

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

***BACILLUS CEREUS*: ISOLAMENTO, CONTAGEM E DETECÇÃO DE  
GENES PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS ATRAVÉS DE PCR EM  
AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO COMERCIALIZADO NA  
CIDADE DO RIO DE JANEIRO.**

**Cyllene de Matos Ornelas da Cunha Corrêa de Souza**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

***BACILLUS CEREUS*: ISOLAMENTO, CONTAGEM E DETECÇÃO DE  
GENES PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS ATRAVÉS DE PCR EM  
AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO COMERCIALIZADO NA  
CIDADE DO RIO DE JANEIRO.**

**CYLLENE DE MATOS ORNELAS DA CUNHA CORRÊA DE SOUZA**

*Sob a Orientação da Professora:*

**Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
2011

633.730981  
53  
S729b  
T

Souza, Cyllene de Matos Ornelas da  
Cunha Corrêa de, 1977-  
Bacillus cereus: isolamento,  
contagem e detecção de genes  
produtores de enterotoxinas através  
de PCR em amostras de café torrado e  
moído comercializado na cidade do  
Rio de Janeiro / Cyllene de Matos  
Ornelas da Cunha Corrêa de Souza -  
2011.  
105 f.: il.

Orientador: Shirley de Mello  
Pereira Abrantes.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia de Alimentos.  
Bibliografia: f. 53-69.

1. Café - Rio de Janeiro (RJ) -  
Teses. 2. Bacillus cereus - Teses.  
3. Enterotoxinas - Teses. 4.  
Alimentos - Microbiologia - Teses.  
I. Abrantes, Shirley de Mello  
Pereira, 1953-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia de Alimentos. III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**CYLLENE DE MATOS ORNELAS DA CUNHA CORRÊA DE SOUZA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

TESE APROVADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Dr<sup>a</sup>. Shirley de Mello Pereira Abrantes

(Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Reis Amendoeira. Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

---

Dr<sup>a</sup>. Sidinea Cordeiro de Freitas. Embrapa Agroindústria de Alimentos

---

Dr<sup>a</sup>. Helena Pereira da Silva Zamith. INCQS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Helena Luchese. UFRRJ.

## DEDICATÓRIA

A Deus, Senhor e Salvador da minha vida.

Ao meu amado esposo (Enio), que sempre esteve ao meu lado me incentivando, fazendo com que eu não desistisse.

Aos meus amados pais e melhores amigos (Jorge e Janete) que me incentivam em todos os meus sonhos e planos. Vocês são os melhores pais do mundo.

À minha querida avó (*in memoriam*) Maria José de Matos que sempre torceu por mim, para que hoje eu pudesse ter mais este título na minha vida acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus** em primeiro lugar. A Ele toda a honra e toda glória. Ele tem me sustentando e me guiado por toda a minha vida. Sem Ele eu nada seria sem Ele jamais chegaria até aqui.

**Ao meu amado esposo e companheiro** Enio Corrêa de Souza por toda a dedicação e apoio durante esta jornada. Obrigada, te amo muito.

**A minha amada família** meus pais: Francisco Jorge Ornelas da Cunha e Janete de Matos Ornelas da Cunha pelo grande amor, carinho, zelo, e pelos valores a mim passados. Muito obrigada por tudo o que vocês têm feito por mim até o dia de hoje e por tudo que ainda continuarão fazendo. Vocês são minha referência, meu alicerce depois de Deus.

**Ao meu irmão Maurício, minha cunhada Edilene e meus sobrinhos Paulo Maurício e Mateus** por entenderem meus momentos de ausência.

**A minha amiga Orientadora Professora Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes** agradeço pela orientação e, sobretudo pelo incentivo, disponibilidade e amizade demonstrada. Estou certa que você não é apenas uma orientadora, você é como uma mãe que cuida, disciplina e que torce pelo sucesso de seus orientandos. Deus te abençoe hoje e sempre.

**Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da UFRRJ** pela oportunidade que me deram, ao permitir que eu pudesse fazer parte deste programa, jamais vou esquecer tal atitude de ética e carinho.

**A Profa.Dra** Arlene Gaspar pela confiança em mim depositada ao permitir meu ingresso a esta instituição de ensino. Muito Obrigada.

## RESUMO

SOUZA, Cyllene Matos Ornelas Cunha Corrêa. ***Bacillus cereus*: Isolamento, Contagem e Detecção de enterotoxinas por PCR em amostras de café torrado e moído comercializado na cidade do Rio de Janeiro**. 128f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O café é uma das bebidas mais consumidas e apreciadas no mundo. O grão de café é obtido da fruta da planta, um arbusto pequeno, pertencente ao gênero *Coffea*. Duas espécies têm importância comercial: *Coffea arabica* e *Coffea canephora robusta*; conhecidas como *arabica* e *robusta*. Cerca de dois terços da espécie *Coffea arabica* cresce principalmente na América do Sul, América Central e Leste da África (origem deste café). A incidência de microrganismos tem sido um dos principais fatores envolvidos na qualidade do café, principalmente na modalidade de colheita e preparo adotada no Brasil, isto é, a colheita baseada na mistura de frutos derriçados no chão com os derriçados no pano. A bactéria *Bacillus cereus*, que utiliza frequentemente o solo e o meio ambiente como reservatório pode ser adicionado a esta lista de microrganismos. No presente estudo, avaliou-se a contaminação de *B. cereus* em amostras de café torrado e moído comercializado na cidade do Rio de Janeiro, através de análises microbiológicas e análise do perfil toxigênico das cepas isoladas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), considerando-se os complexos HBL e NHE. Os resultados revelaram elevada frequência desses genes de enterotoxinas nas cepas isoladas, que foram: HBL A (57%); HBL C (71%); HBL D (64%); NHE A (50 %); NHE B (100%); NHE C (64%). Cepas de *B. thuringiensis* foram encontradas em 44% das amostras analisadas.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most appreciated drinks in the world. Coffee grounds are obtained from the fruit of a small plant that belongs to the genus *Coffea*. *Coffea arabica* and *Coffea canephora robusta* are the two species of highest commercial importance. They are more commonly known as arabica and robusta, respectively. Two-thirds of *Coffea arabica* plants are grown in South and Central America and Eastern Africa (the place of origin for this coffee species). Contamination with microorganisms has been a major factor affecting coffee quality, due to the method of harvest adopted in Brazil. Brazilian harvests are based on mixing fruits collected from the ground with those that fall on cloths. As the *Bacillus cereus* bacterium frequently uses soil as an environmental reservoir, it is easily capable of becoming a contaminant. In the current study, microbiological analysis and polymerase chain reaction (PCR) analysis of the toxicogenic profile of isolated strains were used to evaluate *B. cereus* contamination in commercial samples of ground and roasted coffee in the city of Rio de Janeiro. The results revealed a significant frequency of these enterotoxin genes in isolated strains, which were: The HBL (57%); HBL C (71%); HBL D (64%); The NHE (50%); NHE B (100%) ; NHE C (64%). Strains of *B.thuringiensis* were also found in 44% of the samples.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> – Broca-de-café ( <i>Hypothenemus hampei</i> )	<b>3</b>
<b>FIGURA 2</b> – Formiga inteira	<b>4</b>
<b>FIGURA 3</b> - Pedacos macroscópicos de vidro	<b>4</b>
<b>FIGURA 4</b> – Seqüência de processamentos do café	<b>9</b>
<b>FIGURA 5</b> - Microscopia de contraste de fase de <i>B. cereus</i> evidenciando os esporos	<b>16</b>
<b>FIGURA 6</b> - Reação de hemólise da enterotoxinas HBL	<b>24</b>
<b>FIGURA 7</b> - Esquema das Toxinas produzidas por <i>B.cereus</i> e seus respectivos genes	<b>25</b>
<b>FIGURA 8</b> - Morfologia do <i>B. thuringiensis</i>	<b>39</b>
<b>FIGURA 9</b> - Resultados representativos da PCR para as cepas isoladas de <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. cereus</i> .	<b>46</b>
<b>FIGURA 10:</b> Porcentagem de genes de HBL e NHE isolados de <i>B.cereus</i> em amostras de café torrado e moído	<b>47</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELAS</b>	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> - Incidência de <i>B.cereus</i> em alimentos	<b>15</b>
<b>TABELA 2</b> - Características dos dois tipos de doenças causadas por <i>B. cereus</i>	<b>21</b>
<b>TABELA 3</b> – Seqüências dos iniciadores das enterotoxinas utilizados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	<b>38</b>
<b>TABELA 4</b> – <i>Bacillus thuringiensis</i> isolados das distintas marcas de café torrado e moído	<b>40</b>
<b>TABELA 5</b> – Resultados das provas bioquímicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> isoladas das distintas marcas de café torrado e moído	<b>41</b>
Contagem e Isolamento das Linhagens de <i>Bacillus cereus</i> do Número de Células Viáveis por mg de Amostra de café torrado e moído	
<b>TABELA 6</b> – Contagem e Isolamento das Linhagens de <i>Bacillus cereus</i> do Número de Células Viáveis por mg de Amostra de café torrado e moído	<b>42</b>
<b>TABELA 7</b> – Resultados das provas bioquímicas de <i>Bacillus cereus</i> isolados das distintas marcas de café torrado e moído	<b>43</b>
<b>TABELA 8</b> - Análise da Presença de Genes das Enterotoxinas Através da Reação em Cadeia da Polimerase nas amostras de café torrado e moído	<b>45</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABIC** – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ

**ACE** - PRODUÇÃO DE ACETIL METIL CARBINOL

**ANA** - CRESCIMENTO ANAERÓBICO

**ANVISA** – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

**ANI** - HIDRÓLISE DO AMIDO

**APHA** - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION

**ARA** - FERMENTAÇÃO DA ARABINOSE

*B.cereus* – *Bacillus cereus*

**BHI** - BRAIN HEART INFUSION

**CAT** - PRODUÇÃO DE CATALASE

**CIT** - UTILIZAÇÃO DO CITRATO

**Cyt K** - CITOTOXINA K

**(DD)** - DIFERENCIAL DISPLAY

**DNA** - ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

**DNTPs** - PRIMERS OLIGONUCLEOTÍDEOS, DESOXINUCLEOTÍDEOS

**DPA** - ácido 2,6-piridinodicarboxílico

**E** – ELÍPTICO

**ELISA** - ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

**EMBRAPA** – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

**ETA** - ENFERMIDADES TRANSMISSÍVEIS POR ALIMENTOS

**FAO** - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION

**FIOCRUZ** – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**IOC** – INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**HBL** - ENTEROTOXINA HEMOLÍTICA BL

