra apresentou qualidade microbiológica superior à da bebida de leite de cabra e soja, pois em 52% e 88% das amostras, respectivamente, as populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos verificadas eram superiores a 10 UFC.mL⁻¹, mas não diferiu estatisticamente do alimento com soja, em que foram verificadas 64% das amostras acima de 10 UFC.mL⁻¹. Indicando que quando há a mistura de duas proteínas, uma animal e outra vegetal, sendo que o grão de soja por estar contaminado por esporos, aumenta a carga microbiana do alimento, provavelmente devido à germinação de esporos, que são termorresistentes e que estavam na matéria-prima (leite cru e/ou soja). Possivelmente, são esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* que estavam na matéria-prima, pois foi verificada a presença de *B. cereus* em 16% das amostras de leite de cabra e em 44% das amostras de bebida de leite de cabra e soja.

Também se verificou que os lotes 1, 2, 3 e 5 dos produtos de leite de cabra estavam a 90 dias do prazo de validade, que é de 6 meses. No caso do lote 4, faltavam 60 dias no momento em que foram feitas as análises microbiológicas. No leite de cabra UAT não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes quanto às populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos. Com isso, pode-se inferir que o tempo de prateleira não influenciou a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos e sim que esses microrganismos estavam presentes nas matérias-primas utilizadas.

Para os lotes de alimento com soja, no momento das análises faltavam 210 dias (lote 3) para o vencimento; 180 dias (lotos 1 e 5); 90 dias (lote 2); e 60 dias (lote 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes quanto às populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, inferindo-se que,

da mesma forma que para o leite de cabra, o tempo de prateleira não influenciou a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos.

Os produtos de bebida de leite de cabra e soja têm prazo de validade de 7 meses, e no dia em que foram feitas as análises microbiológicas faltavam para seu vencimento 120 dias (lotes 4 e 5), 90 dias (lote 2), 60 dias (lote 1) e 30 dias (lote 3). Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as populações microbianas do lote 2 e dos lotes 4 e 5; sendo assim, apenas na bebida de leite de cabra e soja a data de validade influenciou a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, porém não influenciou o lote 3, faltando apenas 30 dias para seu vencimento, sugerindo que talvez não seja o tempo de prateleira o responsável pela diferença nas populações, mas, sim, a qualidade da matéria-prima utilizada.

O recomendado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do leite UAT (BRASIL, 1996) é que não deve haver microrganismos capazes de proliferar sob condições normais de armazenamento e distribuição, após a incubação a 35-37°C durante 7 dias, na embalagem fechada. Para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos neste produto, o requisito é que, de cinco amostras, nenhuma pode apresentar populações iguais ou superiores a 100 UFC.mL⁻¹.

Já, o recomendado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite de Cabra (BRASIL, 2000) em relação aos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos é que em cinco amostras nenhuma pode apresentar populações iguais ou superiores a 10 UFC.mL⁻¹, ausência de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp.. Esses parâmetros devem ser obtidos nos produtos imediatamente após sua fabricação, a partir de amostras colhidas no estabelecimento processador.

Em contrapartida, a RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não menciona padrões para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, mas preconiza a ausência de patógenos em leite e produtos à base de leite UAT, pressupondo que os padrões foram obedecidos no estabelecimento processador (BRASIL, 2001). Os microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos

são indicadores de condições de processamento, e por isso foram incluídos nas análises.

Sendo assim, se fosse para comparar com o estabelecido pelo MAPA (IN nº37), 80% dos lotes de leite de cabra UAT analisados neste trabalho, em resultados descritos anteriormente, não estariam de acordo com o estabelecido para os microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos. Haja vista, que se as indústrias obedecessem ao padrão estabelecido pelo MAPA a população de microrganismos permaneceria a mesma estando dentro do prazo de validade, e mesmo assim foram verificadas populações superiores a 10^4 UFC.mL⁻¹.

Ao avaliarem a qualidade microbiológica em relação aos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, Oliveira et al. (2005) obtiveram ausência em 16 amostras de leite de cabra UAT; Bersot et al. (2010), em 150 amostras de leite UAT, obtiveram 24% com populações acima de 100 UFC.mL⁻¹; Vidal-Martins, Rossi e Rezende-Lago (2005), em 110 amostras de leite UAT integral, verificaram 22,7% com população acima de 100 UFC.mL⁻¹, e Bürger et al. (2011), em 150 amostras UAT (75 amostras de leite integral e 75 de bebida láctea) analisadas, verificaram que as populações não ultrapassaram $5,2 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Segundo esses autores, a variação da população microbiana pode ocorrer devido a diversos fatores, tais como condições higiênico-sanitárias dos produtos em seu processamento e armazenamento, contaminação após o tratamento térmico, bem como a qualidade da matéria-prima utilizada.

Comparando os resultados deste trabalho em relação aos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos em leite de cabra UAT com resultados obtidos pelos autores descritos acima, verifica-se que o leite de cabra UAT analisado no presente estudo apresentou qualidade microbiológica inferior, demonstrando a necessidade de mais estudos acerca da qualidade microbiológica do leite de cabra UAT.

Para produtos à base de soja, a RDC nº 12 não menciona padrões para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, mas menciona para coliformes termotolerantes, *B. cereus*/mL (de cinco amostras, duas podem ter populações entre 10^2 e 5×10^2 UFC.mL⁻¹) e *Salmonella* spp.. Para comparar os resultados de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos no alimento com soja, não há um

padrão microbiológico específico, e a literatura consultada é escassa sobre aspectos microbiológicos do alimento com soja. Contudo, verificou-se que 100% dos lotes tinham populações acima de 10 UFC.mL⁻¹ e/ou 100 UFC.mL⁻¹, e uma variação de <1,0 a 3,7x10⁴; os lotes 4 e 5 apresentaram maior número de amostras dentro do lote com populações acima de 10 UFC.mL⁻¹ e/ou 100 UFC.mL⁻¹, indicando que a matéria-prima desses lotes apresentavam qualidade ainda inferior.

Almeida et al. (2015) monitoraram a qualidade do alimento com soja produzido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. As análises microbiológicas foram realizadas semanalmente, durante seis meses. Os autores verificaram populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos com médias mensais que variaram de 4,5x10² a 2,3x10³ UFC.mL⁻¹, e, ao compararem com padrões estabelecidos, verificaram que o nível de contaminação das amostras avaliadas estava de acordo aos valores estabelecidos na legislação. Com isso, a população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos deve ser menor do que a estabelecida pela Instrução Normativa n° 62 (BRASIL, 2011), a qual estabelece que de cinco amostras analisadas, duas podem estar entre 4,0x10⁴ e 8,0x10⁴ UFC.mL⁻¹.

Portanto, os resultados de Almeida et al. (2015) são semelhantes aos deste trabalho, em que foram encontradas populações de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos acima de 10⁴ UFC.mL⁻¹, ou seja, superior a 10 e 100 UFC.mL⁻¹, padrões estabelecidos para leite de cabra UAT e bebida láctea UAT, respectivamente.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea, Instrução Normativa n° 16 (BRASIL, 2005), preconiza, para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, que de cinco amostras analisadas nenhuma pode ter populações iguais ou superiores a 100 UFC.mL⁻¹. Esses parâmetros devem ser atendidos em produtos imediatamente após a fabricação. Já, a RDC n° 12 (ANVISA), da mesma forma que para o leite UAT, preconiza ausência de microrganismos patogênicos e não menciona padrões para microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos.

Se fosse para comparar com o estabelecido pelo MAPA (IN n° 16), 100% dos lotes de bebida de leite de cabra e soja UAT estão acima do estabelecido em

relação aos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, tendo em vista que não deveriam multiplicar-se, pois os produtos estão dentro do prazo de validade, e mesmo assim foram verificadas populações superiores a 10^4 UFC.mL⁻¹, evidenciando a má qualidade da matéria-prima utilizada e a ineficiência do tratamento térmico sobre tais microrganismos.

Ao analisar a bebida láctea UAT em relação aos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, Cunha et al. (2013) verificaram populações abaixo de 100 UFC.mL⁻¹ em 54 amostras. No estudo realizado por Burgüer et al. (2011) foi visto que 12% de 75 amostras estavam acima de 100 UFC.mL⁻¹, e com isso o leite UAT apresentou qualidade microbiológica superior à da bebida láctea. Para os autores, a presença de microrganismos em leite submetido ao tratamento UAT pode ser atribuída à contaminação através da germinação de esporos de bactérias, que são termorresistentes e que estavam inicialmente presentes na matéria-prima (leite cru).

