

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**

Ludmila Lizziane de Souza Lima

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE *BACILLUS CEREUS* EM LEITE EM PÓ  
RECONSTITUÍDO SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS E  
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Belo Horizonte

2021

Ludmila Lizziane de Souza Lima

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE *BACILLUS*  
*CEREUS* EM LEITE EM PÓ RECONSTITUÍDO  
SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS  
TÉRMICOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Verônica Ortiz  
Alvarenga

Belo Horizonte  
2021

L732e Lima, Ludmila Lizziane de Souza.  
Estudo do comportamento de *Bacillus cereus* em leite em pó reconstituído submetidos a diferentes tratamentos térmicos e condições de armazenamento / Ludmila Lizziane de Souza Lima. – 2021.  
72 f. : il.

Orientadora: Verônica Ortiz Alvarenga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. *Bacillus cereus* – Teses. 2. Segurança alimentar e nutricional – Teses. 3. Microbiologia de alimentos – Teses. 4. Leite em pó – Teses. 5. Leite – Qualidade – Teses. 6. Microrganismos – Teses. 7. Modelos matemáticos – Teses. I. Alvarenga, Verônica Ortiz. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:576.163



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE BACILLUS CEREUS EM LEITE EM PÓ RECONSTITUÍDO SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

LUDMILA LIZZIANE DE SOUZA LIMA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Verônica Ortiz Alvarenga (Orientadora e presidente da comissão) - UFMG  
Profa. Dra. Fernanda Bovo Campagnollo - Fundação Hermínio Ometto  
Prof. Dr. Jonas de Toledo Guimarães - Universidade Federal Fluminense

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Jonas de Toledo Guimarães, Usuário Externo**, em 22/02/2021, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veronica Ortiz Alvarenga, Professora do Magistério Superior**, em 22/02/2021, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Bovo Campagnollo, Usuário Externo**, em 22/02/2021, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0579078** e o código CRC **15ABED75**.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por sempre guiar os meus passos;

À minha família pelo suporte emocional proporcionado;

Aos meus sobrinhos Heitor e Lucca que tornam leves as cobranças da vida e pelos momentos diários de alegrias;

Ao Alexandre pelo apoio incondicional e pelas conversas diárias que acalmam minhas dúvidas e medos;

À Maysa pelas boas conversas e ajuda durante os experimentos sempre se mostrou dedicada mesmo no período de excessos de trabalhos da faculdade;

À Dra. Verônica por ter me recebido confiado um projeto e dado todo o suporte necessário durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos e professores do laboratório de microbiologia industrial, controle de processos e do departamento de alimentos pelos agradáveis momentos de companhia e disponibilidade de ajuda.

## RESUMO

*Bacillus cereus* é uma grande preocupação na indústria de laticínios. Seus esporos são resistentes ao calor e a produtos químicos. Este micro-organismo está frequentemente associado a intoxicações alimentares devido à produção de toxinas como cerulida, citotoxina K, hemolisina BL e enterotoxina não hemolítica. Este estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência de esporos de 12 cepas de *B. cereus* reconstituídos em leite em pó integral em cenários em que o leite em pó é habitualmente preparado em residências, hospitais e serviços de alimentação e nutrição como aquecimento em chama direta, aquecimento por micro-ondas, manutenção à temperatura ambiente e armazenamento em refrigerador doméstico. O leite em pó contaminado artificialmente com esporos de *B. cereus* (n=36) foi reconstituído com água destilada estéril antes de cada cenário. As contagens de esporos de *B. cereus* foram feitas antes e após a simulação de cada um dos cenários. As contagens foram feitas em ágar nutriente e TSB suplementado com polimixina e a confirmação em ágar MYP e microscopia ótica por coloração de Gram. O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) em UFC após cada cenário foi calculado para cada cepa, considerando a população antes e após os cenários aplicados. O ( $\gamma$ ) causado pelo aquecimento em chama direta variou de 0,18 UFC a 0,93 UFC (cepas B94 e B63) para as células vegetativas para os esporos a variação foi de 0,76 UFC a 0,08 UFC (B18 e B3). Para aquecimento em micro-ondas o  $\gamma$  das células vegetativas variou de 0,15 UFC a 1,23 UFC (cepas B3 e B51) e para os esporos a variação foi de 0,14 UFC a 0,77 UFC (B3 e B18). Para manutenção em temperatura ambiente por 2 horas o  $\gamma$  variou -0,19 UFC a 0,18 UFC (CCGB512 e B94) e para os esporos variou de 0 UFC (CCGB432 e CCGB512) a 0,72 UFC (B51). Para o cenário de armazenamento por 24 horas em geladeira a 10°C o  $\gamma$  para células vegetativas variaram -0,24 UFC a 0,31 UFC (CCGB511 e B51) e para os esporos 0,39 UFC a -0,32 UFC (B51 e B86). Os resultados indicaram que puderam ser observados dois grupos de cepas, um grupo resistente para o qual o  $\gamma$  foi menor que 1 UFC e um grupo sensível, para o qual foi observado reduções maiores 1  $\gamma$  UFC. Os resultados destacam que as condições de armazenamento do leite reconstituído após o cenário por chama direta, geladeira e temperatura ambiente não foram capazes de fornecer mais de 1  $\gamma$  UFC de redução de *B. cereus*, potencialmente apresentando riscos à saúde pública se houver o

consumo do leite em pó contaminado. O micro-ondas obteve uma redução maior que 1  $\gamma$  UFC sendo o cenário que promoveu a maior redução tanto de células vegetativas quanto dos esporos das respectivas cepas.

Palavras-chave: inativação microbiana; valor D; patógeno; microbiologia preditiva; segurança do alimento.

## ABSTRACT

*Bacillus cereus* is a major concern in the dairy industry. Its spores are resistant to heat and chemicals. This microorganism is frequently associated with intoxications due to the production of toxins such as cerulide, cytotoxin K, hemolysin BL and non-hemolytic enterotoxin. This study aimed to evaluate the spore survival of 12 strains of *B. cereus* reconstituted in whole milk powder in settings where milk powder is usually prepared in homes, hospitals and food and nutrition services such as direct flame heating, microwave heating, room temperature maintenance and storage in a domestic refrigerator. Powdered milk artificially contaminated with *B. cereus* spores (n=36) was reconstituted with sterile distilled water before each treatment. Spore counts of *B. cereus* were made before and after the simulation of each scenario. The counts were made on nutrient agar and TSB supplemented with polymyxin and optical microscopy by Gram stain. The number of decimal reductions ( $\gamma$ ) after each treatment was complete for each strain, considering the population before and after specialized treatment. The ( $\gamma$ ) firing by direct flame heating ranged from 0,18 UFC to 0,93 UFC (strains B94 and B63) for plant cells for spores a and ranged from 0,76 UFC to 0,08 UFC (B18 and B3). For microwave heating the  $\gamma$  of vegetative cells varied from 0,15 UFC to 1,23 UFC (strains B3 and B51) and for spores the variation was from 0,14 UFC to 0,77 UFC (B3 and B18). For maintenance at room temperature for 2 hours,  $\gamma$  ranged from -0,19 UFC to 0,18 UFC (CCGB512 and B94) and for spores it ranged from 0 (CCGB432 and CCGB512) to 0,72 UFC (B51). For the scenario of storage for 24 hours in a refrigerator at 10°C the  $\gamma$  for plant cells ranged from -0,24 UFC to 0,31 UFC (CCGB511 and B51) and for the spores 0,39 UFC to -0,32 UFC (B51 and B86). The results indicated that two groups of strains could be observed, a resistant group for which the  $\gamma$  was less than 1 and a sensitive group, for which greater reductions were observed 1  $\gamma$  UFC. The results highlight that the storage conditions of the reconstituted milk after the treatment by direct flame, dissipation and room temperature were not able to provide more than 1  $\gamma$  UFC. reduction of *B. cereus*, potentially susceptible to public health if contaminated powdered milk is consumed. The microwave obtained a reduction greater than 1  $\gamma$  UFC the treatment that promoted the greatest reduction in both vegetative cells and spores of the best strains.

Keywords: microbial inactivation; D-value; pathogen; predictive microbiology; food safety.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral reconstituído após o tratamento térmico por aquecimento em chama direta.....	36
Figura 2 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral reconstituído após o tratamento térmico por aquecimento em chama direta.....	37
Figura 3 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral reconstituído após o aquecimento por micro-ondas.....	38
Figura 4 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral reconstituído após o aquecimento por micro-ondas.....	39
Figura 5 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral após manutenção em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 horas.....	40
Figura 6 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral após manutenção em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 horas.....	41
Figura 7 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral após manutenção sob refrigeração ( $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas.....	42
Figura 8 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de <i>Bacillus cereus</i> em leite em pó integral após manutenção sob refrigeração ( $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas.....	42
Figura 9 - Comportamento das reduções de células vegetativas e esporos por cepa nos cenários aplicados.....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Tabela 1 - Tratamentos térmicos para leite e laticínios, questões microbiológicas e indicadores de tratamentos térmicos.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 2 - Fonte das cepas.....</b>	<b>29</b>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivos específicos .....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1.1 <i>Bacillus cereus</i> sensu lato.....	15
3.1.2 <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto.....	15
3.1.3 Contaminação de produtos lácteos por <i>Bacillus cereus</i> .....	17
3.1.4 Processamento térmico de produtos lácteos .....	18
3.1.5 Inativação cinética microbiana no processo térmico de laticínios .....	21
3.1.6 Sobrevivência de <i>Bacillus cereus</i> em diferentes ambientes .....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Amostras de leite em pó .....	29
4.2 Procedimentos de preparo do leite em pó reconstituído.....	30
4.3 Cenários para avaliação do comportamento do <i>Bacillus cereus</i> .....	30
4.3.1 Contagem de células vegetativas.....	30
4.3.2 Contagem de esporos .....	31
4.3.3 Choque térmico para ativação dos esporos.....	31
4.3.4 Contagem de células vegetativas e esporos.....	31
4.3.5 Cenário 1: Tratamento térmico por aquecimento direto em chama .....	32
4.3.6 Cenário 2: Tratamento térmico em micro-ondas .....	32
4.3.7 Cenário 3: Manutenção a temperatura ambiente .....	33
4.3.8 Cenário 4: Manutenção sob refrigeração.....	33
4.4 Determinação da resposta mínima e máxima da sobrevivência de esporos de <i>Bacillus cereus</i> .....	33
4.5 Análise estatística .....	34
5 RESULTADOS .....	35
5.1 Efeitos dos Tratamentos na sobrevivência de esporos e células de <i>Bacillus cereus</i> .....	35
5.1.1 Aquecimento em chama direta .....	35
5.1.2 Aquecimento por micro-ondas.....	37

<b>5.1.3 Manutenção da temperatura ambiente .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.4 Manutenção sob refrigeração .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.5 Variação das células vegetativas e esporos por cepa nos cenários.....</b>	<b>43</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>SUGESTÕES DO TRABALHO .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O leite devido a sua composição rica em proteínas, gorduras, carboidratos, minerais, aminoácidos essenciais e vitaminas pode ser considerado um bom alimento na dieta de seres humanos (CALLEFE e LANGONI, 2015). Após a ordenha pode ocorrer a contaminação por micro-organismos através do ambiente, equipamentos e utensílios utilizados, além dos funcionários que fazem a obtenção e manuseio do leite tornando-se fontes importantes de contaminação, podendo comprometer a qualidade do leite e seus derivados (SILVA *et al.*, 2011). Alguns patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, *Campylobacter sp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* têm sido encontrados no leite (COIA *et al.* 2001; JAYARAO *et al.* 2006; GUNDOGAN e AVCI, 2014).

O *B. cereus* está presente no grupo das bactérias que causam doenças que são transmitidas através dos alimentos (DTA). A etiologia desse enfermidade é conhecida e de curta duração (MOUSSA-BOUDJEMAA *et al.*, 2006). Devido a curta duração da doença, é provável que o número de casos notificados esteja subestimado (GRANUM, 1997). O *B. cereus* é responsável por duas síndromes veiculadas por alimentos, a emética e a diarreica. A enterotoxina não hemolítica (Nhe), citotoxina K (CytK) (LUND *et al.*, 2000), e a hemolisina BL (Hbl) (BEECHER *et al.*, 1995), causam o tipo intoxicação com sintomas diarreico (LUND e GRANUM, 1996). A toxina cerulida causa os sintomas de intoxicação do tipo emético (AGATA *et al.*, 1995). Os sintomas da síndrome emética são dores abdominais, náuseas e vômitos ocorrendo em poucas horas após a ingestão de comida contaminada. E na síndrome diarreica os sintomas aparecem entre 8 e 16 horas após a ingestão do alimento contaminado e o indivíduo apresenta diarreia e dores abdominais. (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2010).

A Resolução RDC Nº 331 de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a instrução normativa nº 60 não apresentam critérios microbiológicos relacionados à *B. cereus* para leite em pó (BRASIL, 2019).

Entretanto, os esporos de *B. cereus* são resistentes a agentes químicos e físicos, tem capacidade de adesão a superfícies, podendo contaminar plantas de processamento de alimentos (REYES e BASTÍAS *et al.*, 2007). A ocorrência de esporos de *B. cereus* em leite em pó podem variar de 0,3 a 4 log<sub>10</sub> (BECKER *et al.*, 1994; REYES e BASTÍAS *et al.*, 2007). Embora as condições no leite em pó não sejam favoráveis a germinação e multiplicação, quando reconstituído, esse produto se torna um ambiente propício para o desenvolvimento desse micro-organismo (REYES e BASTÍAS *et al.*, 2007). Tornando um alimento inseguro para consumo humano (BAE *et al.*, 2012; BERTHOLD-PLUTA, PLUTA e GARBOWSKA, 2015; GRANUM e LINDBÄCK, 2013).

Devido a sua estrutura os esporos apresentam propriedades de resistência com um núcleo desidratado coberto por várias camadas que fazem a sua proteção. É a sua longevidade se deve a dormência do esporo (SETLOW, 2006). A região do córtex do esporo mantém essa dormência e a resistência ao calor, acredita-se que contribui para manter o núcleo desidratado (ATRIH E FOSTER, 2001).

Para a germinação é preciso a degradação do córtex com auxílio das enzimas presentes nessa região promovendo a expansão do conteúdo do núcleo do esporo (MOIR, 2006; SETLOW, 2003; VOLLMER *et al.*, 2008). Receptores que auxiliam nessa germinação e transportadores (canais ou poros) são incorporados nessa membrana interna (SETLOW, 2006).

Durante o processo de germinação a membrana interna cresce e se expande 1,5 vezes não sendo necessário a síntese de lipídeos e se torna o plasma da membrana da futura célula. Um conjunto de transportadores nessa membrana permitem o funcionamento metabólico celular durante a fase que inicia o crescimento (MOIR, 2006; SENIOR e MOIR, 2008). Para finalizar a germinação conclui quando as camadas que compõem a membrana interna, incluindo o restante do revestimento e a membrana externa são liberadas (VEPACHEDU e SETLOW, 2007).

Diante do exposto não foram encontrados dados sobre o comportamento de *B. cereus* em diferentes condições de reconstituição do leite em pó. Além disso, esse estudo visa analisar a variabilidade no comportamento de cepas de *B. cereus* (n=36).

Os cenários estudados nesse trabalho tem por objetivo entender o comportamento de esporos e células vegetativas de *B. cereus* após a reconstituição do leite em pó. Dessa forma, o objetivo é avaliar impacto de cada um dos cenários mais utilizados no preparo em ambientes domésticos, de serviços de alimentação e lactários, segundo recomendações da OMS. Os cenários mais comuns nesses ambientes são a fervura, micro-ondas, armazenamento sob refrigeração e manutenção a temperatura ambiente.