**LRIL** - LIGATED RABBIT ILEAL LOOP

**MAN** - FERMENTAÇÃO DO MANITOL

**MOB** – MOBILIDADE

**NaCl** – CLORETO DE SÓDIO

**NHE** - ENTEROTOXINA NÃO HEMOLÍTICA

**OMS** – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

**PM** – PESO MOLECULAR

**PCR** - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

**RNA** - ÁCIDO RIBONUCLEICO

**RDC** – RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA

**ST** – SUBTERMINAL

**TIR** - HIDRÓLISE DA TIROSINA

**UAT** – ULTRA-ALTA TEMPERATURA

**UFC** – UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADRO	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS	3
2.1- OBJETIVO GERAL	3
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1- HISTÓRICO	4
3.2 - A COLHEITA DE CAFÉ	4
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO <i>B.cereus sensu strictu</i>	10
3.4 EPIDEMIOLOGIA DO <i>B.cereus</i> E SUA INCIDÊNCIA EM ALIMENTOS	11
3.5 PROPRIEDADES DOS ESPOROS DE <i>B. cereus</i>	15
3.6 <i>B.cereus</i> E A LEGISLAÇÃO EM VIGOR	17
3.7 PATOLOGIA DO <i>B.cereus</i>	18
3.7.1 SÍNDROME EMÉTICA	18
3.7.2 SINDROME DIARRÉICA	19
3.7.3 ENTEROTOXINAS DE <i>Bacillus cereus</i>	22
3.7.4– ENTEROTOXINA HEMOLÍTICA BL (HBL)	22

3.7.5 - ENTEROTOXINA NÃO HEMOLÍTICA (NHE)	24
3.7.6 – MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENTEROTOXINAS	25
3.7.7 – A TÉCNICA DE PCR – DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS	26
3.7.8 - O <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
4 – CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DO <i>B.cereus</i> E <i>B. thuringiensis</i> .	30
5- MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 – AMOSTRAGEM	31
5.2 – METODOLOGIA	31
5.2.1 – ISOLAMENTO, CONFIRMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Bacillus cereus</i> DIRETAMENTE EM AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO	31
5.2.2- EVIDÊNCIAÇÃO DO ESPORO E CORPO PARAESPORAL	32
5.2.3 -- CRESCIMENTO E LISE CELULAR PARA ANÁLISE DE ISOENZIMAS	32
5.2.4 - TÉCNICA DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	33
5.2.5 - REVELAÇÃO DAS ISOENZIMAS	33
5.2.6 - ANÁLISE NUMÉRICA	34
5.2.7 – ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA (HBL).	34
5.2.8 – PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS DIARRÉICAS DE CÉLULAS BACTERIANAS	34
5.2.9 – DETECÇÃO DA PRESENÇA DA TOXINA HEMOLÍTICA – HBL C (L <sub>2</sub> )	34
5.2.10 – PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)	36
5.2.11 – DETECÇÃO DOS GENES DE <i>B. cereus</i> CODIFICADORES DAS ENTEROTOXINAS ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	37

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1- ISOLAMENTO, CONFIRMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Bacillus cereus</i> EM AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO	39
6.2 – PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS	45
7 – CONCLUSÕES	52
8 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9- ANEXO: ARTIGO PUBLICADO PELA SBCTA	70

## 1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil tem se mostrado o maior produtor e exportador mundial de café em grãos. Todavia, o aumento da produção e a melhoria dos cafés provenientes de outros países produtores, associado à crescente demanda por cafés especiais de bebida superior pelos países importadores, têm levado a exportação brasileira a sofrer quedas. Tal situação fez surgir a necessidade de busca pelo conhecimento de técnicas de produção de cafés de melhor qualidade (CARVALHO *et al*,1997).

Souza *et al* (2003) observaram em análises no café torrado e moído comercializado na cidade do Rio de Janeiro a presença de fragmentos de insetos pertencentes a praga do café conhecida como broca-de-café (*Hypothenemus hampei*) em 87% das amostras analisadas, uma formiga inteira em uma amostra, pedaços macroscópicos de vidro, devidamente analisados seguindo testes de cinzas insolúveis para confirmação. Além disso, foi observada a ocorrência de milho, no que se refere à presença de elementos histológicos estranhos, tratando-se, portanto, de fraude. Todas estas amostras estavam em conformidade com a atual legislação brasileira do café torrado e moído – a Portaria 377 de 26 de abril de 1999, no que se refere a insetos e vidros, pois a mesma não estabelece limites para insetos e seus fragmentos, vidros, sendo insatisfatórias apenas pela presença do milho.

Em trabalhos posteriores, os autores supracitados investigaram a possibilidade destes fragmentos de insetos serem veiculadores de algum microorganismo patogênico. As amostras foram novamente coletadas e analisadas segundo padrão microbiológico para detecção de *B.cereus*, bactéria que tem como habitat o solo e água. Souza *et al* (2005) confirmaram a presença da bactéria *B.cereus* em 85% das amostras analisadas; o microorganismo foi encontrado justamente nas amostras que continham fragmentos de insetos.

Em virtude deste fato, fez-se necessário a detecção do potencial enterotoxigênico das toxinas do *B.cereus* nas amostras de café torrado e moído, para desta forma avaliar o risco que estas podem causar a saúde do consumidor.

Este estudo tornou-se relevante, uma vez que estas enterotoxinas encontradas no produto de nosso estudo têm sido apontadas como as potenciais causadoras da doença diarréica associada ao microrganismo. Além disso, a maioria dos surtos alimentares está associada às enterotoxinas complexas HBL (enterotoxina hemolisina BL) e NHE (enterotoxina não-hemolítica).

A identificação das principais fontes de *B. cereus*, em estabelecimentos onde são processados os alimentos, pode contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia do microorganismo em café torrado e moído.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 – OBJETIVO GERAL:**

- Investigar em amostras de café torrado e moído comercializado no varejo da cidade do Rio de Janeiro, a presença de *B.cereus* visando uma melhor compreensão sobre os aspectos de sua epidemiologia.

### **2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Isolar, quantificar e caracterizar as cepas de *B.cereus* oriundas das amostras de café torrado e moído. Detectar entre as cepas de *B.cereus* isoladas de café torrado e moído características bioquímicas, fisiológicas e moleculares que permitam evidenciar o potencial enteropatogênico.

- Detectar a presença da espécie *B. cereus* e seu esporo, a fim de obter subsídios que permitam avaliar o risco potencial que esse produto alimentício pode apresentar para a saúde da população consumidora.

- Detectar a produção das enterotoxinas hemolítica e não-hemolítica – HBL e NHE de *B.cereus* prejudiciais à saúde humana.

- Obter subsídios para eventuais propostas de alterações nas legislações, tendo em vista que não há, nas mesmas, limite para *B.cereus* no café torrado e moído.

### **3 – REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1- HISTÓRICO**

O café torrado é o grão do fruto maduro de diversas espécies do gênero *Coffea*, principalmente de *Coffea arabica*, *Coffea liberica* e *Coffea robusta*, submetido a tratamento térmico adequado. A maioria dos cafés comercialmente disponíveis consiste de grãos pertencentes à variedade *arabica*, *robusta* ou mistura destas duas (ZAMBOLIM *et al*,1997).

A planta de café é originária da Etiópia, centro da África, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural, sendo a Arábia a responsável pela propagação da cultura do café. O nome café não é originário da Kaffa, local de origem da planta, e sim da palavra árabe *qahwa*, que significa vinho. Por esse motivo, o café era conhecido como "vinho da Arábia" quando chegou à Europa no século XIV (ABIC, 2008).

No Brasil, o café foi introduzido em 1727 por Francisco Mello Palheta. As primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém e, em seguida, no Maranhão. Naquela época, o café já possuía um grande valor comercial. Devido às condições climáticas do Brasil, o cultivo de café se espalhou rapidamente, com sua produção voltada para o mercado doméstico. Em sua trajetória pelo Brasil, o café percorreu os estados do Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira, onde o desenvolvimento se deu com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo, afinal, a primeira realização exclusivamente brasileira que visou à produção de riquezas (ABIC, 2008).

Dos processamentos dos grãos de café empregados atualmente, o mais simples envolve procedimentos como separação de semente, secagem dos grãos, torra e moagem dos grãos secos.

Para obtenção da garantia de qualidade do café torrado e moído, alguns cuidados são essenciais. Dentre eles, destaca-se a realização da colheita quando a maioria dos frutos estiver madura (frutos cereja). Colhendo-se muito cedo, haverá maior quantidade de grãos verdes que prejudicam a qualidade do café. Colhendo-se tarde, haverá maior quantidade de grãos que caem no chão (SANTOS, 1996). Os frutos caídos, por se apresentarem pretos e ardidados, darão um produto de qualidade inferior.

#### **3.2 – COLHEITA DO CAFÉ**

Na colheita, os frutos devem estar em seu ponto máximo de maturação, e também não devem entrar em contato com a terra, para evitar a contaminação com microrganismos. Após a colheita, os frutos devem passar por uma pré - limpeza, retirando-se as impurezas vindas do campo e realizando-se a lavagem, o mais rápido possível, com a

finalidade de retirar a poeira e separar aqueles frutos que estão com diferentes fases de maturação (EMBRAPA – CAFÉ, 2008).

A colheita sobre o pano, preferida em relação à colheita no chão, evita o contato dos frutos com o solo e a mistura dos frutos recém-colhidos com os frutos de varrição, na sua maioria já em fase de deterioração. Os frutos recém-colhidos devem ser levados imediatamente para o processamento, evitando a fermentação indesejada, fungos e a perda de qualidade (SALLUM, 1982).