Ao comparar o leite de cabra (80% acima de 10 UFC.mL⁻¹) e a bebida de leite de cabra e soja (100% acima de 10 e/ou 100 UFC.mL⁻¹), houve diferença estatisticamente significativa em relação à qualidade dos produtos quanto à população de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos; o leite de cabra apresentou qualidade microbiológica superior à da bebida de leite de cabra e soja, indicando que quando adiciona uma proteína que sabidamente tem qualidade microbiológica inferior, ocorre um aumento na carga microbiana.

Nas Figuras 5 e 6, estão apresentados os resultados referentes ao isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* dos três produtos UAT analisados. Das 75 amostras analisadas, 37,33% (28/75) foram positivas para a presença de bactérias do grupo do *B. cereus*, e 66,66% (10/15) dos lotes analisados estavam contaminados com esses microrganismos. Observou-se a presença de *B. cereus* nos produtos de alimento com soja em 52% (13/25) das amostras e 80% (4/5) dos lotes, seguido da bebida de leite de cabra e soja, com 44% (11/25) das amostras e 60% (3/5) dos lotes, e por último o leite de cabra, com 16% (4/25) das amostras e 60% (3/5) dos lotes.

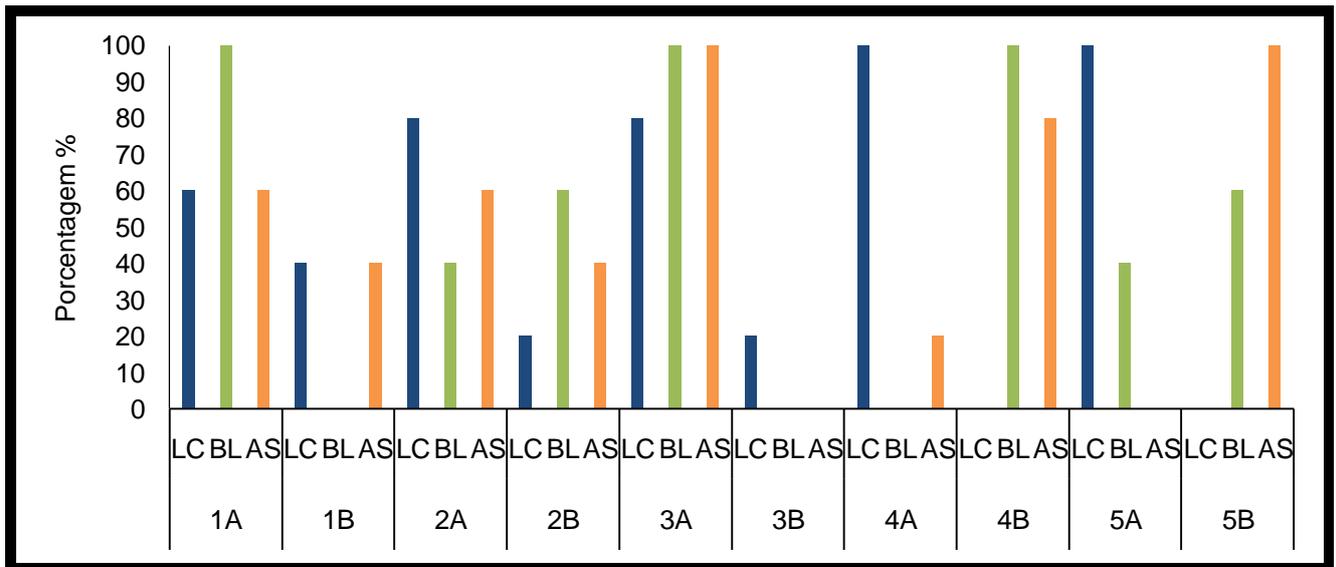


Figura 5. Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* em leite de cabra UAT, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015. Legenda 1, 2, 3, 4, 5 = Lotes; A (1A, 2A, 3A, 4A, 5A) = $<1,0$ UFC.mL⁻¹; B (1B, 2B, 3B, 4B, 5B) = $1,0 - 1,0 \times 10^{19}$ UFC.mL⁻¹ (LC); $1,0 - >10^{18}$ UFC.mL⁻¹ (BL); $1,0 - >10^{18}$ UFC.mL⁻¹ (AS).

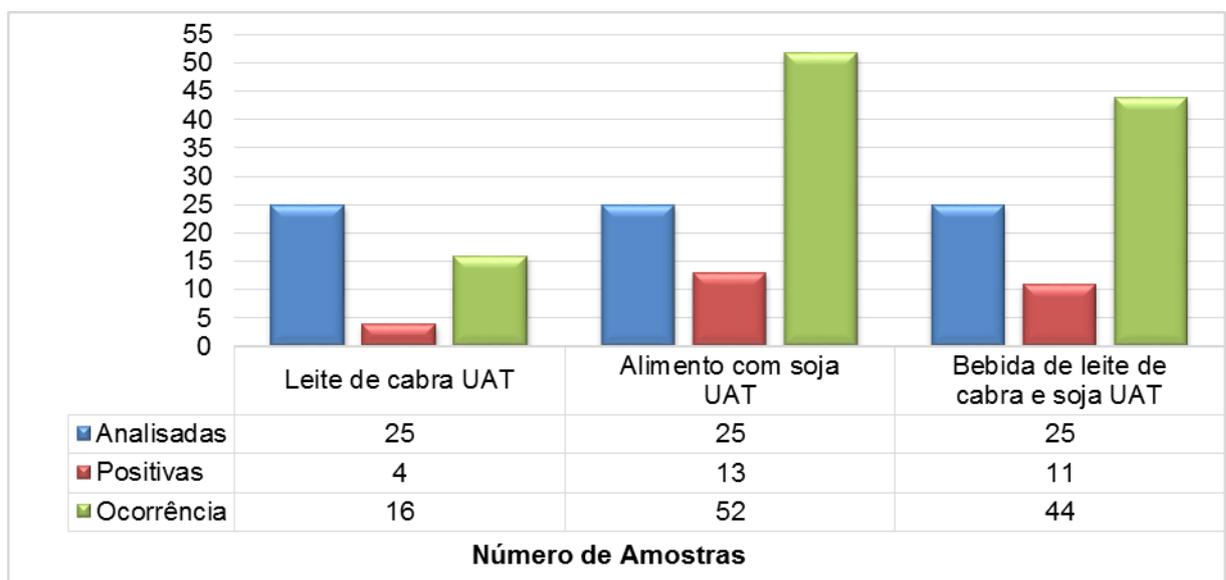


Figura 6. Ocorrência de bactérias do grupo do *B. cereus* em produtos UAT (leite de cabra, alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja) comercializados no interior do Estado de São Paulo. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.

Ao comparar os resultados qualitativos de microrganismos do grupo do *B. cereus*, foi observado que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,023$)

entre os produtos UAT. O leite de cabra (*B. cereus* em 16% das amostras) diferiu estatisticamente do alimento com soja (*B. cereus* em 52% das amostras), e sendo assim pode-se inferir que o grão de soja é uma fonte de contaminação de *B. cereus*, pelo fato de o solo ser um reservatório natural que contamina os grãos facilmente, que quando adicionados ao leite de cabra contamina-o, diminuindo sua qualidade microbiológica e aumentando o risco para a saúde dos consumidores.

As populações de bactérias do grupo do *B. cereus* variaram de $<1,0$ a $1,0 \times 10^{19}$; $<1,0$ a $>10^{18}$ e $<1,0$ a $>10^{18}$ UFC.mL⁻¹, em leite de cabra UAT, alimento com soja UAT e bebida de leite de cabra e soja UAT, respectivamente. Ao comparar os resultados quantitativos de *B. cereus* observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$) entre os produtos analisados, em que o leite de cabra diferiu significativamente do alimento com soja, e o alimento com soja diferiu da bebida de leite de cabra e soja. Assim, o alimento com soja apresentou qualidade microbiológica inferior quanto à população de *B. cereus*, seguido da bebida de leite de cabra e soja e por último do leite de cabra. Dessa forma, a soja, ao ser adicionada ao leite de cabra, proporcionou maior contaminação por microrganismos esporulados.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes de leite de cabra e a bebida de leite de cabra e soja quanto às populações de microrganismos do grupo do *B. cereus*, e pode-se inferir que a data de validade não influenciou a qualidade microbiológica. Houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes 3 e 5 do alimento com soja, mas ambos estavam no mesmo período de validade; com isso, infere-se que a data de validade não influenciou a população de *B. cereus*, mas que esses microrganismos foram veiculadas pela matéria-prima.