## 2 OBJETIVOS

Estudar o comportamento do *B. cereus* em diferentes cenários após a reconstituição do leite em pó.

### 2.1 Objetivos específicos

- I. Estudar o comportamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* durante o aquecimento em chama direta;
- II. Estudar o comportamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* durante o aquecimento em micro-ondas doméstico;
- III. Estudar o comportamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* durante a manutenção em temperatura ambiente;
- IV. Estudar o comportamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* durante o armazenamento sob refrigeração.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1.1 *Bacillus cereus* sensu lato

O grupo *Bacillus cereus* sensu lato é composto por bacilos gram-positivos, formadores de esporos e com estreita relação filogenética, mas com alta diversidade ecológica (FAYAD *et al.*, 2019). O grupo é composto por 13 espécies *B. anthracis*, *B. cereus* s.s, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, *B. cereus* biovar *anthracis*, *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. bingmayongensis* e *B. wiedmannii* (FAYAD *et al.*, 2019).

Os esporos de *B. cereus* estão ubiquamente distribuídos no meio ambiente, são comumente encontrados em solo e sedimentos, água e no trato gastrointestinal de invertebrados e em altas concentrações em fezes bovinas (HEYNDRICKX, 2011; MARROLLO, 2016). Sua temperatura ótima para multiplicação varia de 25 a 37°C, mas existem espécies capazes de se multiplicar entre 3 e 75°C, algumas espécies podem crescer desde meios ácidos até alcalinos pH 2 até pH 10 (DROBNIOWSKI, 1993; DUFRENNE *et al.*, 1995).

#### 3.1.2 *Bacillus cereus* sensu stricto

*Bacillus cereus* sensu stricto faz parte das 13 espécies que compõem o grupo de *Bacillus cereus* sensu lato, essa espécie já foi isolado em alimentos *in natura* e alimentos processados como vegetais, pimentas, massas, arroz, farináceos, formulas infantis, alimentos prontos para consumo, produtos desidratados, leite e derivados tanto o UHT quanto o pasteurizado (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011; CHAVES *et al.*, 2017).

É uma bactéria de destaque por apresentar a capacidade de causar doenças (FDA, 2012). Algumas cepas do *Bacillus cereus* sensu stricto apresentam plasmídios

semelhantes ao *Bacillus anthracis* que causam lesão de pele, disgestivas ou vias respiratórias que podem levar à morte (MARSTON *et al.*, 2016). Outras cepas podem causar bacteremia persistente (SCHAEFER *et al.*, 2016) ou meningoencefalite e abscesso cerebral (TUSGUL *et al.*, 2017).

A muito tempo já se conhece à importância do acompanhamento do *B. cereus* sensu stricto na segurança dos alimentos (BENNETT *et al.*, 2013). A sua capacidade de produção de esporos o torna capaz de sobreviver aos processos industriais. A composição dos alimentos, pH e tratamentos térmicos pode desencadear a germinação e a multiplicação dos esporos que são influenciados pela composição dos alimentos (WARDA *et al.*, 2015).

Esse micro-organismo é responsável por duas síndromes, a emética e a diarreica. A síndrome emética é causada por uma toxina pré-formada no alimento durante a esporulação bacteriana. Essa toxina, cerulida, é resistente ao calor e a ambientes ácidos. A síndrome emética é caracterizada por vômitos, podendo ter episódios de diarreia e os sintomas podem aparecer de 30 minutos até 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados (OH *et al.*, 2012; FDA, 2012; MCKILLIP, 2000). A síndrome diarreica é causada pelo consumo de alimentos contaminados com concentrações partir de  $10^4$  UFC/g ou mL de alimento (DREWNOWSKA e SWIECICKA, 2013; SWIECICKA *et al.*, 2013, KAMINSKA *et al.*, 2015; HENDRIKSEN *et al.*, 2006; COLLIER, 2005). As enterotoxinas serão produzidas e a colonização no intestino. Os sintomas são diarreia, vômitos e cólicas que se iniciam de 6 até 15 horas após o consumo do alimento contaminado (OH *et al.*, 2012; FDA, 2012; MCKILLIP, 2000). As toxinas associadas a ocorrência da síndrome diarreica são hemolisina BL (HBL), não hemolítica (Nhe) e citotoxina k (CytK) (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2004). Não há necessidade da colonização de uma grande quantidade de cepas de *B. cereus*, já que apenas a colonização de uma única cepa de *B. cereus* já é capaz de causar as duas síndromes (OH *et al.*, 2012).

A produção de cerulida é dependente da temperatura do alimento  $12^{\circ}\text{C}$  parece ser o temperatura mínima para a produção de cerulida (KRANZLER *et al.*, 2016; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2004). Em estudos com a produção de cerulida em leite desnatado em

temperaturas variadas foi detectada a toxina nas temperaturas de 12°C (após 4 dias) e 37°C (após 24 horas) (FINLAY *et al.*, 2000).

### 3.1.3 Contaminação de produtos lácteos por *Bacillus cereus*

As bactérias formadoras de esporos, *Bacillus* e *Clostridium* são as principais causadoras de problemas na indústria alimentícia (HEYNDRICKX, 2011). *B. cereus sensu stricto* é de extrema importância na cadeia dos laticínios, pois além de causar doenças apresenta um potencial deteriorante com a produção de proteases e lipases capazes de reduzir a vida útil dos produtos (JONGHE *et al.*, 2010; KUMARI; SARKAR, 2016). Além disso, a resistência ao calor dos esporos confere capacidade de sobreviver ao processo de ultra-alta temperatura (UHT) (VIDAL *et al.*, 2016) e a capacidade de adesão e formação de biofilme aumentam a probabilidade de contaminação na indústria de produtos lácteos (SHAHEEN *et al.*, 2010).

A presença desse micro-organismo é comum em produtos lácteos (WONG *et al.*, 1988; VIDAL *et al.*, 2016). A principal rota de contaminação, na indústria, é através do leite cru que são transportados das fazendas até as indústrias.

A ocorrência de *B. cereus* em leite *in natura* é descrita por diversos autores (CHRISTIANSSON *et al.*, 1999; BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008), pasteurizado (BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2008). A contaminação por *B. cereus* também é relatada em leite produzidos ultra high temperature (UHT) (REZENDE-LAGO *et al.*, 2007; VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005), leites fermentados (WONG *et al.*, 1988), sorvetes (WONG *et al.*, 1988; ZHOU *et al.*, 2010), leite em pó (WONG *et al.*, 1988) e diversos outros produtos da indústria de lácteos (MONTANHINI *et al.*, 2012). A contaminação por esporos em produtos lácteos desidratados varia entre 0,3 e 4 log<sub>10</sub>. Apesar desses produtos não favorecerem a germinação, eles são utilizados com outros ingredientes e são usados em formulações de laticínios, iogurtes, sobremesas além de ser usado como ingrediente alimentar (SADAT *et al.* 2018; YILDIZ e OZCAN, 2019).

### 3.1.4 Processamento térmico de produtos lácteos

O tratamento térmico constitui uma parte integrante dos processos usados na indústria de laticínios. Realizar o controle de tempo e temperatura de forma eficiente durante o processamento térmico dos alimentos é um desafio para a indústria de laticínios. Os principais fatores durante o desenvolvimento de um processo térmico são o tempo de processo e a resistência microbiana. Alguns processos térmicos, como exemplo a pasteurização, contribuem para a inativação microbiana em uma taxa logarítmica. Explicando de uma forma mais concisa independentemente do tamanho da população que está presente na matriz alimentar, uma proporção constante da população de um determinado micro-organismo é inativada durante um intervalo de tempo quando ocorre a exposição além das condições de temperatura e faixas toleráveis. Um processo térmico para ser eficiente depende da resistência térmica de micro-organismos não apenas do binômio tempo/temperatura. O processo térmico de aquecimento dos produtos além de ser influenciado pelo meio o qual ocorre o aquecimento também depende da sua viscosidade, composição, tamanho e forma do alimento (LING *et al.*, 2015; SINGH e BORNHORST, 2018).

Em uma linha de produção industrial os processos térmicos estão entre as operações unitárias mais comuns. Os tratamentos térmicos na indústria de alimentos são planejados de forma específica para agirem de forma eficiente nos micro-organismos e dessa forma reduzir sua multiplicação ou sobrevivência (LING *et al.*, 2015; SINGH e BORNHORST, 2018). Tratamentos térmicos podem causar a ruptura da membrana celular e afetar o conteúdo genético dos micro-organismos levando essas células à morte (MÜLLER, FERREIRA MARCZAK e SARKIS, 2020). Outra forma de utilização é causando a desnaturação de proteínas e dessa forma proporcionando a qualidade desses alimentos processados (IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 2002; KADAM, TIWARI e O'DONNELL, 2015). Garantir a produção de alimentos seguros e saudáveis é a função do processo térmico (ASHENAFI, 2012).

Existem alguns aspectos relevantes que precisam ser considerados na concepção do desenvolvimento de um tratamento térmico em uma indústria de alimentos: as propriedades químicas apresentadas pela matriz alimentar, mecanismos básicos do processo de transferência de calor que ocorre entre o meio aquecido e o alimento e a qualidade sensorial e nutricional do alimento (HEWITT, SHIRES e BOTT, 2000; IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 2002; FELLOWS, 2009; KAKAÇ, LIU e PRAMUANJAROENKIJ, 2012). Mas o processo de cinética de inativação de micro-organismos é o principal foco dos tratamentos térmicos na indústria de alimentos (LING *et al.*, 2015; KING e BEDALE, 2017). Existem outros fatores que influenciam os tratamentos térmicos industriais como tipo do meio de aquecimento, reologia, estrutura, design do equipamento e composição do produto (RAO, 2007; SERTH e LESTINA, 2014). Nesse processo térmico diferentes sistemas podem ser usados como autoclaves, aquecimento ôhmico, trocadores de calor tubulares ou de placas, sistemas de injeção direta de vapor até mesmo inovações técnicas como aquecimento infravermelho, aquecimento por radiofrequência e micro-ondas (CAPPATO *et al.*, 2017; AUGUSTO, SOARES e CASTANHA, 2018; DEN BESTEN *et al.*, 2017a; BOZKURT-CEKMER e DAVIDSON, 2017; JIANG *et al.*, 2020; LINARES-MORALES, PRADO-BARRAGÁN e NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2020; VERMA *et al.*, 2020).

A autoclavagem se realizada de forma correta funciona como um método de esterilização. O processo é feito usando vapor pressurizado (15 psi) obtendo uma temperatura de saturação de 121°C. A pressão e o calor excessivo proporcionado pelo equipamento danifica e desnatura macromoléculas além das estruturas subcelulares, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e membranas plasmáticas (REES, 1977; POMERANZ, 1988; CAEL *et al.*, 1973; KOENIG, 1972; PARKER, 1983).

O ultrassom pode proporcionar emulsificação, retirada da espuma, extração, homogeneização, mistura além do efeito antimicrobiano (ANSARI *et al.*, 2017). O efeito de cavitação que faz com que o ultrassom tenha o efeito bactericida (CARSTENSEN, 1986; SCHERBA *et al.*, 1991), com a produção de microbolhas promovendo o seu colapso. Esse colapso promove o aumento da temperatura (5500 K) e uma pressão

aproximada de (50 Mpa) (NEPPIRAS, 1980; SUSLICK, 1990; WOOD *et al.*, 2017). Existe uma outra teoria que sugere a relação com a sonicação do líquido resultando na formação de radicais livres promovendo ataques ao DNA no interior das células microbianas (ANSARI *et al.*, 2017).

A manossonicação (EVELYN e SILVA 2016B; RASO *et al.*, 1998b) e a termossonicação (EVELYN e SILVA, 2015b; MILANI E SILVA, 2017) reduzem a resistência dos esporos aos tratamentos promovendo a inativação dos esporos. Segundo Ansari *et al.*, (2017) o efeito letal do ultrassom também pode ser explicado através da sonicação do líquido que irá formar radicais livres que irão atacar o DNA no interior das células microbianas.

Uma nova tecnologia com resultados positivos para inativação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes presentes em alimentos líquidos é o tratamento por campo elétrico pulsado (AMIALI *et al.*, 2007, WEŚSIERSKA e TRZISKA, 2007), esse tratamento necessita de baixa quantidade de energia (VEGA-MERCADO *et al.*, 1997) e a sinergia com o tratamento térmico apresentam bons resultados na inativação microbiana (AMIALI *et al.*, 2007, EVRENDILEK e ZHANG, 2003; WALKLING-RIBEIRO *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas para inativação de bactérias tem se aplicado na indústria de alimentos esterilização por micro-ondas (SENNA *et al.*, 2010). Sendo o princípio de funcionamento do equipamento para promover a morte celular a geração de calor nas células por ondas eletromagnéticas (GIBSON *et al.*, 1999; WOO *et al.*, 2000).

Geralmente durante o desenvolvimento de um processo térmico os principais fatores que são levados em consideração são a resistência microbiana, temperatura e tempo de processo, pois são bastante estudados e associações são encontradas com facilidade (KING e BEDALE, 2017). Para realizar as estimativas de temperatura são levadas em consideração a quantidade de temperatura ideal que deve ser transferida para inibir os patógenos ou micro-organismos que causam deteriorização com alterações mínimas das propriedades nutricionais e sensoriais (LEWIS e JUN, 2011). Pode-se realizar o monitoramento da temperatura no equipamento e/ou no produto não

processado (KUSWANDI e NURFAWAIDI, 2017; BIBI *et al.*, 2017). O monitoramento feito de forma adequada garante que processo térmico correto foi entregue. Mas existe uma outra possibilidade que consiste na resposta do micro-organismo pode ter uma ampla variação e algumas estratégias para detectar e destruir essas mudanças adaptativas dos micro-organismos precisam ser desenvolvidas (BOWER e DAESCHEL, 1999; SMELT e BRUL, 2014).

Uma etapa fundamental durante os tratamentos térmicos é o tempo de processamento desse tratamento devido a relação existente entre a letalidade mensurável da população microbiana (BOWER e DAESCHEL, 1999; SMELT e BRUL, 2014). A resistência dos micro-organismos é variável é definida pela habilidade de sobreviver a relação tempo/temperatura (RISZAK e COLWELL, 1987). Sendo assim podemos dizer que o parâmetro mais importante nos processos térmicos é o binômio tempo versus temperatura. O binômio informa valores de tempo e temperatura o qual o alimento é processado garantindo a redução da carga microbiana (KING e BEDALE, 2017). Existem várias combinações para o binômio na qual pode ser definida considerando a matriz alimentar e do microbioma associado (KING e BEDALE, 2017). Geralmente, os produtos lácteos são submetidos aos processos de pasteurização e esterelização (KELLY, DATTA e DEETH, 2012). Dessa forma, um grande desafio para a indústria de alimentos é garantir um processo térmico que dê como resultado a segurança microbiológica, a estabilidade do produto além de não alterar os atributos nutricionais e sensoriais (ERKMEN e BARAZI, 2012).

### **3.1.5 Inativação cinética microbiana no processo térmico de laticínios**

O leite tem uma grande quantidade de nutrientes e isso o torna um ótimo ambiente para crescimento de muitos micro-organismos até mesmo os patógenos. (QUINTO *et al.*, 2020; SINGHAL *et al.*, 2020). Dessa forma medidas que promovem a segurança microbiológica do leite minimizando o risco à saúde humana se tornam

extremamente necessárias (MACHADO *et al.*, 2017). Os tratamentos térmicos do leite constituem etapas importantes para a futura produção dos laticínios para inibir o crescimento microbiano e conseqüentemente estender a vida de prateleira dos produtos (KELLY, DATTA e DEETH, 2012). Para o planejamento de um tratamento térmico, deve-se considerar o potencial de crescimento de bactérias formadoras de colônias após o tratamento térmico, temperatura de armazenamento, pH e outros fatores. Inclui-se alterações químicas, sensoriais e nutricionais para um tratamento efetivo (SINGHAL *et al.*, 2020).