No caso da colheita no chão, os processos devem ser feitos no mesmo dia da derriça, a colheita imediata dos grãos caídos no solo, para que os frutos não fiquem muito tempo em contato com o chão. Isso aumenta a incidência de grãos de qualidade inferior. Os grãos defeituosos ou brocados, ou seja, os grãos que foram perfurados por insetos, devem ser rejeitados, para, assim, evitar a presença de microorganismos no final do processo de produção (CARVALHO E CHALFOUN, 1985).

As contaminações microbianas são geralmente favorecidas pela falta de cuidado durante as operações agrícolas, que podem comprometer a qualidade do produto final, principalmente em situações em que ocorre a secagem desuniforme dos grãos, grãos colhidos do chão ou grãos que permanecem sob chuva durante a secagem.

Dentre os principais problemas fitossanitários da cultura do café, a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867) constitui-se na mais importante praga para os cafezais em determinadas regiões, já que pode atacar os frutos verdes, chumbinhos, maduros ou cerejas, e até mesmo secos e armazenados. A ação de fatores na pré-colheita, como a broca, provoca uma maturação forçada dos grãos e abre portas de entrada para microorganismos, ocasionando modificações químicas indesejáveis antes da colheita, com conseqüente queda dos frutos. Assim, tal queda deve ser controlada visando uma melhoria na qualidade do café (CHALFOUN E CARVALHO, 1989).

Mais do que as outras técnicas de colheita, a derriça no chão exige a limpeza do terreno antes da derrubada dos frutos. Caso contrário, tal técnica pode levar a incidência de microorganismos patogênicos. Assim sendo, a qualidade do café pode ser alterada por diversos fatores (SOUZA e CARVALHO, 1997)

Dentre estes fatores, a presença de microorganismos nas fases pré e pós-colheita têm importância fundamental no processo de degradação de componentes dos frutos. Bitancourt (2001) observou que há necessidade de uma ruptura ou injúria na película dos frutos para que os microorganismos possam entrar no grão de café.

Os frutos estão expostos a uma diversidade de microorganismos, tais como fungos e bactérias que, encontrando condições favoráveis, se desenvolvem nos grãos de café.

Estes microrganismos produzem suas próprias enzimas que agem sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente sobre os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool. Esse é desdobrado em ácido acético, láctico, propiônico e butírico e outros ácidos carboxílicos superiores. Ao se iniciar a produção de ácido butírico, começa a haver prejuízo na qualidade do café (SOUZA *et al*, 2003).

Quando a fermentação das sementes de café é prolongada, a infecção por microrganismos torna-se acentuada e começa o processo de produção de compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis. As injúrias na pré-colheita, tais como a infecção dos frutos ainda na planta por microrganismos e o ataque de insetos, ocasionam injúrias na planta e facilitam a infecção por microrganismos (AFONSO JÚNIOR, CORRÊA, GONELI e SILVA, 2004).

A importância da semente como meio de disseminação de patógenos, quando comparado com outros meios, tais como vento, água, solo, etc., está na dependência de vários fatores. Os patógenos nas sementes permanecem viáveis por mais tempo que nos propágulos vegetativos, prolongando-lhes o período potencial de transmissão. Além disso, a fonte de inóculo primário presente nas sementes favorece a infecção precoce das plântulas. Outro aspecto se refere ao fato de que as sementes podem hospedar grande variedade de microrganismos, tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides, que podem ser agentes causais de diversas doenças nas plantas (BARRIOS, 2001). Dentre tais agentes, os fungos constituem o mais importante grupo de patógenos transmitidos por sementes, sendo a fermentação um processo importante na produção do café (BOZZA *et al*, 2009).

A presença de bactérias na fermentação do café, principalmente, bactérias lácticas do gênero *Leuconostoc* *Lactobacillus* foi observada por Alves e Castro (1998). Analisando cafés cereja brasileiro, Vaughan *et al.* (1958) isolaram bactérias coliformes de semelhantes espécies do gênero *Aerobacter* e *Escherichia*, visto que o número destes microrganismos aumentou significativamente durante a fermentação de uma população inicial de 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> bactérias por grama para 10<sup>9</sup> bactérias por grama após 24 horas de fermentação. Espécies pectinolíticas do gênero *Bacillus* também foram isoladas durante a fermentação do café. Embora bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Streptococcus* tenham sido isoladas do café fermentado, não foi demonstrada a capacidade desses microorganismos para degradar enzimas pécicas (CHALFOUN e PARIZZI, 2008).

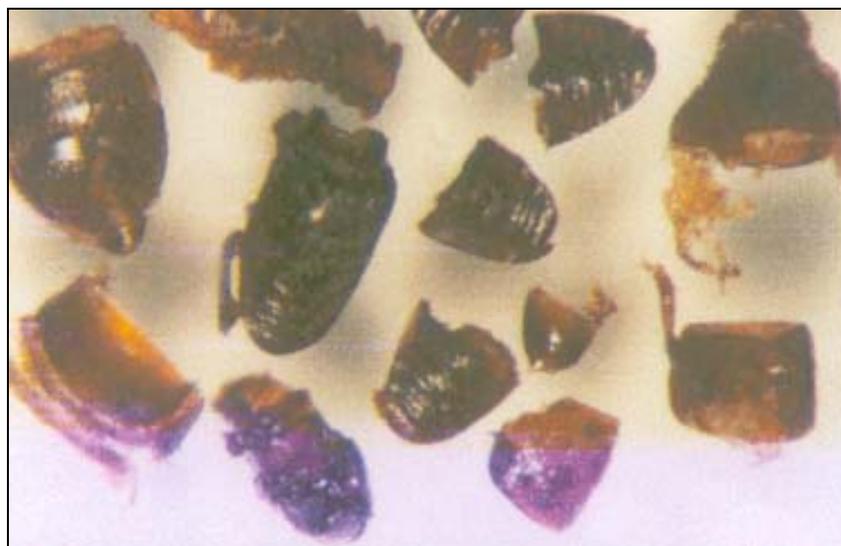
Em virtude dos métodos de colheita, o café é constituído de uma mistura de frutos verdes, maduros e secos, juntos ainda com folhas, ramos e outras sujeiras advindas da plantação. O café deve ser limpo e separado para que possa ser secado adequadamente. Nesta etapa, inicia-se o preparo ou pré-processamento do café. O pré-processamento do café pode

ser executado por via seca (café seco de terreiro) ou via úmida (cafés descascados e despulpados). A figura 1 mostra o esquema de pré-processamento do café, desde a colheita até a classificação e comercialização (CARVALHO, CHAGAS e SOUZA 2005)

Trabalhando com cafés processados por via seca nos quatro estágios de maturação, Silva (2000) verificou que dos 254 isolados bacterianos em estudo, 113 foram Gram-negativos (44,5%) com maior incidência de *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, 23 Gram-positivos esporulados (9%) e 118 Gram-positivos não esporulantes (46,5%).

A qualidade da bebida é influenciada diretamente pelos graus de torra ao quais os grãos são submetidos. Em temperatura alta, acima de 110 °C (zona de torração) é alcançada a formação total do aroma; temperaturas muito altas provocam a perda de aromas e gostos. Quanto mais alta a temperatura final da torrefação, menos desejável será o aroma e mais forte o amargor (ILLY e VIANI, 1995).

Souza; Abrantes e Cavados (2003) analisando cafés torrados e moídos comercializados na cidade do Rio de Janeiro encontraram fragmentos de insetos referentes a praga do café, (*Hypothenemus hampei*) (figura 1), uma formiga inteira (figura 2), pedaços macroscópicos de vidro (figura 3) em 87% das amostras analisadas. Não existem, na literatura brasileira, casos de intoxicações alimentares por *B.cereus* envolvendo o consume da bebida de café, mesmo porque a legislação brasileira não estabelece limites para presença deste microorganismo.



**Figura 1:** Broca-de-café (*Hypothenemus hampei*)



**Figura 2:** Formiga inteira



**Figura 3:** Pedacos macroscópicos de vidro

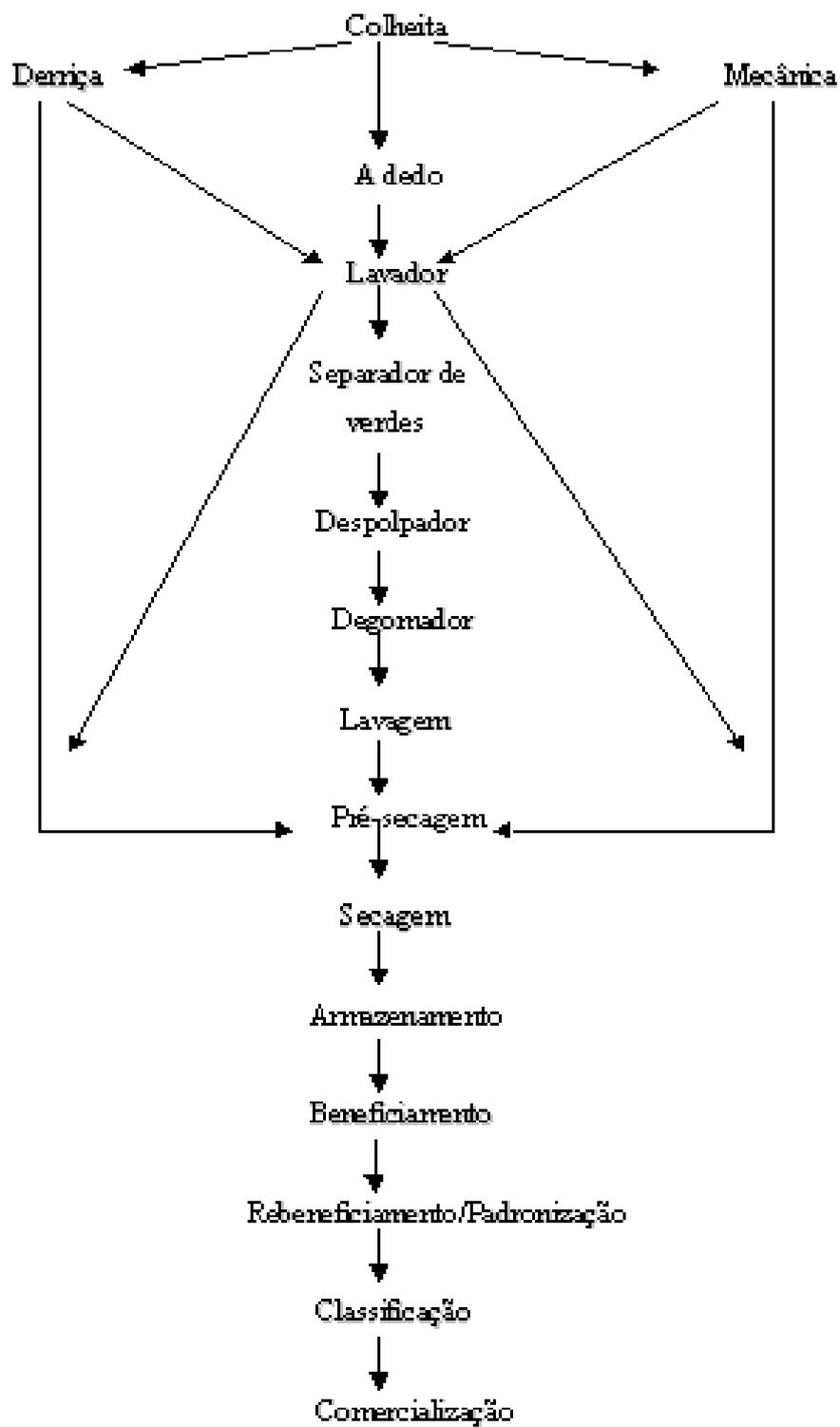


Figura 4. Seqüência de processamentos do café [RESENDE *et al.*; 1997].