A RDC n° 12 preconiza, para leite UAT e bebidas lácteas, ausência de microrganismos patogênicos, e para produtos à base de soja menciona padrões para *B. cereus*/mL: de cinco amostras analisadas, duas podem estar entre 10^2 e 5×10^2 UFC.mL⁻¹. Portanto, 60% dos lotes de leite de cabra UAT e de bebida de leite de cabra e soja UAT, bem como 80% dos lotes de alimento com soja UAT analisados, não estão de acordo ao estabelecido pela legislação vigente.

Segundo Silva et al. (2010), populações de *B. cereus* maiores do que 10^5 UFC.g⁻¹ em um alimento podem representar risco para a saúde dos consumidores,

enquanto Franco e Landgraf (2008) afirmaram que populações de 10^7 e 10^9 UFC.mL⁻¹ ou g⁻¹ de *B. cereus* no alimento podem levar a intoxicação alimentar. Foram verificadas, no presente estudo, populações superiores a 10^{19} UFC.mL⁻¹ em leite de cabra UAT, acima de 10^{18} UFC.mL⁻¹ nos produtos alimento com soja e bebida de leite de cabra e soja, muito acima do valor mencionado por Franco e Landgraf (2008). Isso salienta a necessidade de melhorar a qualidade da matéria-prima adquirida para produzir o leite UAT, as bebidas lácteas e o alimento com soja e estabelecer padrões nacionais quanto às bactérias do grupo do *B. cereus*.

Ao analisarem o leite UAT em relação aos microrganismos pertencentes ao grupo do *B. cereus*, Vittori et al. (2008) isolaram *B. cereus* de 31% de 100 amostras de leite de cabra UAT; Rezende-Lago et al. (2007) isolaram de 13,3% de 30 amostras de leite UAT; Vidal-Martins et al. (2005) isolaram *B. cereus* de 13,8% das amostras de leite UAT. Para eles, é necessário melhorar a qualidade da matéria-prima utilizada para produzir o leite UAT.

Comparando os resultados deste trabalho quanto aos microrganismos do grupo do *B. cereus* em leite de cabra UAT com resultados obtidos pelos autores citados acima, verifica-se que os produtos analisados no presente estudo apresentaram qualidade microbiológica inferior, pois o agente foi encontrado em 60% dos lotes.

Almeida et al. (2015), ao analisarem o alimento com soja, constataram ausência de *B. cereus* em todas as amostras, o que difere dos resultados deste trabalho, no qual foi verificado que 80% dos lotes veiculavam esse microrganismo.

Na literatura consultada não há trabalhos sobre pesquisa de *B. cereus* em bebida de leite de cabra e soja, talvez pelo fato de ser um produto novo no mercado. Cunha, Cunha e Hirooka (1996), ao comparar leite bovino, extrato de soja e mistura de ambos quanto à população de microrganismos do grupo do *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, verificaram aumento da população desses microrganismos na mistura de leite com o extrato de soja. Para eles, a suplementação do leite com a soja, visando a melhora do valor nutricional e a redução do custo ao consumidor, favorece o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos.

Estão descritos na Figura 7 os resultados do isolamento de células vegetativas e/ou esporos de *C. perfringens* nos produtos UAT analisados. Apenas no produto alimento com soja constatou-se a presença desse microrganismo, que foi encontrado em 20% (1/5) dos lotes e em 8% (2/25) das amostras do mesmo lote, e as populações variaram de $<1,0$ a $3,2 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

Ao comparar os resultados qualitativos de *C. perfringens*, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes ($p=1,0$) e entre as amostras ($p=0,32$). É importante ressaltar que esse microrganismo foi isolado de 20% dos lotes avaliados de alimento com soja, e que os consumidores desse produto são, em sua maioria, crianças e idosos, e a presença dessa bactéria em um alimento pode causar DTAs, constituindo risco para a saúde dos consumidores.

Quando comparados os resultados quantitativos de *C. perfringens*, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p=0,1317$) entre os tipos de produtos UAT analisados. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes dos três produtos UAT analisados quanto à população de *C. perfringens*. Inferiu-se que a data de validade não influenciou, indicando que a matéria-prima, possivelmente, já estava contaminada por esse microrganismo.

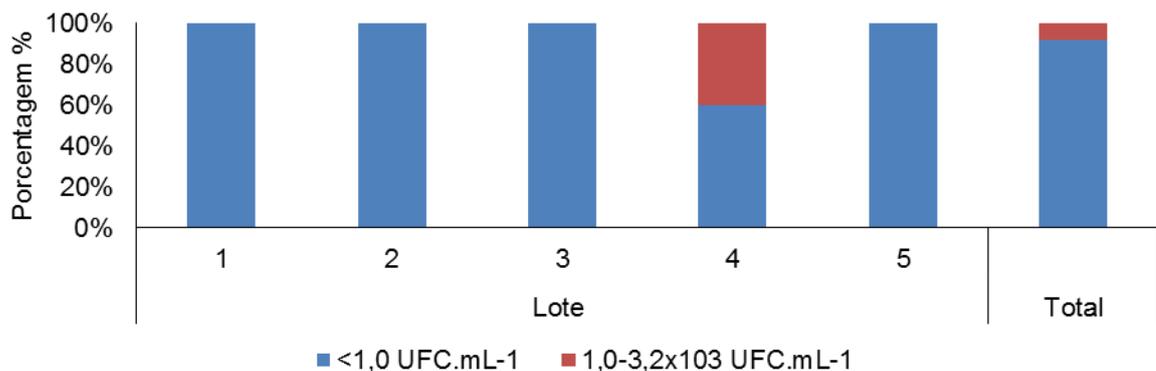


Figura 7. Isolamento e contagem de células vegetativas e/ou esporos de *C. perfringens* em lotes de alimento com soja. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.

Como é estabelecida ausência de microrganismos patogênicos em leite UAT e bebida láctea UAT, 20% dos lotes de alimento com soja apresentaram-se em desacordo com a norma devido ao isolamento de *C. perfringens*. Segundo Berti e Santos (2016), o controle de qualidade dos alimentos baseia-se em garantir um

alimento sem contaminantes físicos, químicos e microbiológicos, portanto, devem ser aplicadas medidas preventivas nas possíveis falhas durante as etapas de tratamento térmico, resfriamento e envase, em que devem ser monitorados o tempo e a temperatura dos equipamentos, a rapidez na etapa de resfriamento e a verificação da assepsia nas máquinas de envase, bem como sua manipulação adequada (BERTI; SANTOS, 2016).

Segundo Silva et al. (2010), os alimentos não devem apresentar populações de *C. perfringens* superiores a 10^5 UFC.g⁻¹, e neste trabalho foram verificadas populações acima de 10^3 UFC.mL⁻¹ em alimento com soja UAT, o qual se encontrava, portanto, dentro dos limites seguros para o consumo. Sendo assim, os produtos UAT analisados tinham problemas quanto às populações de *B. cereus*, porém quanto às de *C. perfringens* eram considerados seguros para serem consumidos.

A literatura consultada a respeito do leite caprino, da bebida de leite de cabra e soja e do alimento com soja em relação a *C. perfringens* é escassa. Vittori et al. (2008), ao avaliarem a qualidade microbiológica de 100 amostras de leite UAT caprino, não observaram presença de *Clostridium* spp.. Van Amson, Haracemiv e Masson (2006) fizeram um levantamento epidemiológico da ocorrência de surtos de DTAs no Estado do Paraná, no período de 1979 a 2000; de um total de 1.195 ocorrências. Encontraram na terceira posição (10,2%) o microrganismo *C. perfringens*, com 122 surtos, em seguida o *B. cereus* na quarta posição, com 75 surtos, em 6,3% das ocorrências, e que os alimentos mais envolvidos nos surtos em geral são alimentos mistos, que incluem matérias-primas de origem vegetal e animal (maionese, panqueca, bolo, farofas). Lukinmaa, Takkunen e Siitonen (2002) relataram dados de DTAs causadas por *C. perfringens* na Finlândia, no período de 1975 a 1999; em 238 surtos, correspondentes a 20% de todos os surtos notificados, os alimentos suspeitos foram carnes preparadas em caçarolas.