De todos os processos usados em uma indústria de laticínios o tratamento térmico é uma etapa fundamental. A pasteurização visa a inativação de células vegetativas de bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli patogênica*, *Campylobacter* e *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus* (FDA, 2012; DEN BESTEN *et al.* 2017a). Os esporos são resistentes sendo assim, necessitam de uma quantidade maior de calor para serem inativados e por isso não são destruídos durante o processo de pasteurização (BUSTA, 1967; FDA, 2012). Por isso as indústrias de laticínios precisam desenvolver tratamentos térmicos mais eficientes visando inativar esses esporos e conseqüentemente aumentar a vida útil dos produtos lácteos (BOWER e DAESCHEL, 1999; SMELT e BRUL 2014; VIDIC *et al.*, 2020). Na Tabela 1 estão representados os principais tratamentos usados na indústria de laticínios com objetivo de tratamento térmico e controle microbiológico (BARBOSA-CANOVAS, 2005; BHATTACHARYA, 2014).

O calor fornecido durante o tratamento térmico promove a inativação enzimática e microbiana. Para esses tratamentos que ocorrem no interior dos alimentos são considerados o binômio tempo versus temperatura e os mecanismos básico de transferência de calor do meio aquecido (vapor ou água). Entendendo a interação binômio tempo/temperatura os mecanismos que fazem a transferência de calor, considerando a intensidade desse calor para atingir a inativação microbiana garante-se a aceitabilidade do produto e um processo térmico seguro.

**Tabela 1 - Tratamentos térmicos para leite e laticínios, questões microbiológicas e indicadores de tratamentos térmicos**

<b>Produto</b>	<b>Tratamento térmico</b>	<b>Aspectos microbiológicos</b>	<b>Indicadores do tratamento térmico</b>	<b>Referências</b>
Leite pasteurizado	Pasteurização (HTST) (72°C - 74°C/15 -30s)	Inativa <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Bucella abortis</i> , <i>Coxiella brunetti</i> e células vegetativas de patógenos, redução na população de micro-organismos produtores de ácidos e coliformes.	Atividade da alcalinofosfatase (-) Atividade da lactoperoxidase (+)	(POLTRONIERI e ROSSI, 2018; KELLY, DATTA e DEETH, 2012 BYLUND, 1995)
Leite pasteurizado	Pasteurização (63°C/30 min)	Inativa esporos de bactérias psicrótróficas	Atividade da alcalino fosfatase (-) Atividade da lactoperoxidase (-)	(DOLL, SCHERER, e WENNING, 2017; DEETH, 2017)
ESL (Leite com vida útil estendida) leite	Pasteurização de alta temperatura (120°C/1 -4s)			

Tabela 1 - Continuação

<b>Produto</b>	<b>Tratamento térmico</b>	<b>Aspectos microbiológicos</b>	<b>Indicadores do tratamento térmico</b>	<b>Referências</b>
Leite cru (Manutenção da qualidade do leite)	Termização 57°C – 68°C/ 15 s	Redução de bactérias psicrotróficas	Atividade da catalase (+)	(HIRVI e GRIFFITHS, 1998; LÓPEZ- FANDIÑO e OLANO, 1999)
Leite esterilizado em garrafas	Bateladas em autoclave 110°C – 120°C/15 – 40 minutos	Inativa micro-organismos resistentes ao calor, incluindo esporos	Atividade da Alcalino fosfatase(-) Atividade da lactoperoxidase (-)	(LEWIS, 2003; METHA, 1980; BYLUND, 1995)

Tabela 1 - Continuação

Produto	Tratamento térmico	Aspectos microbiológicos	Indicadores do tratamento térmico	Referências
Leite UAT (Ultra alta temperatura)	Esterilização (infusão ou injeção de vapor) 135°C – 140°C/ 3 – 5 s Esterilização (infusão ou injeção de vapor)135°C – 140°C/ 3 – 5 s	Inativa micro-organismos resistentes ao calor, incluindo esporos	Atividade da alcalino fosfatase (-) Atividade da lactoperoxidase (- )	(BYLUND, 1995; LEWIS, 2003; METHA, 1980)

### 3.1.6 Sobrevivência de *Bacillus cereus* em diferentes ambientes

Os esporos de *B.cereus* podem sobreviver por longos períodos e em produtos como o leite em pó e produtos lácteos desidratados (BEUCHAT *et al.*, 2013). Apesar dos alimentos desidratados não proporcionarem condições ideais para germinação de esporos viáveis, após a reconstituição, se mantidos a temperatura ambiente ou sob refrigeração, os esporos podem germinar e multiplicar e produzir toxina (MEER *et al.*, 1991; JAQUETTE e BEUCHAT, 1998). Algumas cepas de *B. cereus* tem característica psicrotrófica e podem produzir toxinas em temperaturas de 6°C (GRANUM *et al.*, 1993).

Os esporos são estruturas resistentes a estresses ambientais em condições de altas temperaturas, ação de enzimas ou ácidos orgânicos, redução de pH, baixa atividade de água. Essa característica confere a capacidade de sobrevivência na indústria principalmente durante a produção do leite em pó (BURGESS *et al.*, 2010). Além disso, a presença da lactose no leite pode formar camadas protetoras que contribuem para a sobrevivência dos esporos de *B. cereus* (ALVES *et al.*, 2016) e a gordura pode apresentar um efeito protetor durante o aquecimento (ABABOUCHE e BUSTA, 1987; ABABOUCHE, DIKRA e BUSTA 1987; MOLIN e SNYGG, 1967). Um outro fator que pode influenciar na resistência de *B.cereus* é a redução da atividade de água, que reduz a transferência de calor no alimento e interfere na cinética de inativação do micro-organismo (ABABOUCHE e BUSTA, 1987; SENHAJI, 1977; SENHAJI e LONCIN, 1977).

A alta influência da composição do meio de calor é mostrada pelo valor  $D_T$  que é um parâmetro dependente da temperatura que mostra variação de espécie específica (MÜLLER, FERREIRA MARCZAK e SARKIS, 2020; VAN ASSELT e ZWIETERING, 2006; MAZAS *et al.*, 1999). A cinética de inativação de diferentes fatores biológicos além dos micro-organismos pode ser amplamente usada para descrever esse conceito (TOLA e RAMASWAMY, 2012; SHIRTZ, 2007). Um exemplo desse uso é a inativação cinética de primeira ordem de proteases do leite com valor  $D_{150^\circ\text{C}}$  variando entre 0,5 e 27 segundos (LEWIS, 2003). Em condições isotérmicas de temperatura determinamos os valores  $D_T$ . Lembrando que as mudanças de

temperatura alteram a resistência térmica do micro-organismo (SMELT e BRUL, 2014).

A resistência dos esporos ao calor úmido pode estar relacionado com o processo de reticulação e formação das camadas durante a fase de esporulação. (SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011; SETLOW, 2014).

A inativação de micro-organismos por micro-ondas, ainda tem lacunas a serem preenchidas. Alguns estudos consideram que o efeito letal está associado somente ao calor (VALSECHI, HORII e ANGELIS, 2004). Entretanto, outros estudos sugerem a desnaturação de proteínas, degradação de ácidos nucleicos ou outros componentes celulares e simplesmente a lise celular são responsáveis pela inativação microbiana (DATTA e DAVIDSON, 2000; HEDDLESON e DOORES, 1994). O processo de inativação das bactérias pelo micro-ondas não segue um padrão estipulado (VALSECHI, HORII e ANGELIS, 2004). Khalil e Villota (1988) supôs que esse equipamento pode catalisar algumas reações oxidativas nos lipídios da membrana o que afeta a célula durante o aquecimento.

Segundo Swain e James (2010) para a eficácia do micro-ondas precisam ser avaliados muitos fatores. Sieber *et al.* (1996) fez uma revisão de fatores que podem afetar o aquecimento do leite em micro-ondas domésticos (2.450 MHz) e constatou que a eficácia do tratamento térmico no produto depende da quantidade do leite e da geometria do equipamento. Foi notado que em temperaturas mais baixas as ondas eletromagnéticas penetraram mais no leite. Uma hipótese é o aquecimento mais elevado ocorrerá uma rápida absorção das ondas eletromagnéticas pelo equipamento fazendo com que essas ondas não atinjam uma ampla penetração no produto (CHAUUM, RATTANADECHO e PAKDEE, 2011).

Fatores como o tamanho, densidade, forma dos alimentos, propriedade do meio, material do recipiente interferem na condução do calor para o micro-organismo principalmente, para os esporos (CHIPLEY, ROHIFS e FORD, 1980; LIN e LI, 1971; NAJDOVSKI, DRAGES e KOTNIK, 1991; PFEIFER e KESSLER, 1994). Dessa forma se aplicado um tratamento não efetivo em bactérias como *Bacillus spp.* podem sobreviver ao choque (WAYLAND, BRANNEN e MORRIS, 1977). Portanto, fatores físicos e químicos dos alimentos precisam ser levados em consideração para o efeito

letal do estresse nos micro-organismos (RAMEZANZADAH *et al.*, 1999; ROSEN, 1972; SASAKI, HONDA e MIYAKI, 1998).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de leite em pó

As amostras de leite em pó contaminadas com esporos de *B. cereus* foram preparadas previamente de acordo com ALVARENGA *et al.*, (2018a) e ALVARENGA *et al.*, (2018b). Alvarenga *et al* (a,b) inoculou 7,2 ( $\pm$  0,2)  $\log_{10}$  esporos por grama de massa seca por cepa e em triplicada no *spray drying* Labmaq SD 1.0. O leite integral para a produção do leite em pó foi pasteurizado integral [3,5% (v/v) de gordura] os lotes comerciais foram testados em relação a presença de *B. cereus* de acordo com a metodologia de Bennet, Tallent, Hait (2015), sendo a contagem de esporos de *B. cereus* desses lotes comerciais < 10 esporos/mL de leite.

Foram inoculados a suspensão de esporos de *B. cereus* 12 cepas no leite em pó sendo feito em triplicatas totalizando 36 experimentos (n=36). Essas amostras foram armazenadas sob a temperatura ambiente de 25°C por 2 anos. A origem das cepas inoculadas no leite em pó está descrita na Tabela 2. As cepas foram derivadas de alimentos que continham leite em pó na sua composição ou que estavam contaminados.

**Tabela 2 - Fonte das Cepas**

<b>Cepa</b>	<b>Fonte</b>
	Cepa Padrão para processos térmicos
ATCC14579	
CCGB* 432	Chocolate
CCGB* 436	Chocolate
CCGB* 511	Laticínios
CCGB* 512	Laticínios
CCGB* 540	Laticínios
B3	Leite
B18	Amido
B51	Carne
B63	Refeição Pronta
B86	Farinha de Milho
B94	Leite

**Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.**

## 4.2 Procedimentos de preparo do leite em pó reconstituído

As amostras de leite em pó contaminadas foram reconstituídas em água destilada estéril manualmente com auxílio de um bastão de vidro por 1 minuto. Para a reconstituição foi mantida a proporcionalidade recomendada comercialmente pela maioria dos fabricantes de 26 gramas de leite em pó para cada 200 mL de água.

As condições de preparo foram similares as utilizadas no ambiente doméstico, lactários e serviços de alimentação conforme descrito pela OMS (2007). As simulações em laboratório foram necessárias para a manutenção da segurança biológica, considerando que foi manipulado um micro-organismo patogênico (*B. cereus*). Para o desenvolvimento do trabalho foram simuladas quatro condições de reconstituição do leite em pó. Os cenários envolveram as condições separadas para refletirem as condições usuais de preparo e armazenamento em ambientes domésticos e serviços de alimentação e nutrição (OMS, 2007). Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra.

## 4.3 Cenários para avaliação do comportamento do *Bacillus cereus*

Para avaliação do comportamento de *B. cereus* em leite em pó reconstituído foram testados 4 cenários: tratamento em chama direta, micro-ondas, armazenamento em geladeira e manutenção a temperatura ambiente.

A população de esporos e de células vegetativas de *B. cereus* foi determinada antes e após cada cenário aplicado.

### 4.3.1 Contagem de células vegetativas

Para enumeração das células vegetativas ( $N_0$ ). Foram realizados 2 plaqueamentos em superfície sem aplicação do choque térmico. O primeiro com a cepas plaqueadas diretamente e o segundo com aplicação do tratamento do cenário específico. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias e uma subtração entre as colônias de *B. cereus* obtidas após a aplicação do cenário com as

colônias obtidas com o plaqueamento direto. O resultado obtido dessa subtração foi o  $N_0$ .

#### **4.3.2 Contagem de esporos**

Para enumeração das esporos ( $N_F$ ) foram realizados 2 plaqueamentos em superfície com aplicação do choque térmico. O primeiro de 70°C por 15 minutos e o segundo choque térmico após a aplicação do cenário específico de 70°C por 10 minutos. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias e feita uma subtração entre as colônias de *B. cereus* obtidas após o cenário aplicado e as colônias de esporos obtidos antes da aplicação do cenário. O resultado obtido dessa subtração com choque térmico foi o  $N_F$ .

#### **4.3.3 Choque térmico para ativação dos esporos**

Para a contagem dos esporos utilizou-se a metodologia de Bennett, Tallent e Hait (2015) com modificações propostas por Alvarenga *et al.* (2018 a,b). Foram testadas algumas condições de ativação dos esporos antes dos cenários (75°C/20 minutos, 70°C/20 minutos) e após os cenários (70°C/10 minutos, 70°C/15 minutos, 70°C/20 minutos, 75°C/ 20 minutos e 80°C/30 minutos). As melhores condições de recuperação dos esporos para as cepas antes dos cenários foi 70°C/15 min (binômio tempo/temperatura ótimo para ativação dos esporos dados preliminares não apresentados). Após a aplicação dos cenários o melhor resultado obtido para cepas foi o binômio 70°C/10 min (dados preliminares não apresentados).

#### **4.3.4 Contagem de células vegetativas e esporos**

Para a enumeração dos esporos e células vegetativas de *B. cereus* após a reconstituição item 4.2 as amostras foram homogeneizadas e as diluições seriadas foram preparadas em solução de Citrato de Sódio (Synth, Brasil) 1%. O plaqueamento em superfície foi realizado em Ágar Nutriente (Neogen, EUA) seguindo-se incubação a 30°C por 24 horas. Para as amostras com contagem menor que 10 células por mL foi utilizada a técnica de NMP (Número Mais Provável) em caldo Tryptcase Soy Broth

(TSB, Neogen, EUA) (BLODGETT, 2020), suplementado com solução de Polimixina 10.000 UI/mL (InITripab, Brasil). Decorrido o período de incubação, as colônias com morfologia típica de *B. cereus* foram isoladas em Agar Manitol Gema de Ovo (MYP) (Neogen, EUA) suplementado com solução de Polimixina (Inlab, Brasil) 10.000 UI/mL e confirmadas por testes bioquímicos. Os mesmos procedimentos bioquímicos foram utilizados para confirmação dos tubos positivos.

Os dados de contagem antes e após as condições de preparo foram utilizados para calcular o número de reduções decimais ( $\gamma$ ) causadas por cada cenário. A determinação do  $\gamma$  em UFC foi feita de acordo com a Equação 1.

$$\gamma = \log \left( \frac{N_0}{N_F} \right) \quad (1)$$

Onde:  $N_0$  é a população de células vegetativas e  $N_F$  é a população de esporos.