### 3.3 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *B.cereus sensu strictu*

O *B.cereus* tipo *sensu strictu* compreende *B.cereus*, e o *B.cereus sensu lato* compreende todos os outros, dentre eles: *B.thuringiensis*, *B.anthraxis*, *B. mycoides*. A incidência de microrganismos tem sido um dos principais fatores envolvidos na qualidade do café, principalmente na modalidade de colheita e preparo adotada no Brasil, isto é, a colheita baseada na mistura de frutos derriçados no chão com os derriçados no pano. A bactéria *Bacillus cereus*, que utiliza freqüentemente o solo e o ambiente como reservatório pode ser adicionado a esta lista de microrganismos.

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, facultativamente anaeróbia, que produz esporos e, que pode produzir também pelo menos dois tipos de toxinas que são importantes na sintomatologia de doenças de transmissão alimentar – a diarréica (termo-lábil) e a emética (termo-estável). Seus surtos atingem uma ampla variedade de alimentos, tais como carnes, leite e derivados, vegetais e peixes, além de poder ser encontrada também, em baixos níveis, em alimentos crus (como frutas e hortaliças) (RABINOVITCH *et al*, 1985), secos ou processados (VARNAM, 1991).

As linhagens do *B.cereus* são constituídas de bastonetes de Gram positivos a Gram variáveis com extremidade arredondada, geralmente móveis, graças a um conjunto de flagelos peritríquios; possuem comprimento superior a 3 µm e um diâmetro médio de 1,4 µm; apresentam-se grupados em cadeias; formam esporos subterminais, ovais (algumas vezes cilíndricos) que não deformam a parede celular e são catalase positivos (GRANUM e LUND 1997).

As cepas de *B.cereus* são capazes de utilizar vários carboidratos; glicose, frutose, trealose, sacarose, salicina, maltose, manose, *m*-inositol e lactose. São capazes de hidrolizar amido, caseína e gelatina. São catalase positivos e oxidase variável. Todas as cepas são produtoras de hemolisinas, sendo conhecidas pelo menos duas: cereolisina (termoestável) e hemolisina termolábil. São também produtores de fosfolipases do tipo C (BORGE *et al*, 2001).

A bactéria *B.cereus* multiplica-se bem entre 10°C e 48°C, apresentando um ótimo de temperatura entre 28°C e 35°C. A faixa de pH em que ocorre a multiplicação varia de 4,9 a 9,3 (BENEDICT *et al*, 1993). Uma das principais preocupações dos produtores de café é manter um nível ideal de pH no solo, que determina a presença de hidrogênio e alumínio. Essas duas substâncias são tóxicas para a planta. Para o café verde, a faixa ideal está entre 5,73 a 5,88 e para o café maduro, o comercializado está entre 5,31 a 5,61 (CARVALHO e CHAGAS e SOUZA, 2005).

Além das particularidades já mencionadas, observa-se a presença de *B. cereus* amplamente distribuída na natureza, podendo esta ser encontrada no solo, água, e vegetações. Os esporos têm a característica de serem termoresistentes (BERG e SANDINE, 1970).

Ademais, o *B. cereus* é responsável por uma severa forma de endoftalmite, a qual pode resultar em perda parcial da visão ou até mesmo cegueira (DROBNIEWSKI, 1993), bacteremia, meningites, pneumonia, infecções do trato urinário e falência fulminante do fígado (KOTIRANTA; LOUNATMAA e HAAPASALO, 2000).

Por outro lado, este microorganismo tem importância na indústria de alimentos pela capacidade de produzir toxinas responsáveis por surtos de enfermidades transmissíveis por alimentos (ETA), pela produção de enzimas extracelulares que determinam o potencial de deterioração e também pela formação de esporos termoresistentes (ROBINSON E PHILL, 1987).

Dessa maneira, a bactéria *B. cereus sensu stricto* utiliza a glicose como fonte de carbono e não utiliza o manitol, a arabinose e a xilose, hidrolisa o amido e a gelatina. *B. cereus sensu stricto* apresenta ainda atividade hemolítica, sendo resistente à penicilina e produz a lecitinase. (GORE, SPIRA e KIM, 2003).

Segundo Fritze (2004), a capacidade de fermentar o manitol não é observada no *B. cereus*, tendo este também um sistema fosfolipase (lecitinase) ativo, o que confere características utilizadas em meios seletivos e diferenciais para o isolamento deste microorganismo. Ele analisou a produção de lecitinase por *B. cereus* e constataram que os filtrados de cultura de *B. cereus* apresentavam atividades hemolíticas, dermonecrótica e letal para camundongos. Esta enzima é secretada e formada pelas células no final da fase exponencial de crescimento.

Outrossim, a espécie *B. cereus* pertence ao gênero *Bacillus*, sendo este taxonomicamente complexo. Sendo assim, possui espécies mesófilas, com crescimento em temperaturas ótimas entre 30 e 45°C; e espécies termófilas, capazes de crescer em temperaturas maiores que 65°C, mas não a 45°C (GRANUM e BAIRD-PARKER, 2000).

### **3.4 - EPIDEMIOLOGIA DO *B. cereus* E SUA INCIDÊNCIA EM ALIMENTOS**

Com relação aos casos de doenças de transmissão alimentar, nota-se que os surtos por vômitos estão mais associados à presença do *B. cereus* em produtos à base de arroz. Entretanto, outros produtos têm sido implicados como é o caso das batatas, massas e queijos. Além destes, as misturas com molhos, pudins, sopas, assados e saladas têm sido também implicadas. Diante disto, o emprego de uma variedade de métodos de análise é recomendado

para a identificação e confirmação do *B.cereus* em alimentos. Em meados da década de 90, um método sorológico foi desenvolvido para identificação da enterotoxina diarréica do *B.cereus* para alimentos suspeitos (GRANUM, 1994).

A contaminação de alimentos por *B.cereus* constitui não somente uma importante causa de deterioração, mas também está associada à ocorrência de dois tipos de síndromes, devido à ingestão de alimentos contaminados com cepas patogênicas produtoras de toxinas, uma emética e outra diarréica. A toxina do tipo emético é pré-formada no alimento, enquanto a do tipo diarréico é, muito possivelmente, produzida no trato intestinal, sendo os fatores de virulência ainda não completamente caracterizados (MINAARD *et al*, 2001).

Vários estudos epidemiológicos têm mostrado o grande número de doenças de origem alimentar provocadas por cepas de *B.cereus*, sendo estas associadas à produção das toxinas emética e diarréica (GILBERT, 1979).

Atualmente, o *B.cereus* quando envolvido em casos de doenças de transmissão alimentar apresenta cinco principais produtos responsáveis: enterotoxina hemolítica (HBL), enterotoxina não hemolítica (NHE), enterotoxina T, toxina emética e citotoxina K (Cyt K) (RADHIKA *et al* 2002).

Valero, Hernándezz Herrero; Fernández P.S; Salmerón, M.C., 2002 constataram a presença de *B.cereus* em alimentos comercializados nas vias públicas da cidade de Salvador-BA, em 120 amostras de alimentos variados como: acarajé, cachorro quente, caldo de cana, mingau, e salgado, utilizando a metodologia preconizada pela APHA (2001). Os resultados obtidos foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC 12 (2001) da ANVISA, mostrando que 46,98% do acarajé, 0,83% do cachorro-quente, 19,17% do caldo de cana, 13,33% do mingau e 13,89% do salgado encontravam-se com valores de contaminação por *B.cereus* superiores a legislação supracitada.

Pereira M.S; Oliveira L.A.T; Franco R.M.C; Prado J.C., 1999 analisaram 38 amostras de condimentos como: sal, alho, noz-moscada, cravo, coentro, orégano, pimenta em pó e em pasta, procedentes de estabelecimento industrial submetido à Inspeção Federal, quanto a contagem de *B.cereus* ( $10^3$ ) UFC em placas. O resultado mostrou que em 76,6% das amostras confirmou-se bioquimicamente a presença de *B.cereus* nestes condimentos preparados, significando risco à saúde do consumidor. Tomando como base a Portaria 451/97 do Ministério da Saúde, os valores obtidos caracterizaram o produto como produto impróprio para consumo e potencialmente capaz de causar toxinfecção alimentar.

Costa; Oliveira, E.M, Borges,R.G., 2004 analisaram 75 amostras de leite em pó na cidade de São Luís, MA: 13 (17, 33%) das amostras foram positivas para *B.cereus* e 3

(4 %) do total das amostras analisadas apresentaram contaminação acima do valor máximo permitido pela legislação, e, encontravam-se, portanto, inadequadas para o consumo.