Dos 29 isolados, dos produtos UAT analisados, que apresentaram características fenotípicas similares as das bactérias do grupo do *B. cereus*, foram selecionados 19 isolados para a análise da característica genética utilizando o sequenciamento da região 16s rRNA pela técnica de PCR.

Dentre os isolados avaliados, 94,7% (18/19) foram confirmados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e fazem parte do grupo do *B. cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. thuringienses*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis*), sendo 21% (4/19) *B. cereus*.

Com relação ao perfil genético para os genes de virulência produtores de enterotoxinas, dos 29 isolados de bactéria do grupo do *B. cereus* em produtos tratados por UAT, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Características de cepas causadoras de intoxicações alimentares.

Produto	Lote	Amostra	Sequenciamento gene 16s RNA	Genes de virulência								
				<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hbl</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	
Leite de cabra UAT	1	2	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	5	<i>B. cereus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	2	5	<i>B. anthracis</i> <i>B. pseudomycooides</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	4	<i>B. cereus</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. pseudomycooides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	2	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringienses</i> <i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	1	3	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. pseudomycooides</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. thuringienses</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. weihenstephanensis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Alimento com soja UAT	2	2	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	2	3	<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	4	1	<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	3	<i>B. cereus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	4	4	<i>B. cereus</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. thuringienses</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+
	4	5	---	-	-	+	-	+	-	-	+	+
	5	1	---	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	5	2	---	-	-	+	-	+	-	+	+	+
	5	3	---	+	-	+	-	+	+	-	+	+
	5	5	---	+	-	+	-	+	+	+	+	+

Bebida de leite de cabra e soja	1	4	<i>Lysinibacillus macroides</i> <i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+
	2	2	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
	2	3	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
	2	5	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	3	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	+	+	+	-	-	+	-
	4	1	---	-	-	+	-	+	+	+	+
	4	2	---	+	-	+	-	+	-	+	+
	4	3	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
	4	4	---	-	-	+	-	+	+	+	+
	4	5	---	-	-	+	-	+	+	+	+
	5	1	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	-	-	+	-	+	+	-	+
	5	2	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+

Dos 29 isolados de bactérias do grupo do *B. cereus*, 100% foi positivo para pelo menos um dos genes do complexo *hbl* e *nhe* e 75,8% (22/29) positivos para o gene *bceT*.

Em mais detalhes, 96,5% (28/29) foram positivos para *hblC*, 79,3% (23/29) foram positivos para *nheC* e *nheA*, 75,8% positivo para *bceT* (22/29), 68,9% (20/29) para *nheB*, 62% (18/29) para *hblA* e 48,2% (14/29) para os genes *hblB* e *hbl* (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado do perfil genético dos isolados positivos para os genes de virulência produtores de enterotoxinas, dos 29 isolados de bactéria do grupo do *B. cereus* em produtos tratados por UAT. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.

Produtos UAT	Genes de virulência								Isolados
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hbl</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	
Leite de cabra	4	4	3	4	4	4	4	3	4
Alimento com soja	7	6	13	5	10	7	8	8	13
Bebida de leite de cabra e soja	7	4	12	5	9	9	11	11	12
Total	18	14	28	14	23	20	23	22	29
%	62,06	48,27	96,55	48,27	79,31	68,96	79,31	75,86	100

Sendo que dos 4 isolados de bactéria do grupo do *B. cereus* do leite de cabra UAT, 100% foi positivo para os genes *hblA*, *hblB*, *hblC*, *hbl*, *nheA*, *nheB* e *nheC*, e 75% positivo para *hblC* e *bceT* (Figura 8).

De 13 isolados de bactéria do grupo do *B. cereus* do alimento com soja UAT, 100% foi positivo para *hblC*, 76,9% positivo para *nheA*, 61,5% positivo para *nheC* e *bceT*, 53,8% positivo para *hblA* e *nheB*, 46,1% positivo para *hblB* e 38,4% positivo para *hbl* (Figura 8).

E na bebida de leite de cabra e soja UAT, dos 12 isolados de bactéria do grupo do *B. cereus*, 100% foi positivo para o gene *hblC*, 91,6% positivo para *nheC* e *bceT*, 75% positivo para *nheB* e *nheA*, 58,3% positivo para *hblA*, 41,6% positivo para *hbl* e 33,3% positivo para o *hblB* (Figura 8).

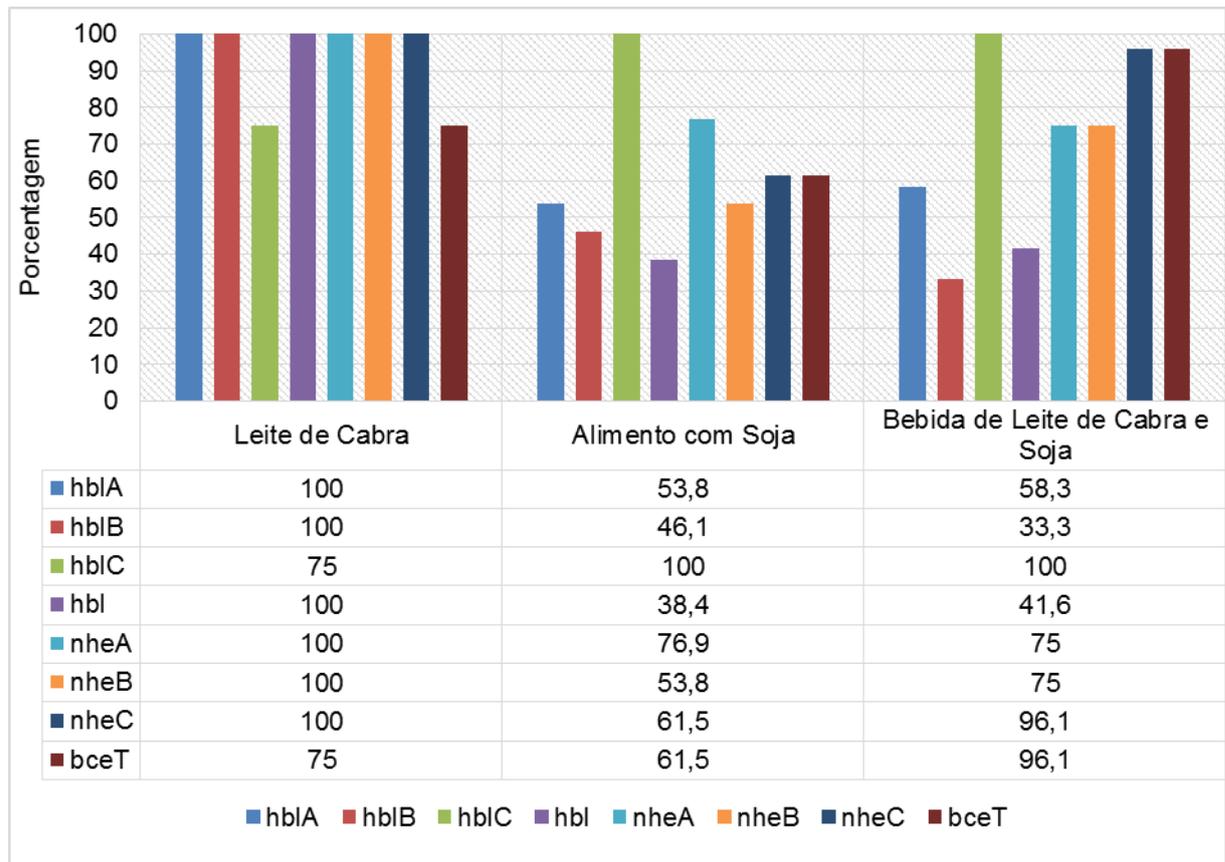


Figura 8. Distribuição dos genes *hblA*, *hblB*, *hblC*, *hbl*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT* nos produtos UAT analisados. As amostras foram adquiridas no comércio em municípios do interior do Estado de São Paulo, no ano de 2015.

Segundo Pessoa e Astolfi-Filho (2014) a enterotoxina não-hemolítica (*nhe*), a hemolisina BL (*hbl*) e a enterotoxina T (*bceT*), frequentemente estão relacionados a surtos de DTAs. Essas enterotoxinas são proteínas que afetam as células do TGI, com isso, as células da parede intestinal secretam grandes quantidades de líquidos e eletrólitos, que são responsáveis pela diarreia. E conforme descrito acima, os três produtos UAT analisados apresentaram a presença desses genes de virulência. Portanto, a presença desses genes em alimentos indica risco para a saúde dos consumidores.