#### 4.3.5 Cenário 1: Tratamento térmico por aquecimento direto em chama

As amostras de leite reconstruídas a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), acondicionadas em erlenmeyers estéreis, foram submetidas ao aquecimento em chama direta até a fervura a temperatura de  $98^\circ\text{C}$ . conforme procedimentos descritos pela OMS (2007). O tempo até atingir a fervura foi de 5 min ( $\pm 1$  min). Após a fervura as amostras foram resfriadas em banho de gelo a  $4^\circ\text{C}$  atingindo uma temperatura interna de  $40^\circ\text{C}$ . Para a determinação do número de reduções decimais ( $\gamma$ ) foram coletadas alíquotas antes após o tratamento. A enumeração da população foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.1 e 4.3.2. Os testes foram conduzidos em triplicata.

#### 4.3.6 Cenário 2: Tratamento térmico em micro-ondas

Após a reconstituição do leite em pó, em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) as amostras acondicionadas em erlenmeyers estéreis, foram colocadas no centro do micro-ondas doméstico (Eletrolux, MEX 55, volume 45 litros, tensão 127 V, corrente 13 A, frequência 60 Hz, China) e tratadas termicamente por 30 s. As condições de

aquecimento utilizadas são usuais em residências e unidades de alimentação e nutrição (LEITE, 2018). As amostras atingiram temperatura interna final de 90°C ( $\pm$  2°C). Após o aquecimento as amostras foram colocadas em um banho de gelo a 4°C para resfriamento atingindo uma temperatura interna de 40°C. A população de *B.cereus* foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.1 e 4.3.2. O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) calculado pela Equação 1. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **4.3.7 Cenário 3: Manutenção a temperatura ambiente**

As amostras de leite em pó reconstituídas em água destilada estéril foram mantidas a temperatura ambiente (25°C  $\pm$  2°C) por 2 horas (OMS, 2007). Cada amostra foi reconstituída separadamente e a população de *B. cereus* foi determinada após a reconstituição e após a manutenção a temperatura ambiente por 2 horas. A metodologia utilizada para contagem de células e esporos está descrita no item 4.3.1 e 4.3.2. Os testes foram conduzidos em triplicata.

#### **4.3.8 Cenário 4: Manutenção sob refrigeração**

As amostras de leite em pó foram reconstituídas em água destilada estéril e mantidas sob refrigeração (10°C  $\pm$  2°C) em refrigerador doméstico (Eletrolux, Infinty, Brasil) por 24 h. As contagens de células e esporos foram realizadas antes e após a manutenção sob refrigeração conforme descrito no item 4.3.1 e 4.3.2. Os testes foram conduzidos em triplicata.

### **4.4 Determinação da resposta mínima e máxima da sobrevivência de esporos de *Bacillus cereus***

O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) das cepas nos cenários foi avaliado estatisticamente por análise não paramétrica, pois os dados tanto para células vegetativas quanto para os esporos não atenderam aos pressupostos da análise de

variância que são a normalidade e a homocedasticidade das variâncias, sendo assim foram analisados pelo teste de kruskal-Wallis.

#### **4.5 Análises estatísticas**

As diferenças estatísticas entre as cepas com relação ao número de reduções decimais ( $\gamma$ ) foram comparados pelo teste de kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) utilizando o software R (version 4.0.3). O pacote utilizado para análise (Agricolae), utiliza para comparação das médias a diferença mínima significativa de Fisher.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos dos tratamentos na sobrevivência de esporos e células de *Bacillus cereus*

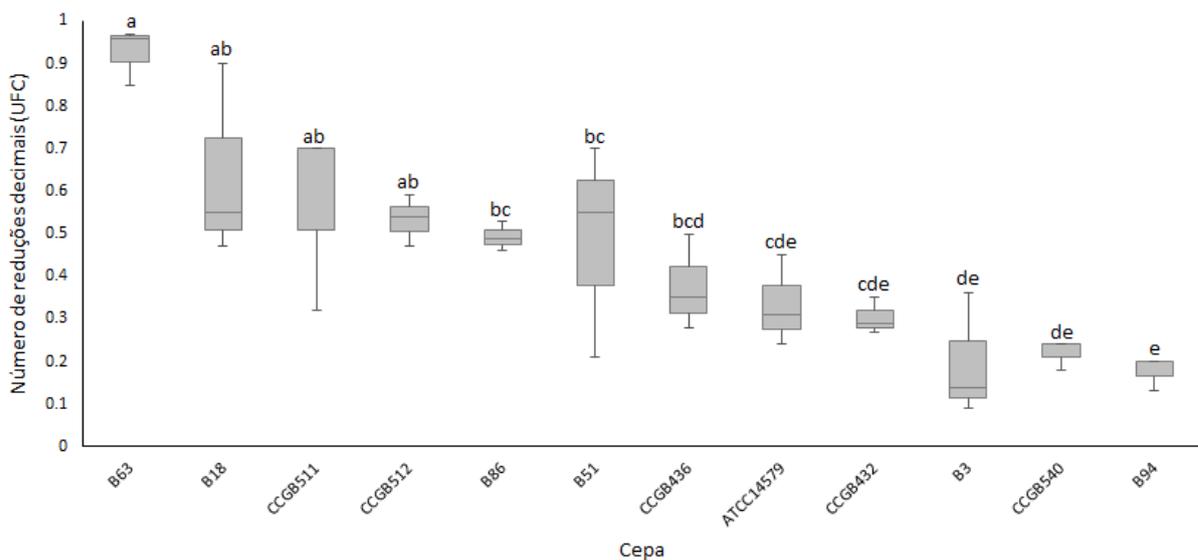
Os efeitos dos diferentes cenários na sobrevivência de *B. cereus* em leite em pó integral reconstituído estão demonstrados na Figuras de 1 a 9. A partir de uma inoculação de leite em pó estéril juntamente com a suspensão de esporos de  $7,2 (\pm 0,2) \log_{10}$  esporos por grama de massa seca no *spray drying*. Os resultados foram apresentados em número de reduções decimais ( $\gamma$ ) em UFC para cada um dos cenários testados, tanto para esporos quanto para células vegetativas. Os cenários avaliados refletem a forma de preparo em ambiente domésticos, serviços de alimentação e lactários.

#### 5.1.1 Aquecimento em chama direta

No tratamento térmico aquecimento em chama direta o  $\gamma$  para a população de células vegetativas variou de 0,18 UFC (B94) a 0,93 UFC (B63) (Figura 1). Para as células vegetativas, pode-se observar que há três grupos distintos com relação a sobrevivência ao tratamento térmico por aquecimento em chama, o primeiro grupo com o  $\gamma > 0,90$  UFC, o segundo grupo com  $\gamma$  variando entre 0,64 UFC e 0,49 UFC e o terceiro grupo com  $\gamma$  menor que 0,40 UFC. O primeiro grupo é composto somente pela cepa B63 ( $\gamma = 0,93$  UFC), sendo estatisticamente semelhante as cepas B18, CCGB511 e CCGB512. O segundo grupo compreende as cepas CCGB511 ( $\gamma = 0,57$  UFC), CCGB512 ( $\gamma = 0,53$  UFC), B18 ( $\gamma = 0,64$  UFC), B51 ( $\gamma = 0,49$  UFC) e B86 ( $\gamma = 0,49$  UFC). No terceiro grupo estão as cepas CCCGB432 ( $\gamma = 0,30$  UFC), CCGB436 ( $\gamma = 0,38$  UFC), CCBG540 ( $\gamma = 0,22$  UFC), B3 ( $\gamma = 0,20$  UFC), B94 ( $\gamma = 0,18$  UFC) e ATCC14759 ( $\gamma = 0,34$  UFC). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância ( $p < 0,05$ ) entre os grupos avaliados  $p = 0,004$ .

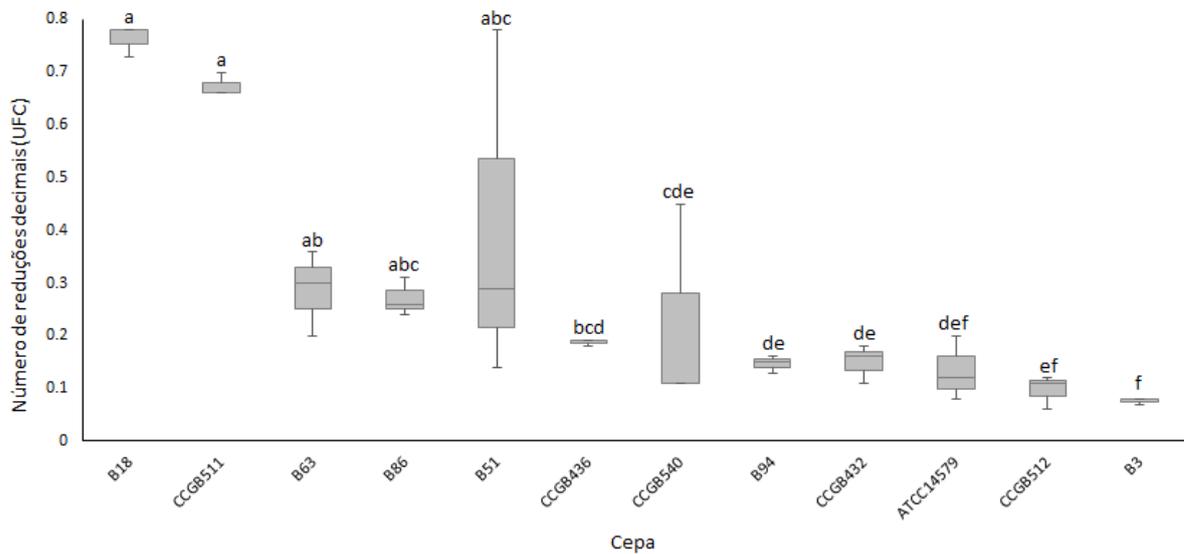
Nas células vegetativas a resposta da sobrevivência das cepas *B. cereus* em leite em pó integral reconstituído variou com valor mínimo 0,09 UFC para a cepa B3 e máximo de 0,97 UFC para a cepa B51.

**Figura 1 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de *Bacillus cereus* em leite em pó integral reconstituído após o tratamento térmico por aquecimento em chama direta**



Para os esporos de *B. cereus* em leite em pó integral reconstituído houve variação do valor mínimo 0,06 UFC para a cepa CCGB512 e máximo de 0,78 UFC para as cepas B51 e B18. O  $\gamma$  para esporos (Figura 2) no aquecimento em chama direta variou entre 0,76 UFC (B18) e 0,08 UFC (B3). O grupo com maior sobrevivência ao tratamento térmico é composto pelas cepas B3 ( $\gamma = 0,08$  UFC), CCGB 512 ( $\gamma = 0,09$  UFC), B94 ( $\gamma = 0,15$  UFC), CCGB432 ( $\gamma = 0,15$  UFC), CCGB436 ( $\gamma = 0,19$  UFC). O grupo com maior sensibilidade ao tratamento térmico é composto pelas cepas CCGB511 ( $\gamma = 0,67$  UFC) e B18 ( $\gamma = 0,76$  UFC) (Figura 2). A cepa utilizada como micro-organismo indicador para processamento térmico ATCC 14579, apresentou maior resistência ao aquecimento com  $\gamma = 0,13$  UFC (Figura 2) para esporos e  $\gamma = 0,33$  UFC (Figura 1) para células vegetativas.

**Figura 2 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de *Bacillus cereus* em leite em pó integral reconstituído após o tratamento térmico por aquecimento em chama direta**



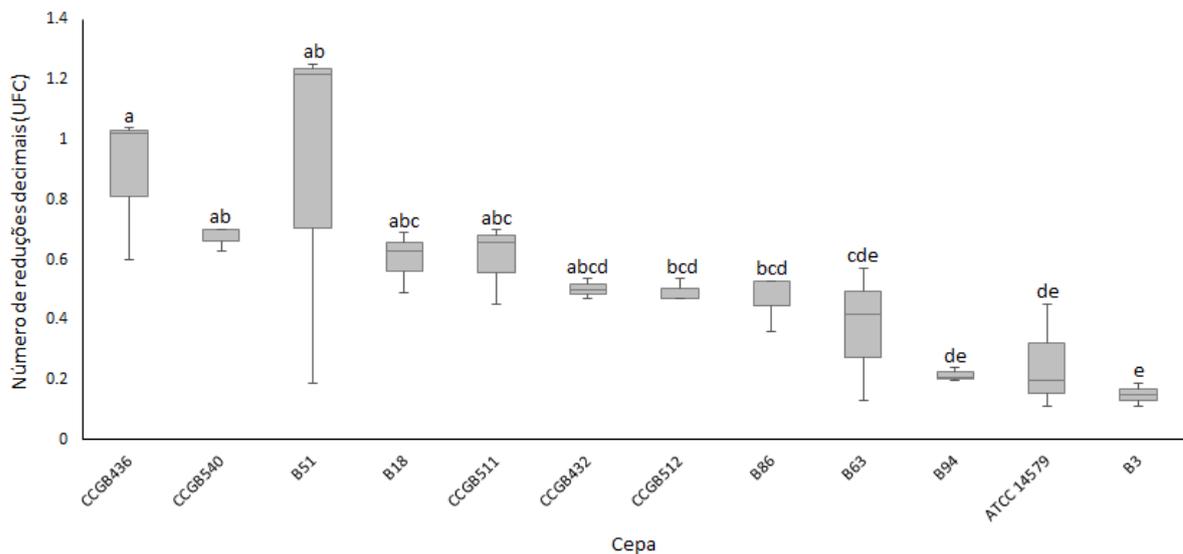
### 5.1.2 Aquecimento por micro-ondas

O tratamento térmico em micro-ondas doméstico foi realizado por 30 segundos, em potência alta (100%). A temperatura máxima atingida durante o aquecimento foi de 90°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante o aquecimento. O número de reduções decimais para células vegetativas variou de  $\gamma = 0,15$  UFC (B3) a  $\gamma = 1,23$  UFC (B51) (Figura 3) e para esporos a variação foi de  $\gamma = 0,14$  UFC (B3) e  $\gamma = 0,77$  UFC (B18) (Figura 4). A cepa B3 apresentou maior sobrevivência ao aquecimento por micro-ondas, com os menores valores de  $\gamma$  para células vegetativas ( $\gamma = 0,15$  UFC) e para esporos ( $\gamma = 0,14$  UFC). Sendo estatisticamente semelhante a cepa padrão ATCC 14579 ( $\gamma = 0,25$  UFC para as células vegetativas e  $\gamma = 0,34$  UFC para os esporos;  $p = 0,01$ ).

No aquecimento do leite em pó integral reconstituído observou-se que a sobrevivência de células vegetativas tem 3 grupos distintos, o primeiro grupo com  $\gamma$  menor que 0,30 UFC, o segundo grupo com  $\gamma$  variando entre 0,47 UFC e 0,67 UFC e o terceiro grupo com  $\gamma$  maior que 1 ciclo logarítmico. Esses grupos são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). As cepas com maior sensibilidade ao tratamento térmico por micro-ondas foram CCGB436 ( $\gamma = 1,02$  UFC) e B51 ( $\gamma = 1,23$  UFC). O grupo intermediário é composto pelas cepas CCGB432 ( $\gamma = 0,50$  UFC),

CCGB511 ( $\gamma = 0,60$  UFC), CCGB540 ( $\gamma = 0,67$  UFC), B18 ( $\gamma = 0,60$  UFC), B63 ( $\gamma = 0,49$  UFC) e B86 ( $\gamma = 0,40$  UFC). As cepas com maior resistência ao aquecimento por micro-ondas foram ATCC14579 ( $\gamma = 0,25$  UFC), B94 ( $\gamma = 0,22$  UFC) e B3 ( $\gamma = 0,15$  UFC). A resposta da sobrevivência das cepas *B. cereus* nas células vegetativas por aquecimento no micro-ondas variou com valor mínimo 0,11 UFC para as cepas ATCC14579 e B3 e valor máximo de 1,25 UFC para a cepa B51.