Vidal-Martins A. M. C; Rossi, O.D., Rezende-Lago, N. C., 2005 analisaram 110 (cento e dez amostras) de 11 (onze) diferentes marcas de leite ultra-alta temperatura (UAT), comercializadas em São José do Rio Preto-SP. As amostras foram submetidas à pesquisa de bactérias do grupo do *B.cereus* e tiveram como resultado a presença de *B.cereus* em 13 (11,8%) amostras.

Bugno; Buzzo A.A; Nakamura,C.T.;Pereira,T.C.;Matos,D.;Pinto.T.J.A., 2004, analisando 91 (noventa e uma) amostras de chás medicinais comercializados na cidade de São Paulo, identificaram a presença de *B.cereus* em 9,2% das espécies vegetais.

Balbani e Butugan, 2001, após um estudo para comprovar a contaminação microbiológica em alimentos em São Luís, MA, obtiveram resultados significativos quanto a presença de *B.cereus* em alguns alimentos, como almôndegas e macarrões. Dentre eles, foram encontrados *B.cereus*: em 90% das almôndegas analisadas; em 58,3% das amostras de macarrões com ovos e; em 87,5% das amostras de macarrões sem ovos.

Soares (2004) analisou amostras ambientais e de alimentos em dois restaurantes institucionais da cidade de Campinas/SP para a investigação das fontes de contaminação por *B.cereus* e a caracterização do perfil enterotoxigênico dos isolados. A produção de enterotoxinas foi investigada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes *hblA*, *hblD* e *hblC* e para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC*. De 124 cepas isoladas, 117 (94,3%) apresentaram-se positivas para tais genes; 18 (14,5%) foram positivas para os três genes codificadores da HBL; 25 (20,2%) foram positivas para os três genes codificadores da NHE; e 7 (5,6%) foram positivas para todos os genes. Um teste imunoenzimático de detecção da NHE (kit BDE-VIA: Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay; Tecra) também foi utilizado. Os resultados obtidos com o BDE-VIA revelaram que 89 (71,8%) das 124 isoladas eram produtores de NHE.

Lago; Rossi; Vidal Martins; Amaral., 2007 pesquisaram a presença de *B.cereus* e a produção de enterotoxinas produzidas por esses microrganismos em 120 amostras de diversos tipos de leite. O *B.cereus* foi isolado e identificado em 22 (73,3%), 15 (50,0%), 29 (96,7%) e 4 (13,3%) amostras de leite em pó, cru, pasteurizado e UAT (longa vida), respectivamente. Para a detecção de enterotoxinas pela técnica de PCR, foram positivos, respectivamente, 3 (13,6%), 1 (7,1%) e 10 (35,7%) microrganismos isolados das amostras de leite em pó, leite cru e leite pasteurizado.

Granum; Brynestad; Kramer., 1993 isolaram 85 cepas de *B.cereus* de leite pasteurizado, sendo 59% cepas enterotoxigênicas potencialmente capazes de causar

toxinfecção alimentar e destas, 7% foram caracterizadas como cepas psicrotróficas, pois tiveram um bom crescimento a 6°C. Rusul e Yaacob (1995) verificaram que 50% e 86,6% das cepas enterotoxigênicas de *B.cereus* isoladas de diversos alimentos foram capazes de crescer a 5°C e a 7°C, respectivamente, durante sete dias de incubação de leite UAT.

A literatura registra vários surtos envolvendo *B.cereus*. Um deles ocorreu na Romênia e atingiu 221 crianças, sendo o leite o veiculador da enfermidade (CHRISTIANSSON, 1992). De acordo com Becker *et al.* (1994), cerca de 18% dos casos de toxinfecção alimentar ocorridos entre 1985 e 1989 foram provocados por *B.cereus* e, na maioria desses casos, os alimentos envolvidos estavam contaminados com uma população pequena do microrganismo.

Notermans e Batt (1998) relatam que nos Estados Unidos, no período de 1988 a 1993, 2.423 surtos de doenças de origem alimentar foram relatados, onde o número de pessoas afetadas foi de 7.737; 21% desses surtos foram causados por *B.cereus*. Os alimentos associados mais predominantes referiam-se a comida chinesa.

Durante os anos de 1985 e 1989, na Holanda, 18% dos surtos alimentares foram relacionados à *B.cereus*.

O primeiro surto ligado à toxina diarréica foi reportado na Noruega. Johnson (1984) relata que se deu devido à ingestão de creme de baunilha. E um surto ocorreu em um hospital com pacientes portadores de doenças crônicas associado ao consumo de carne de peru contaminada com  $1,2 \times 10^3$  *B.cereus*/g.

Segundo Goepfert; Spira e KIM., 1972 na Holanda, durante o período de 1992 a 1994, ocorreu um total de 1543 surtos de intoxicações alimentares e 1087 casos isolados, sendo 473, por *B.cereus*.

Já Griffiths (1992), no Canadá, avaliando a ocorrência de *Bacillus* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, constatou que, de 150 amostras analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*, sendo o *B. cereus* detectado em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das de leite pasteurizado. Odumeru; Toner; Muckle; Griffiths e Lynch., 1997, também no Canadá, analisaram 43 amostras de leite pasteurizado e constataram a presença da bactéria em todas as amostras analisadas.

Souza; Abrantes e Cavados 2005., estudaram isolados do *B.cereus* provenientes de cafés torrados e moídos comercializados no Município do Rio de Janeiro, evidenciando assim o perigo em potencial do consumo dessa bebida, uma vez que tal contaminação no café torrado e moído pelo *B.cereus*, possivelmente pode ocorrer devido às cepas originárias do solo. Estas aderem ao grão, e, assim, devido à esporulação, o *B.cereus* pode sobreviver à torrefação (ANDERSSON *et al.*, 1995).

A capacidade desta espécie de se multiplicar em alimentos, independente da presença ou ausência de microrganismos endógenos (Rabinovitch; Vicente; Guaycurús; Freitas e Mesquita, 1993), causa sérios problemas à indústria de produtos alimentícios, especialmente à de produtos lácteos. A presença desta bactéria pode causar alterações na textura e, ou, no odor do alimento pela multiplicação de células vegetativas ou pela produção de toxinas. O resultado final deste processo é a contaminação alimentar, que pode provocar vômitos ou diarreias no organismo humano, e, mais raramente, ambos os episódios. Na tabela são mostrados dados qualitativos e quantitativos da incidência de *B.cereus* em alimentos.

**Tabela 1:** Incidência de *B.cereus* em alimentos

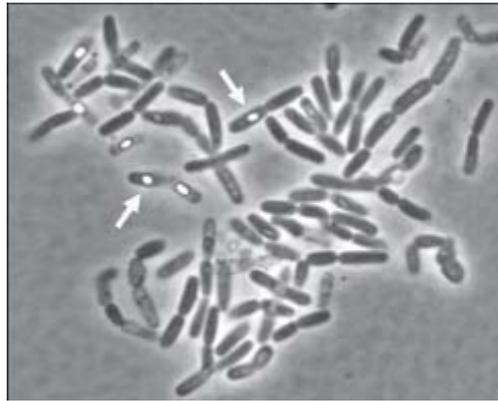
Tipo de alimento	Positividade	Contagens (UFC/g ou mL)
Arroz cru	40-100	$10^2-10^3$
Arroz cozido	12-93	$10^1-10^7$
Arroz frito	12-86	$10^1-10^5$
Leite cru	7-35	$10^2-10^2$
Creme	2-35	$10^1-10^4$
Leite em pó	5-11	$10^1-10^3$
Creme	15-75	$10^1-10^1$
Cereais	56	$10^2-10^5$
Carne crua	2-34	$10^2-10^6$
Carne cozida	22	$10^1-10^3$
Comida chinesa	83	$10^3-10^5$
Macarrão	50	$10^4$
Chocolate	30	$10^1-10^5$

Fonte: NOTERMANS E BATT (1998)

### 3.5 – PROPRIEDADES DOS ESPOROS DE *B. cereus*

Os esporos são importantes para a disseminação do *B. cereus* sensu stricto e sabe-se, ainda, que os de algumas estirpes aderem a células epiteliais humanas, o que se pensa ser um mecanismo de virulência adicional (KOTIRANTA, LOUNATMAA E HAAPASALO, 2000)

Os esporos de *B. cereus* possuem forma elipsóide, com localização central ou pericentral, sem provocar deformação da célula (Figura 5) (BIOCHER e BUSTA, 1983). Os esporos contêm o ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinodicarboxílico, DPA), que possui um papel fundamental na esporulação, germinação e estrutura dos esporos.



**Figura 5** Microscopia de contraste de fase de *B. cereus* evidenciando os esporos (indicado pela seta)  
Fonte: BHUNIA, 2007

Segundo alguns estudos, os esporos de cepas produtoras da toxina emética são considerados mais resistentes termicamente do que os das cepas que produzem enterotoxinas. Shinagawa, (1993) analisou os esporos das cepas eméticas, concluindo que as mesmas não foram destruídas a 100°C por 30 min ou a 105°C por 5 min, ao passo que os das cepas produtoras de enterotoxinas foram destruídos. Ainda segundo Johnson *et al* (1983), temperaturas entre 5 e 50°C mostraram – se viáveis para a germinação de esporos.

Conforme apontam os pesquisadores, os esporos de algumas cepas enterotoxigênicas de *B. cereus* podem aderir às células epiteliais humanas, constituindo um mecanismo suplementar de virulência. Presume-se que o crescimento e a produção da enterotoxina *in situ* sejam responsáveis por quadros diarréicos mais severos, quando comparados aos produzidos quando a toxina é secretada, diluída e até parcialmente degradada no intestino delgado, antes de atingir as células alvo do trato intestinal. Um surto diarréico de maior gravidade que afetou 17 indivíduos e teve 3 vítimas hospitalizadas, com dose infectante baixa (200 esporos/g de alimento) teria sido causado pela adesão das células vegetativas ou de esporos de *B. cereus* às células epiteliais do trato intestinal das vítimas (ANDERSSON *et al.*, 1998).

Os esporos de *B. cereus* em alimentos são responsáveis por doenças de origem alimentar e deterioração dos alimentos. Isto é devido à capacidade de resistência dos mesmos, o que permite a sobrevivência durante tratamentos de preservação de alimentos usados com frequência (KUSKE *et al*, 1998).