Segundo estudo por Guinebretière, Broussolle e Nguyen (2002), a capacidade do *B. cereus* causar diarreia varia de acordo com as estirpes. Os autores avaliaram os genes de enterotoxinas *hbl* (A, B, C, D), *nhe* (A, B, C), *bceT* e *cytK*, de 88 estirpes de *B. cereus*, sendo 51 estirpes relacionadas com alimentos (isolado de alimentos cozidos refrigerados e vegetais) e 37 estirpes relacionados com intoxicação alimentar (diarreia). Os genes do complexo *hbl* (C, D, A) foram detectados facilmente por PCR nas estirpes de intoxicação alimentar, e para os genes do complexo *nhe* (A, B, C) apenas 22% (8/37) foram negativas para um ou dois dos genes *nhe*, que posteriormente foram confirmadas pelo teste de Southern blotting. Já, para as estirpes de origem alimentar 36% (17/47) dos genes *hbl* e 63% (31/49) para o gene *nhe* foram negativas para uma ou duas do complexo, que posteriormente foram confirmados pelo método de Southern blotting. Guinebretière, Broussolle e Nguyen (2002) afirmaram que por meio da análise realizada com o método de Southern blotting, a heterogeneidade genética entre as diferentes estirpes de *B. cereus*, particularmente, entre as estirpes de origens ambientais, está mais relacionada com o polimorfismo de sequência do que com a falta de um dos genes que compõem os operons *hbl* ou *nhe*.

O que justifica os resultados obtidos neste trabalho, no qual 58,6% (17/29) do gene *hbl* (A, B, C) e 31% do gene *nhe* (A, B, C) foram negativos pelo teste de PCR para um ou dois de cada gene.

Existem poucos dados disponíveis sobre o potencial genético e toxigênico de isolados de *B. cereus* em produtos de origem vegetal, no entanto, Guinebretière, Broussolle e Nguyen (2002) relataram que frequentemente os vegetais são contaminados por *B. cereus*. O que pode ser verificado pelos resultados deste

trabalho, em que amostras de alimento com soja UAT estavam contaminadas com *B. cereus*, e que apresentavam genes de virulência.

Ehling-Schulz et al. (2006) avaliaram os genes de enterotoxinas de 49 estirpes pertencentes a diferentes ramos filogenéticos do grupo do *B. cereus*. Verificaram polimorfismos de alta sequência dos genes de enterotoxina, que ainda não estavam disponíveis nos bancos de dados. Isso pode explicar os resultados falsos negativos observados nos ensaios de PCR dos genes de enterotoxinas *nhe* e *hbl* em trabalho realizado por Guinebretière, Broussolle e Nguyen (2002) e os resultados negativos obtidos neste trabalho. As mutações pontuais que observaram foram encontradas quando desenharam os primers e inseriu a inosina em posições variáveis. Os primers obtidos permitiram a amplificação dos genes de enterotoxina a partir de estirpes que anteriormente foram detectadas apenas por análise de Southern blot, e que podem ser verificadas por PCR multiplex.

Posteriormente, Ehling-Schulz et al. (2006) avaliaram os genes de toxinas de estirpes originados de alimentos (125 isolados) e de laboratório (15 isolados clínicos). Dos isolados de alimentos, 45 foram provenientes de amostras de alimentos (alimentos para bebês e produtos alimentares secos) e 80 isolados em tanques de silo de leite. Para o gene *nhe* foram positivos 46,6% (21/45) dos isolados de alimentos, 37,5% (30/80) dos isolados dos tanques de silo de leite e 33,3% (5/15) dos isolados clínicos. Outro destaque, foi de 42,5% (37/80) dos isolados dos tanques de silo de leite foram positivos tanto para o gene *nhe* quanto para *hbl*.

Portanto, outros métodos podem ser utilizados em conjunto para auxiliar na detecção de genes de virulência que foram negativos pelo método de PCR, obtidos neste estudo.

Segundo Aragon-Alegro et al. (2008), apresentaram o primeiro relatório sobre os perfis genéticos e toxigênico de estirpes de *B. cereus* realizados no Brasil. Avaliaram a capacidade de 155 estirpes de *B. cereus* (33 isolados de alimentos prontos para consumo, 35 de especiarias, 17 de laticínios, 27 de amidos, 31 de farinhas e 12 de outros alimentos) em relação a capacidade de produção de *nhe* e *hbl* por meio de teste de imunoensaio, e teste utilizando o PCR para verificar a presença dos genes do complexo *hbl* e *nhe*, *cytK*, *cytK-1*, *cytK-2* e *ces*.

Os resultados de Aragon-Alegro et al. (2008) foram que de 67,7% (105/155) foi detectado o gene do complexo *hbl* e 96,1% foram positivos para pelo menos um gene do complexo. Para o complexo *nhe*, teve a presença em 99,4% (154/155) e todas foram positivas para pelo menos um gene do complexo. O gene *cytK* foi detectado em 76,8% (119/155) e o *cytK-2* em 79,4% (123/155). Já, os genes *cytK-1* e *ces* não foram detectados. Todas as estirpes apresentaram capacidade toxigênica, sendo um risco para os consumidores. Segundo os autores a presença dos genes de toxinas é uma boa indicação do risco em potencial das estirpes em causar doença, porém não necessariamente indica que irá produzir a toxina.

Zhang et al. (2016) avaliaram 62 estirpes de *B. cereus* quanto a expressão dos genes *nheA*, *hblD* e *cytK*, isolados de alimentos como, macarrão, arroz frito com ovo, arroz frito, arroz, manteiga de maçã, carne de porco, tikoy (bolo de arroz), farinha de milho cozida e fórmula infantil de leite em pó, na província de Jiangxi, na China. Em que de 55% (34/62) abrigaram os três genes de virulência, sendo que a maior porcentagem foi detectada os três genes, com 64% nos isolados de macarrão. Os genes *cytK*, *nheA* e *hblD*, foram encontrados em 79, 87 e 61% dos isolados, respectivamente. Os autores utilizaram uma técnica de PCR de detecção simultânea dos genes de virulência, associado a um pré-tratamento com propídeo monoazida (PMA), que foi capaz de eliminar as células mortas de *B. cereus*, que segundo eles interferem na detecção dos genes de virulência.

B. cereus foi isolado de 20% (46/230) de 230 amostras de leite e produtos lácteos (leite pasteurizado e esterilizado, alimentos para bebês, iogurtes, queijos e cremes), da província de Fars no Irã. Os produtos com maior porcentagem de isolamento de *B. cereus* foi o creme (33,33%), alimentos para bebês (26,66%) e o queijo (18%). Detectaram os genes *nheA*, *nheB*, *nheC* e *hblA* de 97,8% (45/46), os genes *hblC* e *hblD* de 86,95% (40/46), *hblB* de 89,13% (41) e *bceT* de 43,47% (20/46) (KESHTKAR et al., 2016).

Vidal et al. (2016) avaliaram amostras de leite cru, pasteurizado e UAT, colhidas em diferentes pontos ao longo do processo de produção em uma indústria. Isolaram bactérias do grupo do *B. cereus* de 13,8% em leite UAT, e demonstraram de 70,7% capazes de produzir toxinas. Constataram a semelhança genética, avaliada pelo teste de RAPD-PCR, entre as estirpes de *B. cereus* isolados do leite cru,

pasteurizado e UAT, demonstrando que este microrganismo originou da matéria-prima, ou seja, do leite cru. Segundo os autores, esse resultado foi devido a práticas higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Montanhini, Montanhini e Bersot (2014) avaliaram 23 isolados de *B. cereus*, originados de leite em pó e leite pasteurizado. Avaliaram a capacidade das estirpes de produzir as toxinas hbl (A, C, D), em duas temperaturas, a 30°C e a 10°C. Todas as estirpes produziram a toxina a 30°C e 9 (39%) estirpes produziram a toxina na temperatura a 10°C. Segundo os autores, os esporos de estirpes mesofílicas germinam melhor e mais rapidamente do que as estirpes psicotróficas. Porém, mesmo sendo a temperatura de 30°C melhor para a produção da toxina do complexo hbl, o *B. cereus* pode produzir a toxina na temperatura de refrigeração, o que indica a habilidade de adaptação nestas condições.