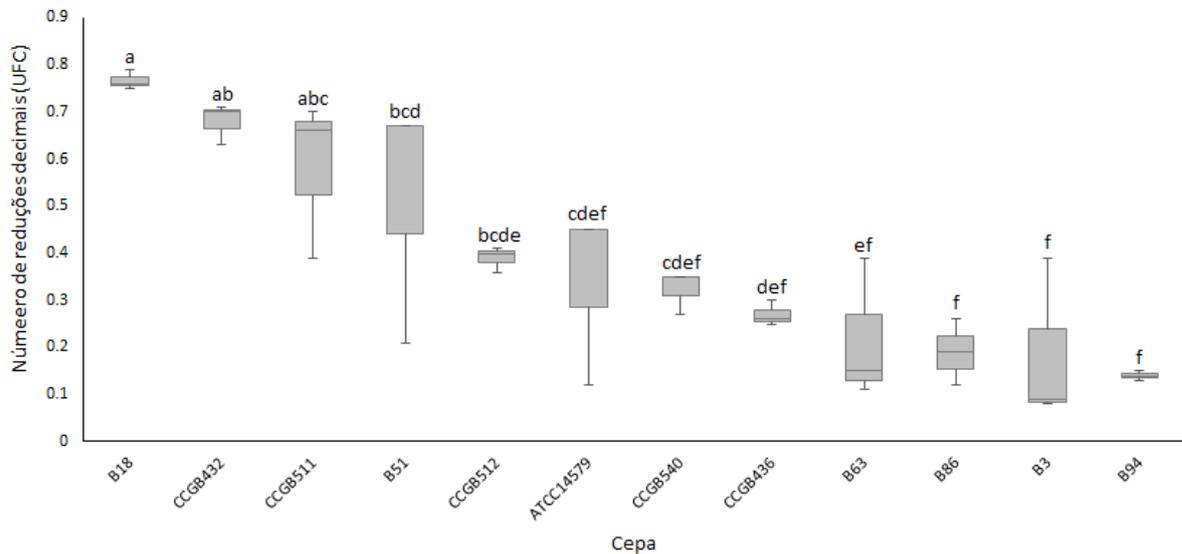
**Figura 3 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de *Bacillus cereus* em leite em pó integral reconstituído após o aquecimento por micro-ondas**



O maior número de redução na população de esporos ( $\gamma$ ) após o aquecimento de leite em pó reconstituído em micro-ondas foi observado para a cepa B18 ( $\gamma = 0,77$  UFC) (Figura 4). A sobrevivência dos esporos das cepas *B. cereus* no micro-ondas variou com mínimo 0,08 UFC para a cepa B3 e valor máximo de 0,79 UFC para a cepa B18.

No grupo de cepas resistentes ao aquecimento estão as cepas B94 ( $\gamma = 0,14$  UFC), B86 ( $\gamma = 0,19$  UFC) e B3 ( $\gamma = 0,19$  UFC). As cepas mais sensíveis aos tratamentos foram B18 ( $\gamma = 0,77$  UFC), CCGB432 ( $\gamma = 0,68$  UFC), B51 ( $\gamma = 0,52$  UFC) e CCGB511 ( $\gamma = 0,58$  UFC). A sensibilidade dos esporos ao aquecimento por micro-ondas difere significativamente entre as cepas avaliadas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de *Bacillus cereus* em leite em pó integral reconstituído após o aquecimento por micro-ondas**

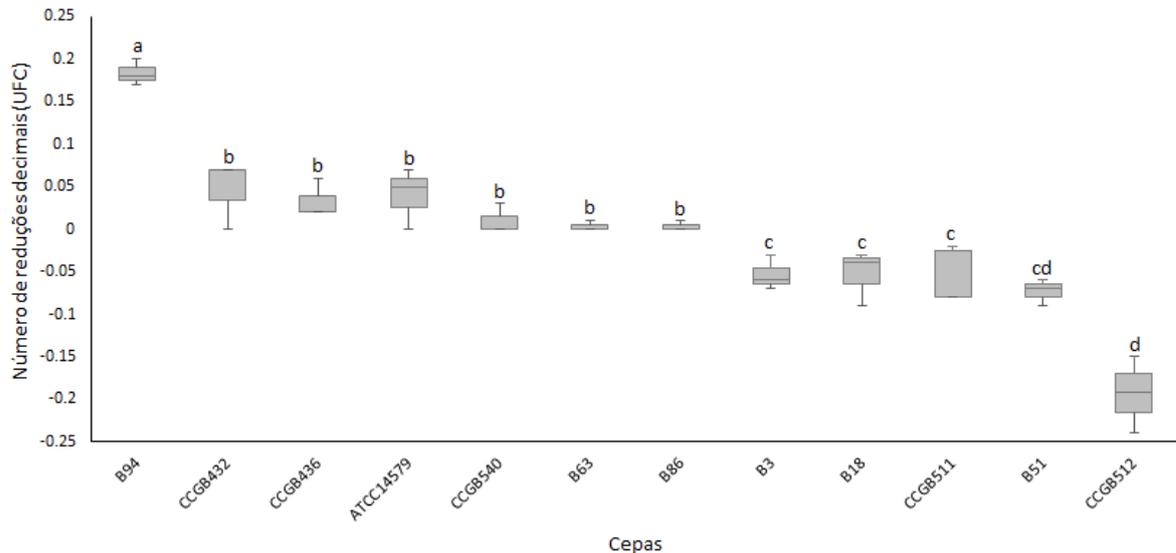


### 5.1.3 Manutenção a temperatura ambiente

As amostras de leite em pó integral reconstituídas foram mantidas a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 2h em condições estéreis.

A manutenção a temperatura ambiente o número de reduções para células vegetativas variou de -0,19 UFC (CCGB512) a 0,18 UFC (B94). Considerando o  $\gamma = -19$  UFC para a cepa CCGB512, pode-se observar que houve aumento na população de células vegetativas (Figura 5). O mesmo comportamento foi observado para as CCGB511 ( $\gamma = -0,06$  UFC), B3 ( $\gamma = -0,05$  UFC), B18 ( $\gamma = -0,05$  UFC) e B51 ( $\gamma = -0,05$  UFC). Entretanto, esse aumento na população de células vegetativas não foi significativo, pois foi menor que 0,5 UFC já que podem existir variações associadas aos métodos de contagem (MUNFORDA *et al.*, 2017).

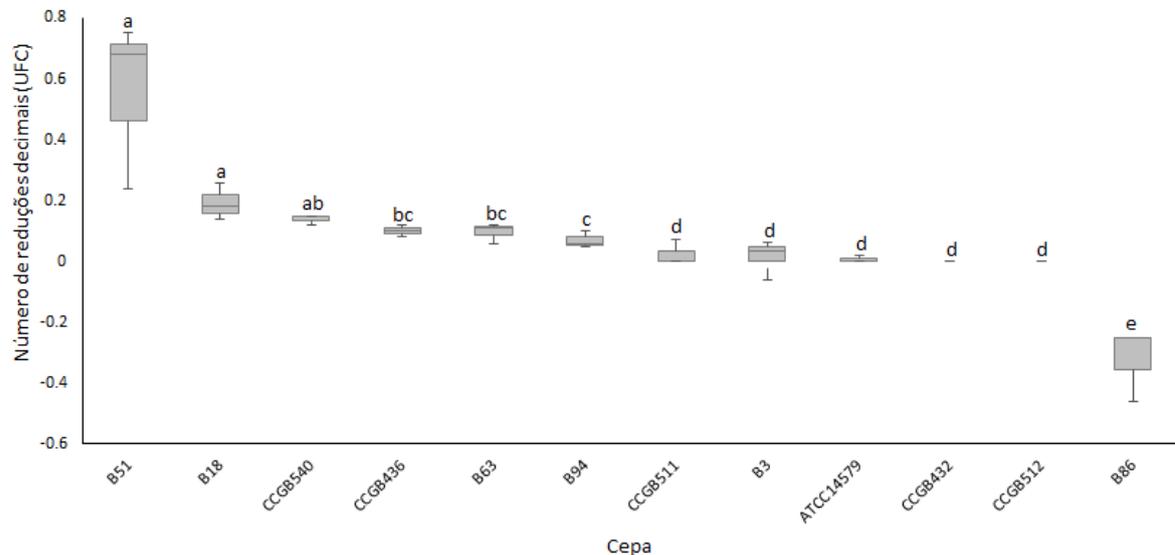
**Figura 5 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de *Bacillus cereus* em leite em pó integral após manutenção em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 horas**



Para a população de esporos, a manutenção do leite integral reconstituído a temperatura ambiente a variação no  $\gamma$  foi de 0,00 UFC (CCGB432 e CCGB512) a 0,72 UFC (B51) (Figura 6). A maiores reduções decimais para a população de esporos foi observada para as cepas B51 ( $\gamma = 0,72$  UFC), B18 ( $\gamma = 0,19$  UFC) e CCGB 540 ( $\gamma = 0,14$  UFC). A demais cepas testadas apresentaram número de reduções menores que 0,01 UFC. A redução da população de esporos durante a manutenção a temperatura ambiente pode indicar a germinação dos esporos. Essa observação corrobora com os resultados observados para células vegetativas, para as cepas B51 com aumento de na população de células vegetativas de  $0,24 \log_{10}$  para  $0,32 \log_{10}$  e para a cepa B18 com a população variando de  $0,35 \log_{10}$  para  $0,40 \log_{10}$ .

A sobrevivência das células vegetativas das cepas *B. cereus* na manutenção a temperatura ambiente variou com mínimo -0,24 UFC para a cepa CCGB512 e valor máximo de 0,2 UFC para a cepa B94. Para os esporos o mínimo foi -0,46 UFC para a cepa B86 e máximo 0,75 UFC para a cepa B51.

**Figura 6 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de *Bacillus cereus* em leite em pó integral após manutenção em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 horas**

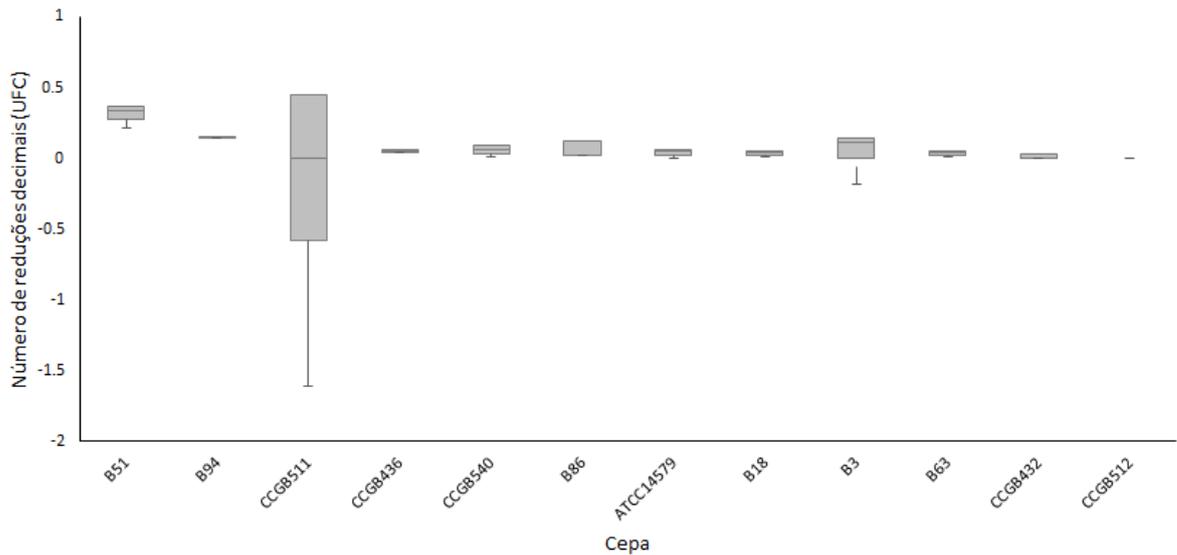


#### 5.1.4 Manutenção sob refrigeração

As amostras de leite integral reconstituído foram mantidas em refrigerador doméstico ( $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24h. O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) para células vegetativas variou de -0,24 UFC (CCGB511) a 0,31 UFC (B51) (Figura 7). As cepas com os maiores número de reduções foram B51 ( $\gamma = 0,31$  UFC) e a B94 ( $\gamma = 0,15$  UFC). As cepas que apresentaram  $\gamma$  menor que 0,1 UFC foram B63 ( $\gamma = 0,03$  UFC), CCGB 540 ( $\gamma = 0,06$  UFC), B3 ( $\gamma = -0,01$  UFC), ATCC14579 ( $\gamma = 0,04$  UFC), CCGB 432 ( $\gamma = 0,02$  UFC), CCGB 512 ( $\gamma = 0,00$  UFC), B18 ( $\gamma = 0,04$  UFC), CCGB436 ( $\gamma = 0,06$  UFC) e B86 ( $\gamma = 0,09$  UFC).

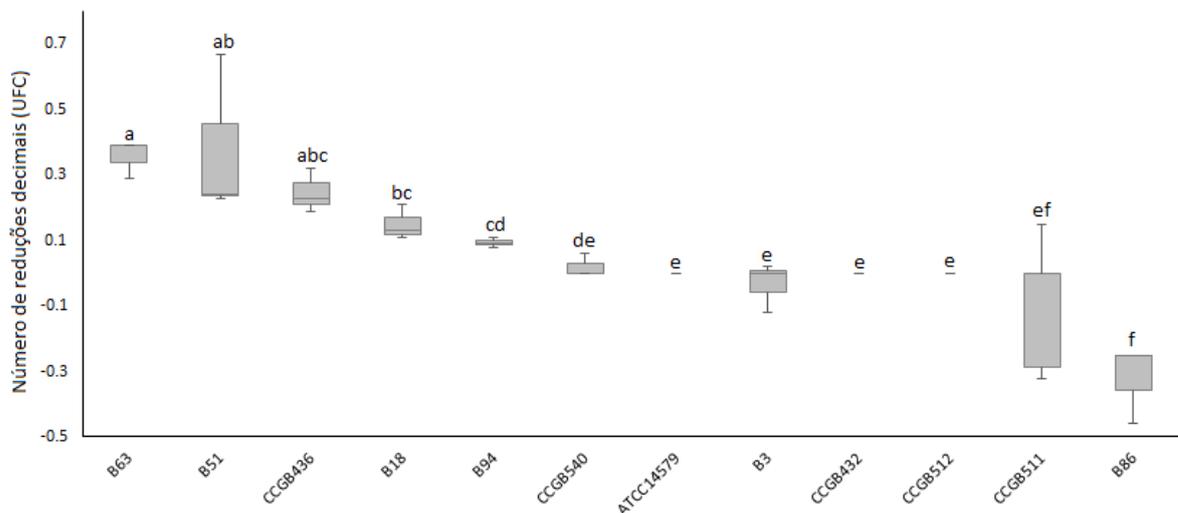
A sobrevivência das células na refrigeração variou com mínimo -1,61 UFC e máximo de 0,45 UFC ambos para a cepa CCGB511. O comportamento da células vegetativas na refrigeração indica que não houve diferença estatística entre as cepas ( $p=0,12$ ).