Os esporos são diferentes de suas células vegetativas na medida em que contém cinco vezes mais enxofre. Esse adicional de enxofre está presente sob a forma de cistina, contida no brasão de esporos. Postula-se que as proteínas do revestimento de esporos,

que são ricas em cistina, são as responsáveis pela manutenção da dormência dos esporos (HUSMARK e SIK, 1990).

As bactérias esporuladas são capazes de alterarem sua forma vegetativa para uma forma de resistência (esporo), visando sobreviver às condições extremas do meio ambiente em que se encontram. Mesmo quando submetidas ao tratamento de alta temperatura, capaz de eliminar totalmente as formas vegetativas de microrganismos presentes no grão do café, as formas esporuladas, altamente resistentes ao calor, poderão estar presentes no produto, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria-prima - o grão (KOTIRANTA, LOUNATMAA, K. e HAAPASALO, M. 2000).

Os esporos de *B. cereus* germinam entre 5°C e 50°C e o tempo de geração varia entre 26 e 57 minutos (JOHNSON, 1983). A influência da temperatura na germinação dos esporos e subsequente crescimento do *B. cereus* foram estudados por diversos autores. Em caldo tripticase-soja, Johnson, Nelson e Busta (1983) observaram que o crescimento ocorria entre 15°C e 50°C, sendo a temperatura ótima na faixa de 35 a 40°C e a germinação ocorrendo entre 5 e 50°C, porém sendo esta última mais rápida a 30°C (FRITZE, D. 2004)

O *B. cereus* sensu stricto pode ser um problema relevante em alimentos, uma vez que os esporos podem não ser eliminados pelos tratamentos de pasteurização e higienização, torração, além de ser consideravelmente resistente à radiação gama (PRIEST, 1993)

### **3.6– *B.cereus* E A LEGISLAÇÃO EM VIGOR**

A legislação brasileira (RDC 12 de 02 de janeiro de 2001) estabelece limites para *B.cereus* nos seguintes grupos de alimentos: raízes, tubérculos e similares; leite em pó e outros produtos lácteos; farinhas, massas alimentícias, produto de panificação, (industrializados e embalados) e similares; produtos a serem consumidos após adição de líquido, com emprego de calor (75°C durante 20 segundos), excluindo os de base láctea e de chocolate (cacau e similares); produtos a serem consumidos após adição de líquido, sem emprego de calor, excluindo os de base láctea; produtos de confeitaria, lanchonete, padarias e similares, doces e salgados - prontos para consumo; alimentos embalados e congelados, exceção de sobremesas; produtos a base de soja; alimentos infantis; alimentos para grupos populacionais específicos, incluindo as dietas enterais e excluindo os alimentos infantis; suplementos vitamínico e mineral e similar, em forma de pó, cápsulas, drágeas e similar.

A RDC 12 supracitada não estabelece limites para a presença *B.cereus* no café torrado e moído.

Países como o Canadá (Health Protection Branch - Guidelines For The General Cleanliness Of Food, 1999), Comunidade Européia, Peru, dentre outros, além de seguirem a legislação internacional específica do café, estabelecem a obrigatoriedade da circulação exclusiva de um café puro e livre de impurezas, o que especificamente inclui microrganismos patogênicos.

O Codex Alimentarius é um programa conjunto com FAO/OMS sobre Normas Alimentares, considerando que a população do mundo todo tem o direito fundamental de ter acesso a alimentos de boa qualidade, inócuos e nutritivos. As medidas de inocuidade dos alimentos que sejam necessárias para proteger a saúde pública devem estar de acordo com as Normas do Codex Alimentarius (FORSYTHE, 2002).

Este comitê acima emitiu um parecer sobre o *B.cereus* e outros *Bacillus spp.* em generos alimentícios em 26 e 27 de Janeiro de 2005. Nele se concluía que uma das principais medidas de controlo deve consistir no controle da temperatura e no estabelecimento de um sistema baseado em princípios de análise dos perigos e de pontos de controle críticos. Os alimentos nos quais estão frequentemente presentes esporos de *Bacillus spp.*, patogênicos, podem permitir o crescimento de *B.cereus*, após reidratação em água quente. Em conformidade com o parecer do comitê, o número de esporos de *B.cereus* presentes em alimentos após inserção de água quente deve ser o mais baixo possível durante a transformação, pelo que deve ser estabelecido um critério de higiene dos processos para além de boas práticas, a fim de reduzir o prazo entre a preparação e o consumo (BURTON e ENGELKIRK, 2005).

### **3.7 – PATOLOGIA DO *B.cereus***

Dois tipos de toxinas podem ser produzidos pelo *B. cereus*, sendo estas toxinas aparentemente diferentes, quando contaminam alimentos em concentrações maiores do que  $10^3$  UFC/g (CHRISTIANSSON, 1992): o tipo emético (intoxicação) ainda não muito detalhado e especificado e o diarréico (toxinfecção), este bem detalhado e analisado em diversos estudos. A toxina emética é produzida durante o crescimento bacteriano no alimento a partir de componentes do meio (GRANUM, 1994).

#### **3.7.1 – SÍNDROME EMÉTICA**

A toxina emética (cereulida) não é tão conhecida quanto a enterotoxina, devido à falta de um modelo biológico sensível adequado. Esta toxina não tem os mesmos efeitos

biológicos apresentados pela toxina diarréica, mas induz vômitos em curto período de tempo após a ingestão. É resistente ao aquecimento a 126°C por 90 minutos. Apresenta baixa ou nenhuma antogenicidade e sua produção ocorre no período final da fase logarítmica de crescimento, sendo liberada em grandes quantidades durante a lise celular. Alguns estudos sugerem que a produção desta toxina ainda não é conhecida até o momento (VARNAN e EVANS 1991).

A síndrome emética é causada por alimentos que já possuem a toxina produzida pela bactéria. Esta se origina da ingestão de alimentos cujos esporos tenham resistido ao aquecimento insuficiente para destruí-los e que, quando retomam a sua forma vegetativa, produzem a toxina (STADHOUDERS, 1992).

O tipo emético foi reconhecido pelo Public Health Laboratory Service, London, em 1972. Os sintomas da síndrome emética assemelham-se a intoxicação estafilocócica (*Staphylococcus aureus*) (EVANS, RUSSEL; JAMES; e CORRY, 2004)

A quantidade de cereulida produzida é dependente da temperatura de incubação e do meio de cultura, bem como de outros fatores extrínsecos como o pH, presença de oxigênio e de aminoácidos específicos. Uma vez que os esporos de *B. cereus sensu stricto* sobrevivem, em geral, à pasteurização ou à confecção do alimento e germinam em células vegetativas quando a temperatura lhes é favorável, a cereulida é geralmente produzida durante o armazenamento prolongado dos alimentos (RAJKOWSKI e BENNETT, 2003; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2004; BHUNIA, 2007).

Esta toxina tem ação mitocondrial, causando ingurgitamento da cabeça de espermatozóides e impedindo a sua motilidade, o que demonstra, a sua capacidade citotóxica. Alguns estudos mostraram que a cereulida inibe a atividade citotóxica e produção de citoquinas por linfócitos *natural killer* humanos e como tal, pode ter um efeito imunomodulador (RAJKOWSKI e BENNETT, 2003; BHUNIA, 2007; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

O surto emético de intoxicação alimentar é freqüentemente associado com alimentos como o arroz, todavia incidentes de doença eméticos vêm sendo associados a alimentos ricos em amido, tais como purê de batatas (JAY, 2005). Griffiths (1992) sugeriu que o amido pode promover o crescimento de *B. cereus* e a produção da toxina emética. Isto pode explicar porque as intoxicações alimentares relacionadas à síndrome emética são normalmente associadas com alimentos ricos em amido.

### 3.7.2- SÍNDROME DIARRÉICA

A síndrome diarréica caracteriza-se por um período de incubação que varia de 8 a 16 horas, e seus principais sintomas incluem: diarreia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, e, mais raramente, náuseas e vômito. A duração da doença é de 12 a 24 horas (FERMANIAN *et al*,1996). A enterotoxina pode ser pré-formada no alimento ou produzida no intestino. Neste último caso, após a ingestão de células vegetativas ou esporos de *B.cereus* (GRANUM, 1997).

A gastroenterite diarréica ocorre em decorrência da ingestão de alimentos contaminados com os esporos de *B.cereus*, sendo mais comuns os vegetais crus ou cozidos, produtos cárneos, leite e derivados, massas e outros alimentos à base de amido e farinhas. Os esporos são ingeridos juntamente com os alimentos e, uma vez no intestino, esses esporos germinam e causam doença através de toxinas que o microrganismo é capaz de produzir (FRANCO E LANDGRAF, 2006).

Barros; Panetta; Miguel., 2001 classificam a síndrome diarréica como a forma clássica de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) causada pelo *B.cereus* e cita alguns inquéritos epidemiológicos nos quais foram observados como os principais responsáveis por esta síndrome, dentre estes: os alimentos que continham amido de milho, purê de batata, verduras, carne picada, salsichas de fígado, arroz indonésio e sopas e grãos em geral, como também o grão do café.

Esta toxina diarréica foi detectada pela primeira vez em 1950 na Noruega, devido a um relato de surto envolvendo 600 pessoas. As primeiras evidências das propriedades enteropatogênicas colocam o *B.cereus* como sendo um importante agente etiológico de doença de origem alimentar (GRANUM, 1994).

Trata-se de uma enterotoxina de natureza protéica, termolábil que estimula o sistema adenilciclase da mucosa intestinal e provoca acumulação de sais e também eletrólitos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) e acaba assim, interferindo na absorção de glicose e de aminoácidos (MANTYNEM e LINDSTROM, 1998).

No mercado, existem inúmeros *kits* para a determinação da enterotoxigenicidade de cepas de *B. cereus*. Assim como, testes *in vivo*, como o acúmulo de líquidos em alça intestinal, e teste de alteração de permeabilidade vascular em pele, ambos em coelhos. Existem também kits comerciais para a sua detecção em alimentos ou em cultura de microorganismo, baseados em métodos imunológicos ou imunoenzimáticos-ELISA (BEECHER e WONG, 1994). A Tabela 2 descreve algumas das características da contaminação alimentar por *B. cereus*.