Os produtos avaliados neste trabalho, ficavam armazenados em temperatura ambiente, ou seja, em temperatura mesofílica, portanto, segundo os autores acima, os esporos germinam facilmente e ocorre melhor a produção de toxina. Por isso, verificou-se uma alta porcentagem de genes de virulência nos isolados, sendo 100% positivo para os genes do complexo *hbl* e *nhe*, e 75,8% para o gene *bceT*.

Segundo Montanhini, Montanhini e Bersot (2015), a diversidade das características genéticas e/ou a expressão das toxinas pelas estirpes, podem produzir diferentes níveis de toxicidade. Os autores relataram cerca de 40% de estirpes de *B. cereus* podem abrigar o gene *hbl* (A, C, D), e que muitos estudos verificaram o *B. cereus* com o gene *hbl*, de isolados de produtos lácteos.

Barreto (2012) obteve 116 isolados de *Bacillus spp.*, de amostras oriundas da cadeia produtiva do leite, como, de tanques de armazenamento, latão, mão de ordenadores, teteiras, ar do ambiente, água e leite. Obtiveram mais isolados de *Bacillus spp.* em leite do tanque de resfriamento, segundo os autores foi devido à fatores como contaminação pelo ar e da falta de higienização. Dos 116 isolados 32 (27,5%) foi confirmado ser *B. cereus*. Foi verificado o gene *nhe* de 47% (15/32) dos isolados, e 22% (7/32) o gene *cytK*, sendo que 87% (13/15) e 57% (4/7) foi isolado a partir do leite, respectivamente.

Barreto (2016) avaliou 129 amostras de leite (pasteurizado, em pó e UAT) e produtos lácteos (queijo ricota, sobremesas lácteas, bebidas lácteas e leite

achocolatado), comercializados em supermercados da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. Verificou que 53,4% (69/129) das amostras eram *B. cereus*, 98% (68/69) apresentaram o gene *nhe*, 57% (40/69) apresentaram o gene *hbl* e o gene *cytK* foi verificado em 100% (69/69) dos isolados. De 21 amostras de leite UAT analisadas, 33,3% (7/21) foram positivas para *B. cereus*, 100% (7/7) foram positivas para os genes *nhe* e *cytK*, e 42,8 (3/7) positiva para *hbl*. Resultado semelhante ao deste trabalho em relação ao gene *nhe* que de 100% dos isolados abrigavam este mesmo gene.

Segundo Barreto (2016) quase todas as estirpes de *B. cereus* conhecidas abrigam o gene *nhe* e cerca de 50% abrigam o gene *hbl*, e uma porcentagem de 40% a 60% abrigam os dois genes simultaneamente, confirmado por trabalho de Ehling-Schulz et al. (2006), citado anteriormente, em que verificaram 42,5% dos isolados de *B. cereus* em que abrigavam os dois genes simultaneamente. Diferente dos resultados deste trabalho, em que foi verificado 100% dos isolados abrigavam pelo menos um gene de cada complexo *nhe* e *hbl* simultaneamente, sendo que estes isolados foram de produtos tratados por UAT, indicando o risco à saúde dos consumidores e que devem melhorar a qualidade da matéria-prima e a qualidade higiênico-sanitária destes produtos.

Segundo Rowan et al. (2003) mais de 200 estirpes de *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* testadas abrigavam a enterotoxina *hbl*. Avaliaram 11 espécies de *Bacillus* spp. isolados de amostras associadas a infecções veterinárias severas (mastites e abortos em ruminantes), que não eram de origem gastrointestinal, em que verificaram a presença e expressão de enterotoxinas diarreicas (*hbl* e *bceT*). Verificaram que em cinco (45,4%) estirpes de *B. cereus* e uma estirpe de *B. coagulans* abrigavam tanto o gene *bceT* quanto *hbl* (A, C, D). Diferente do resultado obtido neste estudo, que apresentou 75,8% (22/29) dos isolados de produtos UAT a presença dos dois genes simultaneamente, indicando que as estirpes isoladas de origem alimentar têm abrigado maior porcentagem de genes de virulência.

6 CONCLUSÃO

- Os diferentes produtos UAT podem trazer riscos para a saúde dos consumidores, pois foram verificadas alta contagem de microrganismos patogênicos.
- Tendo em vista que todos os produtos apresentaram populações elevadas de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, observou-se que a qualidade higiênico-sanitária dos produtos foi insatisfatória.
- Constatou-se que a qualidade microbiológica tornou-se ainda mais comprometida, quanto a presença dos microrganismos patogênicos e esporogênicos do grupo do *B. cereus* e *C. perfringens*, pois de acordo com a RDC nº 12, preconiza-se para leite UAT e bebidas lácteas, ausência de microrganismos patogênicos.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes dos produtos UAT analisados quanto a população de bactérias do grupo do *B. cereus* e de *C. perfringens*, com isso, provavelmente, esses microrganismos foram veiculadas pela matéria-prima.
- Os produtos suplementados com soja, com o propósito de melhorar o valor nutricional e tornar acessível às pessoas alérgicas à proteína do leite ou intolerantes à lactose, tiveram a carga microbiana aumentada, podendo causar DTAs.
- Foi confirmada a presença da espécie de *B. cereus* de 21% (4/19) dos isolados analisados, e que 94,7% (18/19) fazem parte do grupo do *B. cereus*.
- Os genes de virulência verificados dos 29 isolados de bactérias do grupo do *B. cereus*, em 100% foi positivo para pelo menos um do gene complexo *hbl*, 96,5% (28/29) positivo para pelo menos um do gene do complexo *nhe* e 75,8% (22/29) positivos para o gene *bceT*.
- Uma vez que os maiores consumidores desses produtos são crianças e idosos, os resultados obtidos neste trabalho devem ser motivo de preocupação para as autoridades sanitárias. Esses resultados são necessários para apresentar novos dados sobre a ocorrência e distribuição dos genes de toxinas em

diferentes alimentos UAT analisados, e contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia das bactérias do grupo *B. cereus* capazes de causar DTAs.

7 REFERÊNCIAS

AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. **Microbiology**, v. 141, n. 4, p. 983-988, 1995.

ALMEIDA, J. F. D.; CELIBERTO, L. S.; MOTTA, V. G. S. D.; ROSELINO, M. N.; CANAAN, J. M. M.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U. Controle de qualidade e avaliação dos efeitos do consumo do leite de soja produzido na UniverSoja. In: CONGRESSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA UNESP. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2015. p. 1-7. **Anais eletrônicos...** Jaboticabal: UNESP, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/142370/ISSN2176-9761-2015-01-07-almeida.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Anvisa avalia medidas para recolhimento de Toddynho**. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-avalia-medidas-para-recolhimento-do-toddynho/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=en_US>. Acesso em: 10 nov. 2016.

APHA. American Public Health Association. Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, p.63-67, 2001.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; PALCICH, G.; LOPES, G. V.; RIBEIRO, V. B.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2115-2118, 2008.

ASH, C.; FARROW, J. A.; DORSCH, M.; STACKEBRANDT, E.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 343-346, 1991.

BARRETO, J. M. O. **Fatores de virulência de *Bacillus cereus* isolado na cadeia produtiva do leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnológica de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2907/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

BARRETO, J. M. O. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em produtos lácteos comercializados na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, determinação de genes de virulência e produção de toxina.** 2016. 58 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7766>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

BASTOS, M. S. R. Leite longa vida UHT: aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Higiene alimentar**, v. 13, n. 66/67, p. 32-6, 1999.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, 1995.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 980-986, 1994.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus* hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 233-239, 1997.

BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 431-439, 2004.

BERTI, R. C.; SANTOS, D. C. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 23-38, 2016.

BERSOT, L. D. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná–Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**, p. 135-148, 2008.

BINSFELD, B. D. L.; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B.; YONAMINE, G. H.; GUSHKEN, A. K. F.; JACOB, C. M. A. Conhecimento da rotulagem de produtos industrializados por familiares de pacientes com alergia a leite de vaca. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 3, p. 296-302, 2009.

BLUM, J. E. S.; RAMONI, E. O.; BALBI, M. E. Elaboration of aqueous extract (milk) seed from germinated sunflower (*Helianthus annus L.*, *Asteraceae*). **Visão Acadêmica**, v. 17, n. 1, 2016.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; TWEDT, R. M. Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 943-945, 1975.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 101, 11 de agosto de 1993. **Métodos analíticos para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – Métodos microbiológicos**. Diário Oficial, 11 de agosto de 1993.