**Figura 7 - Boxplot para o número de reduções decimais para células vegetativas de *Bacillus cereus* em leite em pó integral após manutenção sob refrigeração ( $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas**



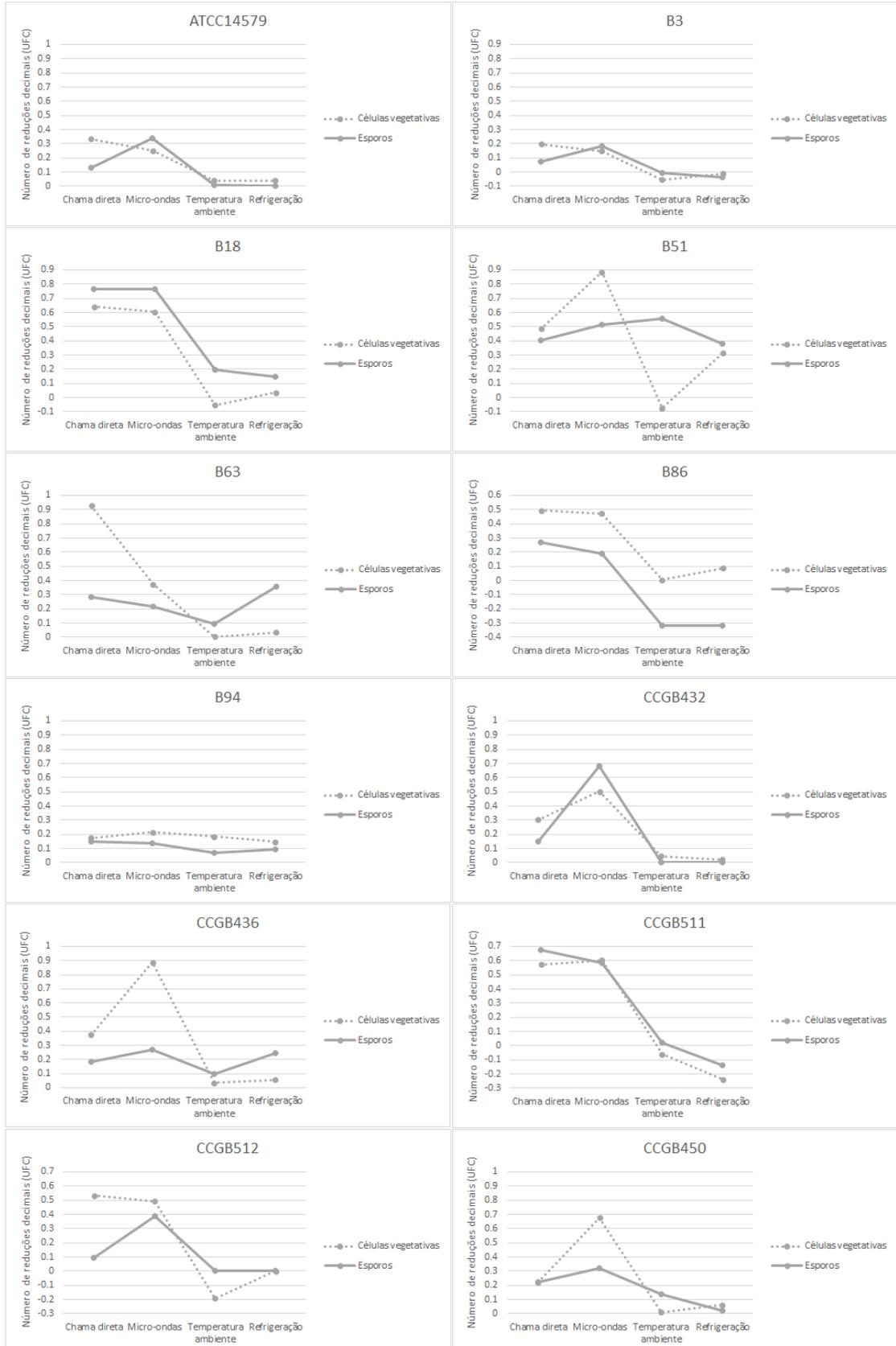
O  $\gamma$  para a população de esporos durante a manutenção sob refrigeração variou de 0,39 UFC (B51) a -0,32 UFC (B86) (Figura 8). O maior número de reduções foi observado para a cepa B51 ( $\gamma = 0,39$  UFC), seguido pelas cepas B63 ( $\gamma = 0,36$  UFC), CCGB436 ( $\gamma = 0,25$  UFC) e B18 ( $\gamma = 0,15$  UFC) (Figura 8). As cepas ATCC14579, CCGB432 e CCGB512 apresentaram  $\gamma = 0,00$  UFC (Figura 8). Para os esporos o valor mínimo variou de -0,46 UFC para a cepa B86 e máximo 0,67 UFC para a cepa B51.

**Figura 8 - Boxplot para o número de reduções decimais para esporos de *Bacillus cereus* em leite em pó integral após manutenção sob refrigeração ( $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas**



5.1.5 - Variação dos esporos e células vegetativas por cepa nos cenários

Figura 9 - Comportamento Células vegetativas e esporos por cepa nos cenários aplicados



Avaliando o comportamento das reduções das cepas nos cenários aplicados (Figura 9) usando o excel o resultado tanto de células vegetativas quanto de esporos que mais se aproximou dos resultados obtidos pela cepa padrão de tratamentos térmicos ATCC14579 foi a cepa B3 derivada do leite apresentando comportamentos similares durante os 4 cenários aplicados. O restante das cepas apresentaram comportamentos distintos comparados à cepa padrão.

As reduções observadas no cenário de chama direta e micro-ondas entre as cepas ATCC14579 e a B3 observa-se que houve redução no tratamento de chama direta e micro-ondas já na temperatura ambiente e na refrigeração as cepas se mantiveram praticamente constante.

## 6 DISCUSSÃO

A ocorrência esporos de *B. cereus* em leite em pó varia de 0,3 a 4 log<sub>10</sub> (BECKER *et al.*, 1994; REYES e BASTÍAS *et al.*, 2007). Embora as condições, no leite em pó, não sejam favoráveis a germinação e multiplicação, quando reconstituído, esse produto em um ambiente propício para o desenvolvimento desse micro-organismo; (REYES e BASTÍAS *et al.*, 2007). Tornando um alimento inseguro para consumo humano (BAE *et al.*, 2012; BERTHOLD-PLUTA, PLUTA e GARBOWSKA, 2015; GRANUM e LINDBÄCK, 2013)

Ao ser aquecido a resposta dos esporos irá depender da cepa e da composição do meio o qual esses esporos estão inseridos (MAZAS *et al.*, 1999). O leite em pó não proporciona as condições adequadas para a germinação de esporos de *B. cereus*, mas após reconstituição e o armazenamento na temperatura ambiente pode ocorrer germinação dos esporos e células vegetativas produzindo toxinas (DI PINTO *et al.*, 2013).

Há uma diversidade na capacidade de germinação de esporos de cepas de *B. cereus* induzidas por nutrientes em alimentos matrizes. No leite há relatos de uma germinação bastante eficiente além de ativação de esporos pelo calor (ABEE *et al.*, 2011).

A diversidade das cepas, esporulação e as condições de germinação influenciam tanto o papel dos germinantes quanto as características dessa germinação (HORNSTRA *et al.*, 2006b). A temperatura em que ocorre essa esporulação é um fator relevante para determinar a resistência ao calor dos esporos, sendo os esporos formados em temperaturas mais altas apresentam maior resistência ao calor, mas existem estudos que mostram diferentes influências da temperatura (GOUNINA-ALLOUANE *et al.*, 2008).

Abee *et al.* (2011) constatou que o processo de germinação de esporos apresenta um papel fundamental durante o primeiro estágio do alimento deteriorado e na infecção de origem alimentar, pois ocorre a mudança de um esporo dormente para um célula vegetativa. Moléculas produzidas no alimento iniciam o processo de germinação do esporo possivelmente com a combinação de um tratamento térmico. Para garantir a qualidade de um alimento é preciso prevenir a germinação desses

esporos através de inibidores de germinação, mas não são esperados bloqueadores de germinação nos alimentos.

Dos cenários avaliados nesse estudo o que mostrou maior capacidade de redução na população de células vegetativas ( $\gamma = 1,23$  UFC cepa B51) e esporos ( $\gamma = 0,77$  UFC cepa B18) foi o aquecimento em micro-ondas. Gibson *et al.*, (1999) e Woo *et al.*, (2000) já haviam constatado que a maior redução na população de *B. cereus* por micro-ondas está associada a geração de calor pelas ondas eletromagnéticas. Esse tipo de cenário tem vantagens devido à redução de degradação térmica do produto, gera calor de maneira uniforme, requer menos tempo para atingir o processo de temperatura desejado (GIBSON *et al.*, 1999; WOO *et al.*, 2000).

Estudos tem demonstrado que a irradiação promovida pelo micro-ondas é bastante eficaz (CELANDRONI *et al.*, 2004; WELT *et al.*, 1994). Considerando os resultados obtidos nos experimentos com cenário térmico, aquecimento em chama (Figuras 1 e 2) e micro-ondas (Figuras 3 e 4), as amostras tratadas no micro-ondas obteve a maior redução de células vegetativas e esporos. Além disso, a alta atividade de água do leite reconstituído, é um fator crítico para a inativação dos esporos por micro-ondas (HYONG *et al.*, 2017). A temperatura interna das amostras reconstituídas aquecidas em micro-ondas foi de 90°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), enquanto as amostras aquecidas em chama direta foi de 98°C. Apesar da temperatura no cenário de chama direta ser mais elevada o número de reduções para a população de esporos da cepa ATCC14579 foi menor ( $\gamma = 0,13$  UFC aquecimento direto), ( $\gamma = 0,34$  UFC micro-ondas).

Esses resultados indicam que os mecanismos de transferência e distribuição de calor são melhores no aquecimento por micro-ondas (ALEJANDRO *et al.*, 2019).

Os efeitos esporocidas dos micro-ondas foram atribuídos não somente ao calor (KIM *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2004), mas também pela capacidade de rompimento da membrana celular, degradação da cromatina e a alteração na síntese de proteínas (JIN-XUAN *et al.*, 2018). O aquecimento por micro-ondas também pode promover a ruptura da membrana celular segundo Diao *et al.* (2014), alteração no proteoma da célula comprometendo o metabolismo celular (JIN-XUAN *et al.*, 2018)

Durante a manutenção das amostras de leite reconstituído na temperatura ambiente não foi observado a multiplicação e/ou redução no número de células vegetativas (Figura 5). Entretanto, uma mudança na população de esporos (Figura 6) pode indicar a germinação dos esporos. Modelos descritos na literatura (BURSOVÁ

*et al.*, 2018) indicam que a exposição de *B. cereus* a uma temperatura de 24°C por 24 horas há produção de enterotoxina Nhe, hemolisina BL e toxina emética. Além disso, cepas de *B. cereus* com características psicotróficas podem se multiplicar e produzir enterotoxinas em temperaturas de 4 e 8°C (BURSOVÁ *et al.*, 2018). Os resultados da manutenção sob refrigeração indicaram redução na população de células vegetativas das cepas B51 e CCGB512 (Figura 7). Entretanto, para a população de esporos houve a indicação da germinação para a cepa CCGB511.

Na Bélgica um trabalho em que foi determinado a temperatura mínima para o crescimento 380 cepas de *B. cereus* isoladas de materiais alimentares descobriu que a maioria dos isolados não cresceu a temperatura  $\leq 8^{\circ}\text{C}$ , mas 88% dos isolados cresceram a 10°C, 50% a 9°C, 7% a 8°C, 3% a 7°C, <1% a 6°C e nenhum a 5°C (SAMAPUNDO, HEYNDRIKX, XHAFERI E DEVLIEGHIERE, 2011).

O reaquecimento de produtos alimentares poderia eliminar rapidamente células vegetativas psicrotolerantes de *B. cereus*, entretanto a toxina cerulida é termoestável de acordo com Hoton *et al.*, (2009). A sobrevivência de esporos após os produtos terem sido submetidos ao processamento térmico pode levar à germinação de microorganismos e conseqüentemente deterioração do produto e até mesmo surtos de doenças (BERENDSEN *et al.*, 2015; DEN BESTEN *et al.*, 2017a, b).

Esses dados indicam que a variação no comportamento microbiano não deve ser desprezada. Principalmente, quando se trata de uma avaliação quantitativa de risco, pois o impacto na estimativa de risco associada ao consumo pode ser subestimado (ALVARENGA *et al.*, 2018b).

As práticas de reconstituição do leite apresentados neste estudo são utilizadas com frequência em residências, restaurantes, estabelecimentos de alimentação coletiva e hospitais. O ideal no consumo do leite em pó seria o seu consumo imediato após a reconstituição, mas sabemos que em determinadas situações os consumidores fazem armazenamento do produto seja em temperatura ambiente ou geladeira o que pode comprometer a qualidade do produto se estiver contaminado com cepas de *B. cereus*. O *B. cereus* além de causar intoxicações alimentares (diarreica e síndrome emética) podem causar infecções que não sejam gastrointestinais que podem ser fatais principalmente para pacientes que apresentam um comprometimento no seu sistema imune (MAHLER *et al.*, 1997; AVASHIA *et al.*, 2007).

## 7 CONCLUSÕES

O cenário de micro-ondas causou o maior número de reduções ( $\gamma$ ) tanto para células vegetativas ( $\gamma = 1,23$  UFC) quanto nos esporos ( $\gamma = 0,77$  UFC). No aquecimento em chama direta o  $\gamma$  foi de 0,76 UFC para esporos e 0,94 UFC para células vegetativas. Na manutenção em temperatura ambiente e sob refrigeração indicou a possibilidade de germinação de esporos ( $\gamma = - 0,14$  UFC).

O aquecimento em micro-ondas é o mais indicado para ser realizado em unidades de alimentação, hospitais e residências em relação à fervura. Esse cenário mostrou-se mais efetivo para redução de *B. cereus*. Os resultados destacam que as condições de aquecimento utilizadas na reconstituição do leite em pó não são capazes de fornecer mais de 2  $\gamma$  UFC de *B. cereus*, apresentando potencialmente riscos à saúde pública.

## SUGESTÕES DO TRABALHO

Finalização dos experimentos com todas as amostras doadas para verificar o comportamento das cepas de *B. cereus* inoculadas no leite em pó desnatado, integral e nas suas variações de cenário térmico. Além disso, testar outros cenários utilizando a combinação dos tratamentos avaliados. Sugestões de continuidade do experimento para futuros trabalhos.

## REFERÊNCIAS

ABABOUC, L.; DIKRA, A.; BUSTA, F. F. Tailing of survivor curves of clostridial spores heated in edible oils. **J. Appl. Bacteriol**, v. 62, p. 503–511.1987.

ABABOUC, L.; BUSTA, F. F. Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. **J. Appl. Bacteriol**, v.62, p. 491–502.1987.

ABEE, T et al. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiology**, v. 28, p. 199 – 208. 2011.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *bacillus-cereus*. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 129 (1), p.17–19.1995.

Agricolae: <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>.

ALEJANDRO R. L.; JAVIER R. A.; EMILIANO E. B.; RODOLFO H. M. Comparative study between conventional and microwave-assisted pasteurization of packaged milk by finite element modeling. **Institute of Food Science Technology**, p. 1-14, 2019.

ALVARENGA, VERÔNICA.O.; BRANCINI, G.T.P.; *et al.* Survival variability of 12 strains of *Bacillus cereus* yielded to spray drying of whole milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 80–89. 2018a.