**Tabela 2.** Características dos dois tipos de doenças causadas por *B. cereus*

	<b>Síndrome Diarréica</b>	<b>Síndrome Emética</b>
<b>Dose de infecção</b>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup> (total)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>8</sup> células por grama de alimento para produzir toxina emética suficiente.
<b>Local de Produção da toxina</b>	No intestino delgado do hospedeiro	Formada nos alimentos
<b>Tipo de toxina</b>	Proteína (s)	Peptídio Cíclico
<b>Período de incubação</b>	8-16 h (ocasionalmente > 24 h)	0,5-5 h
<b>Duração da doença</b>	12-24 h (ocasionalmente vários dias)	6-24h
<b>Sintomas</b>	Dor abdominal, diarreia aquosa, (ocasionalmente diarreia sanguinolenta), às vezes com náusea.	Náusea, vômito e enjôo (às vezes seguidos por diarreia, devido à produção adicional de enterotoxina).
<b>Alimentos mais frequentemente contaminados</b>	Produtos à base de carne, sopas, vegetais, pudins/molhos e leite/produtos lácteos	Arroz reaquecido várias vezes, macarrão e alimentos prontos.

Fonte: GRANUM, 1997.

Becker *et al.* (1994) descrevem a síndrome emética como sendo causada geralmente pelo consumo de arroz, produtos lácteos desidratados ou alimentos infantis contaminados com números elevados de células de *B.cereus*.

Tal síndrome surge de 1 a 5 horas após o consumo de alimentos contaminados, e se caracteriza por ataque agudo de náusea e vômitos. Os sintomas são produzidos por alimentos com contagens de *B.cereus* superiores a 10<sup>6</sup> UFC/g. Alimentos submetidos ao tratamento pelo calor, não resfriados com rapidez, nem conservados em temperatura adequada, podem produzir intoxicação alimentar por *B. cereus* (SHINAGAWA, 1993).

A toxina diarréica é uma enterotoxina de natureza protéica, termolábil, sendo destruída pelo aquecimento a 55<sup>o</sup>. C por 20 minutos. É inativada pela tripsina, pepsina e pela proteinase, e instável em pH inferior a 4,0. Além disso, a toxina é também fortemente necrótica. Por outro lado, a enterotoxina produzida por *B.cereus* não dá reação cruzada com a enterotoxina termolábil produzida pelo vibrião colérico, por *Escherichia coli* e por

*Clostridium perfringens* e, ademais, é produzida durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano (COSENTINO; MULARGIA e PISANO, 1997).

Na síndrome diarréica, a dose infecciosa de *B. cereus* situa-se nas  $10^5$ - $10^8$  células ou esporos; no entanto, contagens de  $10^3$  UFC/g foram encontradas em alimentos causadores de toxinfecção alimentar (DOYLE, 1988). É importante salientar que menores quantidades de esporos podem estar associadas a surtos de toxinfecção alimentar, uma vez que estes são mais resistentes à ação do ácido gástrico do que as células vegetativas.

Devido às manifestações clínicas provocadas pela enterotoxina de *B. Cereus*, ela é também conhecida por diversos outros nomes: enterotoxina diarréica, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, toxina intestino necrótica, fator LRIL (*ligated rabbit ileal loop*). Além disso, a toxina diarréica é letal para camundongos quando injetada intravenosamente (REZENDE et al., 2000).

### **3.7.3- ENTEROTOXINAS DE *Bacillus cereus***

Granum (1994) em seus estudos ilustra que o *B. cereus* produz sete diferentes tipos de toxinas, sendo que seis deles são produzidos durante a fase de crescimento exponencial e secretados pelas células. A sétima toxina, a emética, é provavelmente produzida em maior quantidade a partir de componentes nos alimentos durante a fase estacionária de desenvolvimento do *B.cereus*. As sete toxinas podem ser divididas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e a toxina emética. Os dois principais tipos de toxinas produzidas pelo *B.cereus* e que são responsáveis por casos de ETA (Enfermidade Transmitida por Alimentos) são uma termolábil, que é a toxina diarréica, e uma termoestável, que é a toxina emética (VARNAM e EVANS, 1991).

### **3.7.4 – ENTEROTOXINA HEMOLÍTICA BL (HBL)**

O complexo HBL é formado por três componentes denominados B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> com pesos moleculares de 35, 36 e 45 kDa, respectivamente. Este complexo fora descrito por Beecher e MacMillan (1991). Para tornar máximas as atividades hemolítica, citotóxica e dermonecrótica, a ação de permeabilidade vascular e o acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho, este complexo enterotoxigênico requer os três componentes B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> (BEECHER et al., 1995).

A HBL foi originalmente purificada a partir da estirpe *B. cereus* F837/76, isolada de uma ferida pós-operatória (ARNESEN et al., 2008). Anteriormente, pensava-se que esta toxina era formada por apenas duas componentes: o elemento que ligava a célula alvo sendo a B e a que representava e desenvolvia a ação lítica, a L (BEECHER e MACMILLAN, 1991). Porém, estudos realizados por Beecher e MacMillan (1991) mostraram que a enterotoxina hemolítica BL é uma toxina tripartida constituída pela componente B que liga às células e por duas componentes, a L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, sendo estas últimas as responsáveis pela lise celular. Para a atividade da toxina, estes três elementos são necessários.

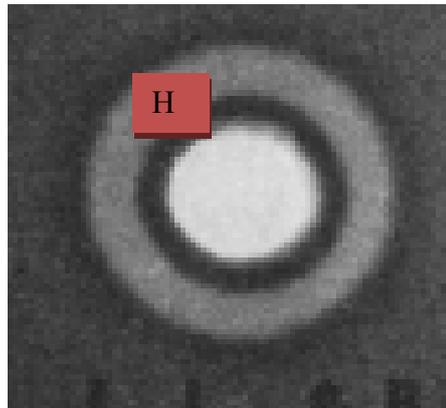
Um estudo realizado por Beecher *et al* (1995), com uso de técnicas imunológicas, detectou que a hemolisina produzida pelo *B.cereus* possui pelo menos dois componentes (“binding” e “lysis”, B e L, respectivamente). Os autores classificaram esses componentes quanto a sua capacidade de causar hemólise e verificaram que o componente B era necessário para ligar a toxina à hemácia, enquanto que o componente L era imprescindível para causar a lise dessa hemácia. Tais componentes não foram hemolíticos quando testados individualmente, apresentando tal característica apenas quando em conjunto.

Beecher e Macmillan (1991) concluíram que tal hemolisina era composta por três unidades (provavelmente três diferentes proteínas) que podiam ser separadas em três diferentes frações (B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>) e que a combinação desses três elementos era necessária para a produção de edema com manchas azuladas no teste de permeabilidade vascular em pele de coelho. De acordo com Beecher e Wong (1994), a hemolisina BL é o maior fator virulência do *B.cereus*

Pruss *et al.* (1999) afirmaram que a hemolisina BL (HBL) é produzida por todas as espécies do grupo *B.cereus* com exceção do *Bacillus anthracis*. Os autores investigaram a presença do gene relacionado à produção da HBL em várias cepas e, posteriormente, testaram tais cepas para a produção da HBL, através do uso de anticorpos monoclonais contra os componentes L1, L2 e B. O gene produtor de tal hemolisina foi detectado pelo uso do PCR (Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase) e foi encontrado nas oito cepas de *Bacillus thuringiensis* testadas. Destas oito cepas, sete produziram a HBL.

A hemolisina BL produz um característico e peculiar padrão de hemólise em gel difusão (BEECHER E WONG, 1994). Quando os três componentes da toxina se adicionam simultaneamente a um pocilho contendo Agar sangue, a hemólise não se inicia imediatamente. Após um período de difusão, a hemólise verifica-se a uma determinada distância do centro do pocilho (normalmente alguns milímetros), formando um anel em torno do mesmo (Figura 6). Este fenômeno designa-se por hemólise difusa. Com o passar do tempo,

as células incluídas no anel são completamente lisadas. No entanto, a hemólise não ocorre muito além do diâmetro inicial do anel.



**Figura 6** – Reação de hemólise da enterotoxinas HBL.  
Legenda: H, zona de hemólise  
(Fonte: BEECHER E WONG, 1994)

### 3.7.5 - ENTEROTOXINA NÃO-HEMOLÍTICA (NHE)

A enterotoxina não-hemolítica (NHE) é uma das enterotoxinas com três componentes responsáveis pela diarreia em intoxicação por *Bacillus cereus*. NHE é composto por *nheA*, *nheB* e *nheC*. Os três genes que codificam os componentes NHE constituem um operon. Os genes da NHE foram clonados separadamente e expresso em *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. A expressão mostrou que todos os três componentes são necessários para a atividade biológica.