BRASIL. Portaria n. 146, de 7 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos**. Ministério de Estado da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, Diário Oficial da União, Brasília, 7 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n° 370 de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UAT (UHT)**. Brasília, p. 9, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa, n. 37, de 31 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Produção, identidade e qualidade do leite de cabra**. Diário Oficial da União, 08 de novembro de 2000. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Revoga Portaria n. 451, de 19 de setembro de 1997. **Padrões microbiológicos sanitários para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de julho de 1998. art. 4º, p. 1-48.

BRASIL. Resolução RDC n. 91, de 11 de maio de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico, Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da União, 11 de maio de 2001.

BRASIL. Instrução Normativa, n. 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da União, de 18 de setembro de 2003, Seção 1, Página 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea.** Diário Oficial da União, 23 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. **Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.** Diário Oficial da União, Brasília, de 29 de dezembro de 2011.

BÜRGER, K. P.; CARVALHO, A. C. F. B.; COLEONE, A. C.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. L.; BÜRGER, C. P.; FERREIRA, L. M. Características microbiológicas de leite integral e bebida láctea processados por UAT (Ultra Alta Temperatura) ao longo do período de validade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 129-136, 2011.

CAMARA, F. A.; WESCHENFELDER, S. Leite UHT integral: avaliação da rotulagem nutricional e dos padrões de identidade e qualidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p. 268-279, 2014.

CAMARGO, D. S.; ALVES, G.; GARCIA, S.; MIZUBUTI, I. Y. Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 45-51, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: Potencial de Uso na Dieta Brasileira.** Londrina, PR: EMBRAPA- CNPSo, p. 16, 1998. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57913/1/Documentos-113.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

CASSANEGO, D. B.; GUSSO, A. P.; MATTANNA, P.; SILVA, S. V.; PELLEGRINI, L. G. Características físico-químicas e sensoriais de bebida láctea de leite de cabra. In: XV SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINOCULTURA, III SIMPÓSIO PARANAENSE DE CAPRINOCULTURA, III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE OVINOS E CAPRINOS, 2012, **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 7, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/viewFile/1468/931>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

CATUNDA, K. L. M.; AGUIAR, E. M.; MEDEIROS, J. G. Revisão de literatura Leite caprino: características nutricionais, organolépticas e importância do consumo. **Revista Centauro** v. 7, n. 1, p. 34-55, 2016.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. ***Clostridium perfringens***. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

CELIA, A. P.; MORAES, J. F. D.; SCHMIDT, V. Consumo de produtos lácteos de origem não bovina no sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 25-30, 2012.

CENACHI, D. B.; FURTADO, M. A. M.; BELL, M. J. V.; PEREIRA, M. S.; GARRIDO, L. A.; OLIVEIRA PINTO, M. A. Aspectos composicionais, propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais do leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 12-20, 2011.

CHANDAN, R. C.; ATTAIE, R.; SHAHANI, K. M. **Nutritional aspects of goat milk and its products**. In: Proc. V. International Conference Goats, vol. II: part II, New Delhi, India, p. 399, 1992.

CHARLEBOIS, A.; JACQUES, M.; ARCHAMBAULT, M. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 183, 2014.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1751-1770, 2003.

CHOMA, C.; GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS microbiology letters**, v. 217, n. 1, p. 115-119, 2002.

COSTA, R. G.; BELTRÃO FILHO, E. D.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MEDEIROS, A. N.; OLIVEIRA, C. J. B.; GUERRA, I. C. D. Características físico-químicas do leite de cabra comercializado no estado da Paraíba, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 2, p. 136-141, 2007.

CORNILLOT, E.; SAINT-JOANIS, B.; DAUBE, G.; KATAYAMA, S. I.; GRANUM, P. E.; CANARD, B.; COLE, S. T. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. **Molecular microbiology**, v. 15, n. 4, p. 639-647, 1995.

CORDEIRO, P. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. **A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado**. IN: LEITE DE CABRA NO BRASIL, SEU MERCADO, COMERCIALIZAÇÃO E PRODUÇÃO, X ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MEDIA MOGIANA, ESPÍRITO SANTO DO PINHAL, Maio, 2009. Disponível em: <<http://www.caprtec.com.br/pdf/LeitedeCabranoBrasil.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2016.

CUNHA, M. L. R S.; CUNHA, A. R.; HIROOKA, E. Y. Leite bovino e extrato de soja: Aspecto microbiológico- Nutricional da suplementação de produtos de origem animal com soja. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.17, n.1, p. 99-104, mar. 1996.

CUNHA, A. F.; LAGE, A. D.; PEREIRA E ARAÚJO, M. M.; SANTOS, R. D. P.; RESENDE, G. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite UAT por ATP-Bioluminescência. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 595-600, 2013.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular nutrition & food research**, v. 48, n. 7, p. 479-487, 2004.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHÁN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS microbiology letters**, v. 260, n. 2, p. 232-240, 2006.

EMBRAPA SOJA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Soja na Alimentação**. Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSO. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23>. Acesso em: 06 nov. 2016.

FAGERLUND, A.; WEEN, O.; LUND, T.; HARDY, S. P.; GRANUM, P. E. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2689-2697, 2004.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; HUE, I.; DOUSSET, X.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. **Food microbiology**, v. 38, p. 228-239, 2014.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Artmed, 2006.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 1986, p. 145.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, cap. 4, p. 42.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. de; GALINDO, G. A. R. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, n. 2, p. 212-218, 2005.

FOSCHINO, R.; INVERNIZZI, A.; BARUCCO, R.; STRADIOTTO, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 02, p. 213-225, 2002.

FONSECA, C. R.; PORTO, E.; DIAS, C. T. S.; SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 944-949, 2006.

GASPARIN, F. S. R.; CARVALHO, J. M. T.; ARAUJO, S. C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, 2010.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, n. S23, 1994.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS microbiology letters**, v. 157, n. 2, p. 223-228, 1997.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, n. 2, p. 225-229, 1999.

GRIFFITHS, M. W.; SCHRAFT, H. ***Bacillus cereus* Food Poisoning**. In: DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T.; STEIN, R. A.; CLIVER, D. O.; RIEMANN, H. P. Foodborne Disease. 3. ed. Elsevier Science, London, 2014. cap. 20, p. 395.

GUERREIRO, L. **Dossiê técnico: produtos de soja**. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro (REDETEC), Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT), 2006. p. 26 (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas-SBRT). Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjg>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

GUINEBRETIERE, M. H.; BROUSSOLLE, V.; NGUYEN, C. T. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3053-3056, 2002.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 155-163, 2004.

HANSEN, B. M.; HOIBY, P. E.; JENSEN, G. B.; HENDRIKSEN, N. B. The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. **FEMS microbiology letters**, v. 223, n. 1, p. 21-24, 2003.

HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS microbiology letters**, v. 197, n. 1, p. 47-51, 2001.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Review**, n.3, p. 66-98, 1990.

HEINRICH, J. H.; BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6760-6766, 1993.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1605-1630, 1980.

KAPILA, R.; KAVADI, P. K.; KAPILA, S. Comparative evaluation of allergic sensitization to milk proteins of cow, buffalo and goat. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1, p. 191-198, 2013.

KESHTKAR, M.; MOMTAZ, H.; GHAVAMIZADEH, M.; RAHIMI, E. Detection of Enterotoxin Genes Profile of *Bacillus cereus* in Pasteurized and Sterile Milk, Baby Food and Dairy Products. **International Medical Journal**, v. 23, n. 2, 2016.

KUCHTÍK, J.; KRÁLICKOVÁ, S.; ZAPLETAL, D.; WEGLARZY, K.; SUSTOVÁ, K.; SKRZYŻALA, I. Changes in physico-chemical characteristics, somatic cell count and fatty acid profile of Brown Short-haired goat milk during lactation. **Animal Science Papers and Reports**, v. 33, n. 1, p. 71-83, 2015.

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A. Microbiologie: le tube digestif, l'eau et les aliments. **Paris: Doin**, 1989, p. 525.

LUND, T.; DE BUYSER, M.-L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.

LUKINMAA, S.; TAKKUNEN, E.; SIITONEN, A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3744-3749, 2002.

MACFADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. **Williams & Wilkins Co.**, 1976.

MANDARINO, J. M. G.; RUFINO, C. F. G. **Soja, saúde e alimentação: perguntas e respostas mais frequentes**. Londrina, PR: EMBRAPA – Soja, 2003. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104926/1/Documentos-201.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 295-298, 2008.

MAZIERO, M. T.; VIANA, C.; MONTANHINI NETO, R.; PINTO, J. P. D. A. N.; BERSOT, L. D. S. Incidência e avaliação da atividade lipolítica e proteolítica de *Bacillus cereus* em leite UHT. **Pubvet**, p. 1-12, 2011.

MCCLANE, B. A. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Toxicon**, v. 34, n. 11, p. 1335-1343, 1996.

MCCLUNG, L. S. Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chicken: preliminary note. **Journal of bacteriology**, v. 50, n. 2, p. 229, 1945.

MCDONEL, J. L. *Clostridium perfringens* toxins (type a, b, c, d, e). **Pharmacology & therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 617-655, 1980.

MONTANHINI, M. T. M.; MONTANHINI NETO, R.; BERSOT, L. S. Enterotoxigenic potential of *Bacillus cereus* strains isolated from dairy products at different incubation temperatures. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 1315-1317, 2014.

MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**, v. 47, n. 1, p. 39-49, 2003.

MORRIS, W. E.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. Toxins of *Clostridium perfringens*. **Revista Argentina de Microbiologia**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 41, n. 4, p. 251-260, 2009.

MOSSEL, D. A. A.; KOOPMAN, M. J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied microbiology**, v. 15, n. 3, p. 650-653, 1967.

OCAK, I.; GUNEY, S. Consumer Preference for Goat Milk in Turkey. **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science**, v. 2(7), pp. 181-188, 2013.

OLIVEIRA, M. A.; FÁVARO, R. M. D.; OKADA M. M.; ABE, L. T.; IHA, M. H. Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, n. 1, p. 104-109, 2005.

PAIVA, E. P.; FAI, A. E. C.; SOARES, D. S.; STAMFORD, T. L. M.; PERNAMBUCO, R. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 170-171, p. 87, 2009.

PAPALEO, V. T. **As propriedades da proteína de soja na alimentação humana**. 2004. 44f. Monografia (Especialidade em Qualidade em Alimentos) - Centro de Excelência em Turismo da Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

PARK, Y. W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 14, n. 2, p. 151-159, 1994.

PARK, Y. W.; JUÁREZ M., RAMOS M.; HAENLEIN G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-113, 2007.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PELLEGRINI, L. G.; CASSANEGO, D. B.; GUSSO, A. P.; MATTANNA, P.; SILVA, S. V. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. In: XV SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINOCULTURA, III SIMPÓSIO PARANAENSE DE CAPRINOCULTURA, III SIMPÓSIO SUL BRASILEIRO DE OVINO E CAPRINOS. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 7, n. 1, 2012.

PENHA, L. A. O.; FONSECA, I. C. B.; MANDARINO J. M.; BENASSI, B. T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, 2007.

PESSOA, M. C. F.; ASTOLFI-FILHO, S. Prevalência de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus thuringiensis* e métodos para sua caracterização genotípica: revisão1. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 47-64, 2014.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PRATA, L. F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Higiene alimentar**, v. 12, n. 54, p. 10-5, 1998.

PRÉVOST, G. The bi-component staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysins (toxins). **The comprehensive sourcebook of bacterial toxins**, ed. 2nd. Academic Press, Inc., London, England, p. 402-418, 1999.

RABINIVITCH, L.; VIVONI, A. M. *Bacillus* e o *Bacillus cereus* com suas facetas como bactérias esporuladas Gram-positivas. **Ciências Farmacêuticas**, p. 8-10, 2016.

REMEUF, F.; LENOIR, J. Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. **International Dairy Bull.** v. 202, p. 68, 1986.

REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1563-1569, 2007.

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 229-235, 2001.

ROBINSON, R. K.; PHILL, M. A. D. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, p.18-32, 1987.

ROWAN, N. J.; CALDOW, G.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2372-2376, 2003.

RYAN, P. A.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2551-2556, 1997.

SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. Contagem de mesófilos e psicrotóxicos em amostras de leite pasteurizado e UHT. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, n. 377, 65: 29-35, 2010.

SARKER, M. R.; CARMAN, R. J.; MCCLANE, B. A. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 5, p. 946-958, 1999.

SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A. R. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 25-7, 1996.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B. D.; LEITE, O. D. S. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010, cap. 11, p.167.

SONG, L.; HOBAUGH, M. R.; SHUSTAK, C.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; GOUAUX, J. E. Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859-1865, 1996.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin-International Dairy Federation**, p. 15-15, 1992.

STEINTHORSDOTTIR, V.; HALLDÓRSSON, H.; ANDRÉSSON, O. S. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 28, n. 1, p. 45-50, 2000.

TALLENT, S. M.; RHODEHAMEL, E. F.; HARMON, S. M.; BENNETT, R. W. **Bacteriological Analytical Manual, *Bacillus cereus***, Chapter 14, BAM. U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070875.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TODOROV, S. D.; WACHSMAN, M.; TOMÉ, E.; DOUSSET, X.; DESTRO, M. T.; DICKS, L. M. T.; DRIDER, D. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 869-879, 2010.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206 p.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná–Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotec**, v. 30, n. 6, p. 1139-45, 2006.

VERGNE, M. **Leite de cabra funcional oferece vantagens adicionais para a saúde**. 2014. Embrapa, Segurança alimentar, nutrição e saúde. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1982494/leite-de-cabra-funcional-oferece-vantagens-adicionais-para-a-saude>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 396-400, 2005.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. **Leite UAT: estudo das características microbiológicas e físico-químicas e investigação epidemiológica de *Bacillus cereus* ao longo de sua produção e vida comercial**. 2005. 134f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2005.

VIDAL, A. M. C.; ROSSI JUNIOR, O. D.; ABREU, I. L. D.; BÜRGER, K. P.; CARDOSO, M. V.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; D' ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2016.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; POIATTI, M. L.; PIGATTO, C. P.; CHIODA, T. P.; RIBEIRO, C. A. M.; GARCIA, G. R.; RAGAZANI, A. V. F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, 2008.

ZAKIR, M. M.; FREITAS, I. R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 3, 2015.

ZHANG, Z.; FENG, L.; XU, H.; LIU, C.; SHAH, N. P.; WEI, H. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1047-1055, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10147>>.

WOJSLAW, E. B. **Tecnologia de Alimentos**. Conselho Editorial. Brasília-DF. 2012. Disponível em: <http://lms.ead1.com.br/webfolio/Mod4916/tecnologia_de_alimentos_v1.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

8 IMPLICAÇÕES

Nos produtos UAT analisados foram isolados microrganismos patogênicos, e portadores de genes de virulência, capazes de causar DTAs, principalmente em crianças e idosos, que tem a imunidade diminuída. Muitas vezes os consumidores procuram produtos variados para complementar sua alimentação e encontram no comércio produtos novos a fim de alcançar públicos específicos, como alérgicos a proteína do leite (porção da caseína alfa s1 e beta-lactoglobulina) e intolerantes a lactose, isto serve de alerta às autoridades sanitárias.

Há a necessidade de legislação específica na indústria, no qual o órgão é o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), tanto em relação a microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, que são indicadores de qualidade higiênico-sanitária, quanto para microrganismos patogênicos e esporogênicos, como bactérias do grupo do *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*, que são esporogênicos, termorresistentes a altas temperaturas como o tratamento por UAT.

Como o alimento com soja ao ser adicionado ao leite de cabra aumentou a carga microbiana do alimento, pois já é sabido que os grãos de soja geralmente são contaminados com microrganismos esporogênicos, há a necessidade desses grãos serem submetidos a processos capazes de eliminar estes esporos do alimento.

Existem alguns sanitizantes que são aprovados pelo FDA ("*Food Drug and Administration*") para frutas e vegetais frescos minimamente processados, sendo eles o hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio. Sendo o peróxido de hidrogênio e o ácido peracético utilizados como desinfetantes ou esterilizantes, pois são eficazes contra bactérias, esporos de bactérias, vírus e fungos, mesmo quando usado em baixas concentrações. Portanto, há a necessidade de desenvolver novas tecnologias para o tratamento dos grãos de soja.