ALVARENGA, VERÔNICA O.; *et al.* Quantifying the Responses of Three *Bacillus cereus* Strains in Isothermal Conditions and During Spray Drying of Different Carrier Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p.29, maio. 2018b.

ALVES, N. N.; MESSAOUD, G.; BEN DESOBRY, S.; COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **J. Food Eng**, v.189, p. 45–54. 2016.

AMIALI, M.; NGADI, M. O.; SMITH, J. P.; RAGHAVAN, G. S. V. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.689 e 694. 2007.

ANSARI J.A.; ISMAIL M.; FARID M. Investigation of the use of ultrasonication followed by heat for spore inactivation. **Food Bioprod Process**, v. 104, p.32–39. 2017.

ASHENAFI, M. **Thermal Effects in Food Microbiology**, In Sun D.-W., editor. Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues, **CRC Press**, p. 65-79. 2012.

ATRIH, A., FOSTER, S.J. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. **J. Appl. Microbiol**, v. 91, p. 364 e 372. 2001.

AUGUSTO, P.E.D.; SOARES, B.M.C.; AND CASTANHA, N. **Conventional Technologies of Food Preservation**, In Barba F., SANT'ANA A.D.S., ORLIEN V., *et al.*, editors: Innovative Technologies for Food Preservation. Elsevier, p. 3-23. 2018.

AVASHIA, S.B.; RIGGINS, W.S.; LINDLEY, C. *et al.* Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* Containing *Bacillus anthracis* toxin genes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 414–416. 2007.

BAE, Y.-M., KIM, B.-R., LEE, S.-Y., CHA, M.-H., PARK, K.-H., CHUNG, M.-S., *et al.* Growth and predictive model of *Bacillus cereus* on blanched spinach with or without seasoning at various temperatures. **Food Science and Technology**, v. 21, p.503 e 508. 2012.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Encyclopedia of Life Support Systems. ed. **Food Engineering**. Paris: UNESCO Publishing. 2005.

BARTOSZEWICZ, H.; HANSEN, BM.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiol**, v. 25, p.588- 96. 2008.

BECKER, H.; SCHALLER, G; VON WIESE W.; TERPLAN, G.; *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **Int J Food Microbiol**, v.23, p.1–15. 1994.

BEECHER, D.J.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. Enterotoxic activity of hemolysin bl from *bacillus-cereus*. **Infect. Immun**, v.63 (11), p. 4423–4428. 1995.

BENNETT, REGINALD W.; TALLENT, SANDRA M.; HAIT, JENNIFER M. *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* Toxins. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. [S.l.]: **American Public Health Association**. 2015.

BENNETT, S.D.; WALSH, K.A.; GOULD, L.H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v.57, n.3, p. 425-433, 2013.

BERENDSEN, E.M.; ZWIETERING, M.H.; KUIPERS, O.P.; WELLS-BENNIK, M.H.J.; Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. **Food Microbiol**, v.45, p.18–25. 2015.

BERTHOLD-PLUTA, A.; PLUTA, A.; GARBOWSKA, M. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p.7 e 14. 2015.

BEUCHAT, L.R.; KOMITOPOULOU, E.; BECKERS, H.; BETTS, R.P.; BOURDICHON, F.; FANNING, S.; JOOSTEN, H.M.; KUILE, B.H.T. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 150- 172. 2013.

BHATTACHARYA, S. **Conventional and Advanced Food Processing Technologies**. Chennai: John Wiley & Sons Ltda, 2014.

BIBI, F.; GUILLAUME, C.; GONTARD, N, *et al.* A review: RFID technology having sensing aptitudes for food industry and their contribution to tracking and monitoring of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p.91-103. 2017.

BLODGETT, R.; BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. **FDA**. 2020.

BOWER, C.; DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, p. 50, v. 33-44. 1999.

BOZKURT-CEKMER, H.; DAVIDSON, P.M. **Microwaves for microbial inactivation efficiency and inactivation kinetics**, *In* REGIER, M.; KNOERZER K.; SCHUBERT, H. Editors: The Microwave Processing of Foods. Elsevier, p. 220-251. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa n.60, de 23 de dezembro de 2019. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. 2019.

BURGESS, S.A.; LINDSAY, D.; FLINT, S.H. *Thermophilic bacilli* and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 215–225. 2010.

BURSOVÁ, S.; NECIDOVÁ, L.; HARUŠTIAKOVA, D.; Growth and toxin production of *Bacillus cereus* strains in reconstituted infant milk formula. **Food Control**, v. 93, p. 334 e 343. 2018.

BUSTA, F.F. Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. **Applied microbiology**, v.15, p. 640-645. 1967.

BYLUND, G. **Dairy processing handbook**, Tetra Pak Processing Systems AB. 1995.

CAEL, J. J.; KOENIG, J. L. and BLACKWELL, J.; Carbohydr. Res. 29, 123(1973).

CALLEFE, J.L.R.; LANGONI, H. **Qualidade do leite: uma meta a ser atingida**. Veterinária e Zootecnia. v.22(2). p.151-162. 2015.

CAPPATO, L.P.; FERREIRA, M.V.S; GUIMARAES, J. *et al.* Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 104-112. 2017.

CARSTENSEN, E.L. Biological effects of acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*, v. 12(9), p. 703–704. 1986.

CELANDRONI, F.; LONGO, I.; TOSORATTI, N.; GIANNESI, F.; GHELARDI, E.; SALVETTI, S.; *et al.* Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. **J. Appl. Microbiol**, v.97, p.1220-1227. 2004.

CHAVES, J. Q. *et al.* Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 1060-1065, 2017.

CHAVES, J. Q.; PIRES, E. S.; VIVONI, A. M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 12-16, 2011.

CHA-UM, W.; RATTANADECHO, P.; e PAKDEE, W. Experimental and numerical analysis of Microwave Heating of Water and Oil using a rectangular wave guide:

Influence of sample sizes, positions, and microwave power. **Food Bioprocess and Technology**, v.4, p.544–558. 2011.

CHIPLEY, J. R.; L. A. ROHIFS; C. L. FORD. Heat activation of *Bacillus* spores by the use of microwave irradiation. **Microbios**, v. 29, p.105–108.1980.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **J. Dairy Sci**, v.82, p.305-314. 1999.

COIA, J. E.; JOHNSTON, Y.; STEERS, N. J.; and HANSON, M. F. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. **International Journal of Food Microbiology**, v.66, p.63–69. 2001.

COLLIER, F.A.; ELLIOT, S.L.; ELLIS, R.J.; Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 54, p.417-425. 2005.

DATTA, A.K.; DAVIDSON, P.M. Microwave and radio frequency processing. – Supplement Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies. **Journal of Food Science**, v.65, p. 32–41. 2000.

DEETH, H. Optimum Thermal Processing for Extended Shelf-Life (ESL) Milk. **Foods**, v. 6, p. 102-102. 2017.

DEN BESTEN, H.M.W.; ARYANI, D.C.; METSELAAR, K.I.; ZWIETERING, M.H. Microbial variability in growth and heat resistance of a pathogen and a spoiler: all variabilities are equal but some are more equal than others. **Int. J. Food Microbiol**, v.240, p. 24–31.2017a.

DEN BESTEN, H.M.W.; BERENDSEN, E.M.; WELLS-BENNIK, M.H.J.; STRAATSMA, H.; ZWIETERING, M.H. Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of *Bacillus subtilis*. **Int. J. Food Microbiol**, v.253, p.48–53. 2017b.

DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J. G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, p. 109–116. 2014.

DI PINTO, A.; BONERBA, E.; BOZZO, G.; CECI, E.; TERIO, V.; and TANTILLO, G. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. **European Food Research and Technology**, v. 237, p.275 e 279.2013.

DOLL, E.V.; SCHERER, S.; WENNING, M. Spoilage of Microfiltered and Pasteurized Extended Shelf Life Milk Is Mainly Induced by Psychrotolerant Spore-Forming Bacteria that often Originate from Recontamination. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13. 2017.

DREWNOWSKA, J. M.; AND SWIECICKA, I. Eco-genetic structure of *Bacillus cereus* sensu lato populations from different environments in northeastern Poland. 2013.

DROBNIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clin Microbiol Rev**, v.6, p. 324-38. 1993.

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R. NOTERMANS S. Characteristics of some psychrotrophics *Bacillus cereus* isolates. **Int J Food Microbiol**, v.27, p.175-83. 1995.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Mol. Nutr. Food Res**, v.48, p.479–487.2004.

EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; GUINEBRETIERE, M.-H.; LINDBÄCK, T.; ANDERSON, M.; SCHULZ, A., *et al.* Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. **Microbiology**, v. 151, p.183 e197. 2005.

ERKMEN, O.; BARAZI, AÖ. Kinetics of Microbial Inactivation. **Handbook of Food Safety Engineering**, p. 92-107. 2012.

EVELYN, SILVA FVM. High pressure thermal processing for the inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry. **Innovative Food Sci Emerg. Technol**, v.33, p. 26–31. 2016b.

EVRENDILEK, G. A.; ZHANG, Q. H. Effects of pH, temperature and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 755 e 759. 2003.

FAYAD, N. *et al.* Diversity of *Bacillus cereus* sensu lato mobilome. **BMG Genomics**, v. 20, p. 436. 2019.

FELLOWS, PJ. Food Processing Technology: Principles and Praticce. **Woodhead Publishing**. 2009.

FINLAY, W.J.; LOGAN, N.A. AND SUTHERLAND, A.D.; *Bacillus cereus* produces most emetic toxins at lower temperatures. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 31, p. 385–389. 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition, 2012. Available from: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>. Access on: 11 Dec. 2020.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **J. Appl. Microbiol**, v.87, p. 41-48.1999.

GOUNINA-ALLOUANE, R.; BROUSSOLLE, V.; CARLIN, F. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. **Food Microbiol**, v. 25, p. 202 e 206. 2008.

GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *B. cereus* from dairy products, food poisoning incidences and non-gastrointestinal infections. **Int. J. Food Microbiol**, v.17, p.269–279. 1993.

GRANUM, P. E.; LINDBÄCK, T. *Bacillus cereus*. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, Fourth edition (pp.491 e 502). Washington, DC: ASM Press.2013.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol. Lett**, v.157, p.223–228.1997.

GUNDOGAN, N.; AVCI, E. Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. **International Journal of Dairy Technology**, v.67, p. 562–569. 2014.

HEDDLESON, R.A.; DOORES, S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens – a review. **Journal of Food Protection**, v.57, p.1025–1037.1994.

HENDRIKSEN, N.B.; HANSEN, B.M.; JOHANSEN, J.E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 239 -249. 2006.

HEWITT, G.F.; SHIRES, G.L.; BOTT, T.R. Process Heat Transfer. **Behel House**. 2000.

HEYNDRICKX, M. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2011, p. 11. 2011.

HIRVI, Y.; GRIFFITHS, M.W. Milk catalase activity as an indicator of thermization treatments used in the manufacture of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 338-345. 1998.

HONG, S.M.; PARK, J.K.; LEE, Y.O. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids. **Water Res**, v. 38 p. 1615-1625. 2004.

HORNSTRA, L.M.; VRIES, Y.P., VOS, W.M., ABEE, T. Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 72, p. 3746 e 3749. 2006b.

HOTON, F.M., FORNELOS, N., N'GUESSAN, E., HU, X.M., SWIECICKA, I., DIERICK, K., JAASKELAINEN, E., SALKINOJA-SALONEN, M., MAHILLON, J. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. **Env. Microbiol. Rep**, v.1, p.177 e 183. 2009.

HYONG, S P.; JUNGWOO Y.; HEE J C.; and KYOUNG H K. Effective Thermal Inactivation of the Spores of *Bacillus cereus* Biofilms Using Microwave. **J. Microbiol. Biotechnol.** p.1209–1215. 2017.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Unit Operations in Food Processing, CRC Press. JIANG, H.; GU, Y.; GOU, M *et al.*: Radio frequency pasteurization and disinfestation techniques applied on low-moisture foods, Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 60, p.1417-1430. 2002.

JAUQUETTE, C.B.; BEUCHAT, L.R. Survival and Growth of Psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and Reconstituted Infant Rice Cereal. **J. Food Prot**, v.61, p. 1629–1635.1998.

JAYARAO, B. M.; DONALDSON,S.C.; STRALEY, B. A.; SAWANT, A.A.; HEGDE,N.V.; and BROWN, J. L. A survey of foodborne pathogens in bulk tankmilk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 2451–2458. 2006.

JIANG, H.; GU, Y.; GOU, M *et al.* Radio frequency pasteurization and disinfestation techniques applied on low-moisture foods, *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, v. 60, p. 1417-1430. 2020.

JIN-XUAN C. *et al.* The Influence of Microwave Sterilization on the Ultrastructure, Permeability of Cell Membrane and Expression of Proteins of *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p.1870.2018.

JONGHE, V.; COOREVITS, A.; BLOCK, J.; COILLIE, E.V.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, n.3, p.318-325. 2010.

KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P. Improved thermal processing for food texture modification, *In* Chen, J.; and Rosenthal, A. editors: *Modifying Food Texture*. **Elsevier**, p. 115-131. 2015.

KAKAÇ, S.; LIU, H.; AND PRAMUANJAROENKIJ, A. *Heat Exchangers Selection, Rating, and Thermal Design*. **CRC Press**. 2012.

KAMINSKA, P.S.; YERNAZAROVA, A.; DREWNOWSKA, J.M.; ZAMBROWSKI, G.; SWIECICKA, I. The worldwide distribution of genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis-like* plasmids. **Environ Microbiol Rep**, v. 7, p.738 –745. 2015.

KELLY, A.; DATTA, N.; DEETH, H. **Thermal Processing of Dairy Products**, In Sun D.-W., editor. Thermal Food Processing, CRC Press, p. 273-306. 2012.

KHALIL, H.M.; VILLOTA, R. Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 181–186.1988.

KIM, H. W.; LEE, S.-A.; YOON, Y.; PAIK, H.-D.; HAM, J.-S.; HAN, S.-H. *ET AL.* Development of kinetic models describing kinetic behavior of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in milk. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 33, p. 155 e 161. 2013.

KIM, J.-B., KIM, J.-M., PARK, Y.-B., HAN, J.-A., LEE, S.-H., KWAK, H.-S., *et al.* Evaluation of various PCR assays for detection of emetic-toxin-producing *Bacillus cereus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.1107 e 1113. 2010.

KING, H. AND BEDALE, W. Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls. **Elsevier**. 2017.

KOENIG, J. L.; J. Polym. Sci., Part D 6, 59.1972.

KRANZLER, M.; STOLLEWERK, K.; ROUZEAU-SZYNALSKI, K.; BLAYO, L.; SULLYOK, M.; EHLING-SCHULZ, M. Temperature exerts control of *Bacillus cereus* emetic toxin production on posttranscriptional levels. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1640. 2016.

KUMARI, S.; AND SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p.20–29. 2016.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v.82, p. 91-100. 2017.

LEITE, J. A. S. **Impacto do processo térmico assistido por micro-ondas sobre a funcionalidade do leite humano**. 126 f. Universidade de São Paulo, 2018.

LEWIS, M.J. **Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk**, *In* SMIT, G. Editor. Dairy Processing, Elsevier, p. 81-103. 2003.

LEWIS, M.J.; JUN, S.; **Thermal Processing**, *In* BRENNAN, J.G.; GRANDISON, A.S. Editors: *Food Processing Handbook*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 31-75. 2011.

LIN, C. C.; and C. F. L.I. Microwave sterilization of oranges in glass-pack. **J. Microwave Power**, v.6. p. 45–47.1971.

LINARES-MORALES, J.R.; PRADO-BARRAGÁN, A.; NEVÁREZ-MOORILLÓN G.V. Training **In Food Safety Practices and Food Manufacturing for Safe Food Production**, *In* NEVÁREZ-MOORILLÓN G.V.; PRADO-BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ J.L. *et al.*, editors: Food Microbiology. 2020.

LING B, TANG J, KONG F, *et al.*: Kinetics of Food Quality Changes During Thermal Processing: a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v.8, p. 343-358.2015.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A. Selected indicators of the quality of thermal processed milk. **Food Science and Technology International**, v. 5, p. 121-137. 1999.

LUND, T.; DE BUYSER, M.L.; GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Mol. Microbiol**, v.38 (2), p. 254–261. 2000.

LUND, T.; GRANUM, P.E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiol. Lett**, v.141 (2–3), p.151–156. 1996.

MACHADO, S.G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S. *et al.*: The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage **In Processed Bovine Milk and Dairy Products**. v. 8, p.1-22. 2017.

MAHLER, H, PASI A.; KRAMER, J. A.; SCHULTE, P.; SCOGING, A. C.; BAR, W. AND KRAHENBUHL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, v.336, p. 1142–1148. 1997.

MARROLLO, R.; Microbiology of *Bacillus cereus* In VICENZO, S. **The Diverse Faces of *Bacillus cereus***. Pescara. Editors: Academic Press, p. 1-13. 2016.

MARSTON, C.K.; IBRAHIM, H.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; GUMKE, M.; STANEK, D.; GEE, J.E.; BOYER, A.E.; GALLEGOS-CANDELA, M.; BARR, J.R.; LI, H.; BOULAY, D.; CRONIN, L.; QUINN, C.P.; HOFFMASTER, A.R. Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthraxlike eschar. **Plos ONE**, v.11, n.6. 2016.

MAZAS, M.; MARTOINEZ, S.; LOOPEZ, M.; ALVAREZ, A. B.; MARTIN, R. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.61–67. 1999.

MCKILLIP, J.L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.*, a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.77, n.4, p.393-399, 2000.

MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F.W.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic *Bacillus spp* in fluid milk products: a review. **J Food Prot**, v. 54. p. 969-79.1991.

METHA, R.S. Milk Processed at Ultra-High-Temperatures – A Review<sup>1</sup>. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 212-225. 1980.

MILANI, E.A.; SILVA, FVM. Ultrasound assisted thermal pasteurization of beers with different alcohol levels: inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* spores. **J Food Eng**, v. 198, p.45–53. 2017.

MOIR, A. How do spores germinate? **J. Appl. Microbiol**, v. 101, p. 526 e 530. 2006.

- MOLIN, G.; B. G. SNYGG. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. **Appl. Microbiol**, v.15. p.1422–1426.1967.
- MONTANHINI, M. T. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Occurrence of *Bacillus cereus* in Milks Traded in Paraná, Santa Catarina and São Paulo States. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14.3, p.155-8.2012.
- MOUSSA-BOUDJEMAA, B.J.; GONZALEZ, J.; AND LOPEZ, M. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores in carrot extract acidified with diferente acidulants. **Food Control**, v.17, p. 819–824.2006.
- MUNFORDA, A. R. G.; ALVARENGA, V. O.; SILVA, L. D.; CRUCELLO, A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; CHAVES, R. D.; OTEIZA, J. M.; SANT'ANA, A. S. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. **Food Control**, p. 126-136. 2017.
- MÜLLER, W.A.; FERREIRA MARCZAK, L.D. AND SARKIS, J.R. Microbial inactivation by ohmic heating: Literature review and influence of different process variables, Trends in **Food Science and Technology**, v. 99, p. 650-659. 2020.
- NAJDOVSKI, L.; DRAGES, A. Z.; KOTNIK, V. The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. **J. Hosp. Infect**, v.19. p. 239 –247. 991.
- NEPPIRAS, E.A. Acoustic cavitation. **Phys Rep Rev Sect Phys Lett**, v. 61(3), p. 159–251. 1980.
- OH, M.-H.; HAM, J.-S.; COX, J.M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, n.1-2, p.1-8, 2012.
- OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). Preparação, manipulação e conservação de fórmulas desidratadas para lactentes - Manual de boas práticas. [S.l: s.n.], 2007. Disponível em: <www.insa.pt>.
- PARKER, F. S. Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry (Plenum Press, New York, 1983), pp. 315–347. 1983.

PFEIFER, J. R.; KESSLER, H. G. Effect of relative of hot air on the resistance of *Bacillus cereus* spores. **J. Appl. Bacteriol**, v.77. p.121–128.1994.

POLTRONIERI, P.; ROSSI, F. Stabilization of milk quality by heat treatments, *In* POLTRONIERI, P. Editor. Microbiology *In* **dairy processing: challenges and opportunities**. John Wiley & Sons, Inc., p. 63-70. 2018.

POMERANZ, Y.; Ed., Wheat: Chemistry and Technology (American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, vol. 1, 3rd ed., pp. 277–296.1988.

QUINTO, E.J.; MARÍN, J.M.; CARO, I. *et al.* Modelling Growth and Decline in a Two-Species Model System: Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and Psychrotrophic Spoilage Bacteria in Milk, **Foods**, v. 9, p. 331-331. 2020.

RAMEZANZADAH, F. M.; RAO, R. M.; WINDHAUSER, M.; PRINYAWIWATKUL, W.; TULLEY, R.; MARSHALL, W. E. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran during storage. **J. Agric. Food Chem**, v.47, v.3050– 3052. 1999.

RAO, M.A.; Rheology of Fluid and Semisolid Foods. **Springer US**.2007.

REES, D. A.; Polysaccharide Shapes (John Wiley and Sons, New York, 1977).

REYES, J. E.; BASTÍAS, J. M.; *et al.* Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 1–6, 2007.

REZENDE-LAGO N.C.M.; ROSSI JUNIOR O.D.; VIDAL-MARTINS A.M.C.; AMARAL L.A. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v.59(6). p.1563-9. 2007.

RISZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival Strategies if Bacteria in the Natural Environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 365-379. 1987.

ROSEN, C. G. Effects of microwaves on food and related materials. **Food Technol.** 26.36–55.1972.

SADAT, A.; EZZATPANAH, H. AND BAKHODA, H. Rheological properties of instant milk-based puddings prepared with emulsifying salt-containing milk powders. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 791–800. 2018.

SAMAPUNDO, S., HEYNDRICKX, M., XHAFERI, R., & DEVLIEGHERE, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 34–41. 2011.

SANCHEZ-SALAS, J.L.; SETLOW, B.; ZHANG, P.; LI, Y.Q.; SETLOW, P. Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, p. 6746–6754. 2011.

SASAKI, K.; HONDA, W.; MIYAKI, Y. Evaluation of hightemperature and short-time sterilization of injection ampoules by microwave heating. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 52, p.5–12.1998.

SCHAEFER, G.; CAMPBELL, W.; JENKS, J.; BEESLEY, C.; KATSIVAS, T.; HOFFMASTER, A.; MEHTA, S.R.; REED, S. Persistent *Bacillus cereus* bacteremia in 3 persons who inject drugs, San Diego, California, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.9, p.1621, 2016.

SCHERBA, G.; WEIGEL, R.M.; OBRIEN, W.D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Appl Environ Microbiol**, v. 57(7), p. 2079–2084. 1991.

SENHAJI, A. F. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria, II. **J. Food Technol**, v. 12, p.217–230. 1977.

SENHAJI, A. F.; LONCIN, M. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria, I. **J. Food Technol**, v.12, p. 203–216.1977.

SENIOR, A., MOIR, A. The *Bacillus cereus* GerN and GerT protein homologs have distinct roles in spore germination and outgrowth, respectively. **J. Bacteriol**, v. 190, p. 6148 e 6152. 2008.

SENNA, P.M.; DA SILVA, W.J.; DEL BEL CURY, A.A. Denture disinfection by microwave energy: influence of *Candida albicans* biofilm. **Gerodontology**, v. 29, p. e186-e191. 2010.

SERTH, R.W.; LESTINA, T.G. Boiling Heat Transfer, *In* SERTH R.W., AND LESTINA T.G., editors: Process Heat Transfer. **Elsevier**, p. 317-360. 2014.

SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. **J. Bacteriol**, v.196, p. 1297–1305. 2014.

SETLOW, P. Spore germination. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 6, p. 550 e 556. 2003.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to radiation, heat and chemicals. **J. Appl. Microbiol**, v. 101, p. 514 e 525. 2006.

SIEBER, R.; EBERHARD, P.; & GALLMANN, P. U. Heat treatment of milk in domestic microwave ovens. **International Dairy Journal**, v. 6.p. 213–246. 1996.

SILVA, L.C.C. *et al.* **Tracking sources of microbiologic contamination of raw Milk during milking process in dairy farms from Agreste of Pernambuco.** Semina: Ciências Agrárias. v.32. n.1. p.267-276. 2011.

SINGHAL, P.; KAUSHIK, G.; HUSSAIN, C.M. *et al.*: **Food Safety Issues Associated With Milk: A Review**, *In* GRUMEZESCU A.M.; HOLBAN A.M. Editors: Safety Issues in Beverage Production, Elsevier, p. 399-427. 2020.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSSON, M.A.; Christiansson, A.; Salkinoja-Salonen, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiol**, v.27, p. 347–355. 2010.

SHIRTZ, J. **Steam Sterilization-in-Place Technology and Validation**, In AGALLOCO J.P., AND CARLETON F.J., editors: Validation of Pharmaceutical Processes, Third Edition. CRC Press, p. 201-221. 2007.

SINGH, R.P.; BORNHORST, G. HEATING AND COOLING Processes for Foods, In Heldman D.R., LUND B., AND SABLIOV C., editors: Handbook of Food Engineering, **CRC Press**, p. 567-636. 2018.

SMELT, J.P.P.M.; BRUL, S. Thermal inactivation of microorganisms. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 1371-1385. 2014.

SUSLICK, K.S. Sonochemistry. **Science**, v. 247(4949), p. 1439–1445. 1990.

SWAIN, M. and JAMES S. The microwave processing of foods. Chapter 12. Factors that affect heating performance and development of heating/cooking in domestic and commercial microwave ovens. (p. 221–241) Woodhead Publishing in **Food Science and Technology**. Part III. Measurement and process control. 2010.

SWIECICKA, I.; BARTOSZEWICZ, M.; KASULYTE-CREASEY, D.; DREWNOWSKA, J.M.; MURAWSKA, E.; YERNAZAROVA, A.; LUKASZUK, E.; MAHILLON, J. Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 85, p. 262-272. 2013.

TOLA, Y.B.; RAMASWAMY, H.S. **Thermal Processing Principles**, In SIMPSON B.K., editor. Food Biochemistry and Food Processing, Wiley-Blackwell, p. 725-745. 2012.

TUSGUL, S.; PROD'HOM, G.; SENN, L.; MEULI, R.; BOCHUD, P.-Y.; GIULIERI, B.S.G. *Bacillus cereus* bacteraemia: A comparison between haematological and non-haematological patients. **New Microbes and New Infections**, v.15, p.65-71, 2017.

- VALSECHI, O.A.; HORII, J.; DE ANGELIS, D. The effect of microwaves on microorganisms. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 71(3). p. 399-404. 2004.
- VAN ASSELT, E.D.; ZWIETERING, M.H. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 73-82. 2006.
- VEGA-MERCADO, H.; MARTÍN-BELLOSO, O.; QIN, B.; CHANG, F. J.; GÓNGORA-NIETO, M. M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., *et al.* Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 151 e 157. 1997.
- VEPACHEDU, V.R., SETLOW, P. Role of SpoVA proteins in Release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. **J. Bacteriol**, v. 189, p. 1565 e 1572. 2007.
- VERMA, D.K.; MAHANTI, N.K.; THAKUR, M. *et al.* Microwave Heating: Alternative Thermal Process Technology for Food Application, *In* SRIVASTAV P.P., VERMA D.K., PATEL A.R., *et al.*, editors: **Emerging Thermal and Nonthermal Technologies in Food Processing**, Apple Academic Press, p. 25-67. 2020.
- VIDAL, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; ABREU, I. L.; BÜRGER, K.P.; VEDOVELLI, M.; 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.
- VIDAL-MARTINS, A.A.; ROSSI JUNIOR O.D.; REZENDE-LAGO N.C.; *Mesophilic heterotrophic* microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra high temperature milk. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v. 57(3). p. 396-400. 2005.
- VIDIC, J.; CHAIX, C.; MANZANO, M.; *et al.* Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. **Biosensors**, v. 10, p. 15-15. 2020.

VOLLMER, W.; JORIS, B.; CHARLIER, P.; FOSTER, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, p. 259 e 286. 2008.

WALKLING-RIBEIRO, M.; NOCI, F., CRONIN, D. A.; LYNG, J. G.; MORGAN, D. J. Shelflife and sensory attributes of a fruit smoothie-type beverage processed with moderate heat and pulsed electric fields. **LWT e Food Science and Technology International**, v. 43, p. 1067 e 1073. 2010.

WARDA, A.K.; DEN BESTEN, H.M.W.; SHA, N.; ABEE, T.; GROOT, M.N.N. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 201, p. 27-34, 2015.

WAYLAND, J. R.; BRANNEN, J. P.; and MORRIS, M. E. On the interdependence of thermal and electromagnetic effects in the response of *Bacillus subtilis* spores to microwave exposure. **Radiat. Res.**, v. 71. p.251–258. 1977.

WELT, B. A.; TONG, C. H.; ROSSEN, J. L.; LUND, D. B. Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p. 482-488.1994.

WEŚSIERSKA, E.; TRZISKA, T. Evaluation of the use of pulsed electrical field asa factor with antimicrobial activity. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1320 e 1325. 2007.

WONG, H.C.; CHANG, M.H.; FAN J.Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **App. Environ. Microbiol.**, v.54, p.699-702. 1988.

WOO, I.; RHEE, I.; PARK, H.; Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p. 2243-2247. 2000.

WOOD, R.J.; LEE, J.; BUSSEMAKER, M.J. A parametric review of sonochemistry: control and augmentation of sonochemical activity in aqueous solutions. **Ultrason Sonochem.**, v. 38, p. 351–370. 2017.

YILDIZ, E.; OZCAN, T. Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.72, p. 199–207.2019.

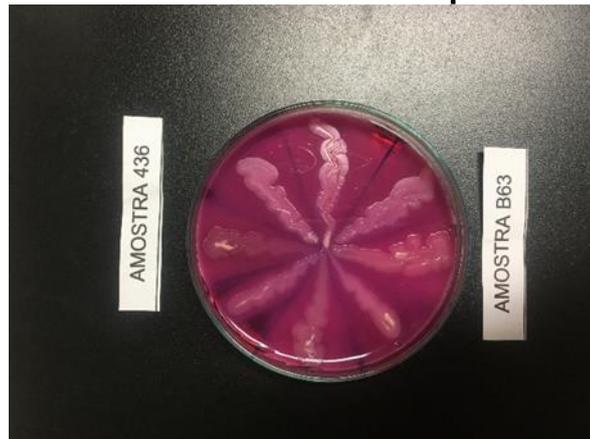
ZHOU, G.; LIU, H.; HE, J.; YUAN, Y.; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycooides* in Chinese pasteurized full fat milk. **Int J Food Microbiol**, v.121(2), p.195-200. 2008.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A - Colônias típicas de *Bacillus cereus***



**APÊNDICE B - Teste no MYP cepa 436 e B63**



**APÊNDICE C - Teste no MYP cepa B3 e B18**



**APÊNDICE D - Teste no MYP cepa B51 e B94****APÊNDICE E - Teste no MYP cepa B3 e B18****APÊNDICE F - Teste no MYP cepa B86**