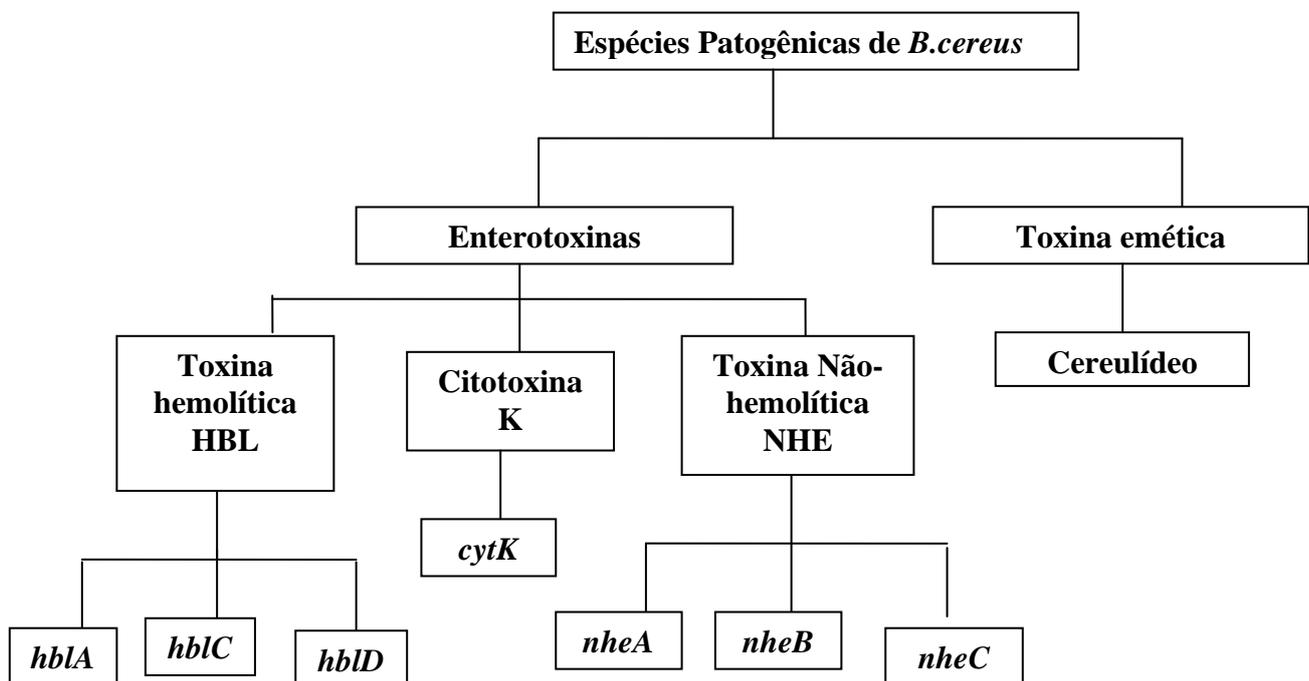
A enterotoxina não-hemolítica foi caracterizada pela primeira vez após um surto de toxinfecção alimentar na Noruega, em 1995, causada pela estirpe *B. cereus* NVH 0075/95 HBL-negativa (LUND E GRANUM, 1996).

A NHE é uma toxina tripartida formada por três componentes: *nheA* (41 kDa), *nheB* (39,8 kDa) e *nheC* (36,5 kDa) (LINDBÄCK et al., 2004). Nesta enterotoxina, o componente responsável pela ligação às células alvo é o *nheB*.

A NHE em contraste com a toxina HBL, que apresenta atividade hemolítica, dermonecrótica e enterotóxica, apresenta propriedades citotóxicas e/ou enterotóxicas (LINDBÄCK et al. (2004).

As enterotoxinas compõem-se da: toxina hemolítica BL (HBL), a toxina não-hemolítica (NHE) e cytotoxina K (cytK). Tanto o HBL como NHE são compostos de três proteínas (BEECHER e MACMILLAN, 1991): o HBL é codificado pelos genes *hblA*, *hblD* e

*hblC* em um operon; e o NHE é codificado pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*. O HBL e NHE são responsáveis pela diarreia humana (Figura 7)



**Figura 7:** Esquema das Toxinas produzidas por *B.cereus* e seus respectivos genes (Schoeni e Wong 2005)

### 3.7.6 – MECANISMO DE AÇÃO DAS ENTEROTOXINAS

Ao contrário da toxina emética, as enterotoxinas são produzidas no intestino delgado, entretanto alguns autores consideram que elas também podem ser produzidas no alimento pré-formadas (GRANUM, 1997). Para que a patologia ocorra, faz-se necessária a ingestão de alimentos contaminados com esporos ou células vegetativas de *B.cereus*. Os esporos não sofrem grandes alterações ao passarem pelo estômago, porém, ao atingirem o intestino delgado, eles germinam, crescem e produzem as enterotoxinas. As células vegetativas não possuem a mesma facilidade para atingirem o intestino, sendo, mais suscetíveis às condições no estômago (WIJNANDS et al., 2005).

Durante o consumo dos alimentos, o pH do estômago aumenta. O aumento do pH depende do tipo e da quantidade de alimento ingerido. Assim, durante a ingestão dos alimentos, o pH do estômago pode atingir valores que permitem a sobrevivência das células vegetativas, atingindo estas o intestino delgado (PIELAAT et al., 2006)

Após atingir o intestino delgado, as células vegetativas ou esporos permanecem durante algum tempo até que comece a produção de enterotoxinas. As bactérias do grupo *B. cereus* são dotadas de estruturas que lhes permitem uma maior aderência às células epiteliais do intestino delgado. Os esporos, por serem mais hidrofóbicos e possuírem *appendages* (projeções), conseguem uma boa aderência às células (ANDERSSON *et al.*, 1998). As células vegetativas também são constituídas por estruturas que lhes permitem aderir às células do intestino humano: *appendages*, flagelos e a proteína *S-layer* (KOTIRANTA *et al.*, 2000).

A presença da proteína *S-layer* em torno da parede celular das células vegetativas de *B. cereus sensu stricto* tem uma função muito importante na determinação da hidrofobicidade da superfície celular. As estirpes constituídas por esta proteína são mais hidrofílicas, o que lhes permite uma maior aderência ao colágeno tipo I, laminina, fibronectina e ao fibrinogênio e, conseqüentemente, uma ligação efetiva à matriz protéica. A *S-layer* também aumenta a resistência das bactérias à fagocitose. (KOTIRANTA *et al.*, 2000).

### 3.7.7 – A TÉCNICA DE PCR – DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido bem utilizada em análise microbiológica, sendo uma valiosa ferramenta e alternativa para os métodos ditos convencionais. Ela oferece seletividade, rapidez e um limite de detecção aceitável. (MALORNY *et al.*, 2003).

Esta técnica teve sua origem em 1983 por Kary Mullis, sendo um método de amplificação de seqüências específicas de DNA ou RNA. As repetidas séries do ciclo envolvem a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase, resultando em uma acumulação exponencial de fragmentos específicos. Devido à extensão do *primer*, os produtos sintetizados em um ciclo podem servir de molde para os próximos e o número de cópias do fragmento alvo dobra a cada ciclo (EDWARDS e EWING, 1991).

São inúmeras as aplicações deste método, dentre elas: o diagnóstico genético, a clonagem de genes ou fragmentos de DNA/RNA; testes de mutações; teste de paternidade; mutagênese para investigação da função protéica; para avaliar diferenças quantitativas na expressão genética; transcrição reversa; identificação de mudanças na expressão de genes desconhecidos, *Diferencial Display* (DD)-PCR; análises forenses; e controle de qualidade industrial (ERLICH, 1992).

Os componentes essenciais para a PCR são: a DNA polimerase termoestável, os *primers* oligonucleotídeos, desoxinucleotídeos (DNTPs), DNA molde, íons magnésio, tampão e água.

As enterotoxinas podem ser detectadas por métodos baseados na PCR ou através de kits comerciais baseados em técnicas de imunoenensaio, sendo estes últimos disponíveis para os complexos HBL e NHE (KNIEHL et al., 2003). A PCR tem sido ferramenta importante na avaliação do potencial toxigênico de *B.cereus*, sendo as toxinas diarréicas alvos freqüentes destes estudos.

O gene codificador do componente B da HBL, o *hblA*, foi seqüenciado por Heinrichs *et al* (1993), e os genes associados às frações lítica L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> foram seqüenciados por Ryan et al (1997), sendo assim denominados de *hblD* e *hblC*. Os genes que codificam o complexo NHE foram seqüenciados por Granum et al (1999), sendo denominados, *hblD* e *hblC*, respectivamente.

Hansen e Hendriksen (2001) investigaram cepas de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* quanto à presença dos genes associados à HBL e NHE. Os genes codificadores da HBL foram detectados por PCR na maioria (70,7%) das 41 cepas de *B. thuringiensis* e em metade das 22 cepas de *B. cereus* investigadas. Resultados semelhantes foram observados para os genes codificadores da NHE: 80,5% das cepas de *B. thuringiensis* e 59% das cepas de *B. cereus* foram positivas para estes genes.

### **3.7.8 - O *Bacillus thuringiensis***

A crescente preocupação com o meio ambiente tem elevado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão constante que o ecossistema sofre por intervenções antrópicas. Por este motivo e por outros, como o elevado custo de defensivos agrícolas e o aumento da resistência das pragas a esses produtos, o número de pesquisas com microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública aumentou.

Dentre esses microrganismos, destaca-se a bactéria *B. thuringiensis*, que possui atividade entomopatogênica e é amplamente utilizada como controle biológico de várias pragas agrícolas (GLARE E CALLAGHAM, 2000).

A bactéria entomopatogênica *B.thuringiensis* é largamente empregada como alternativa no controle biológico de diversas pragas. Produtos à base desta bactéria têm sido utilizados há mais de 50 anos e proporcionam inúmeras vantagens, tais como especificidade

ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente, inocuidade a mamíferos e vertebrados e por não serem fitopatogênicas (MONNERAT E BRAVO, 2000).

É uma bactéria de solo, Gram-positiva, esporulante e anaeróbia facultativa. Possui uma inclusão cristalina, composto por proteínas, com ação extremamente tóxica e altamente específica. Contamina os insetos por via oral, multiplicando-se no seu interior. Suas toxinas, sintetizadas como protoxinas, provocam lesões no epitélio intestinal dos insetos em seu estágio larval. Após a ingestão, os cristais são solubilizados dentro do tubo digestivo graças a um pH alcalino, o que explica a alta suscetibilidade dos insetos com pH intestinal acima de 8,0, e são ativados por proteases contidas no fluido intestinal. A toxina liga-se a receptores específicos presentes na superfície da membrana das células epiteliais, formando poros e causando o desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, e, em seguida, causa a lise celular e a morte da larva (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998; AZEVEDO, 1998; HABIB E ANDRADE, 1998; ALVES e CASTRO, 1998).

O *B. thuringiensis* foi descrito pela primeira vez em 1911 por Berliner, quando este isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Logo em seguida, ele o nomeou *B.thuringiensis*, homenageando assim à província de Thuringia (Alemanha), local onde foi encontrado o inseto infectado. Porém, em 1901, S.Ishiwata, biólogo, isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease”, denominando-o *B.sotto*. Este último, porém, logo se tornou inválido, sendo o nome do bacilo mais recente mantido, a saber: *B. thuringiensis*.

O desenvolvimento da bactéria *B. thuringiensis*, Gram-positiva, faz-se em meios artificiais simples na presença de oxigênio, e, em ambiente com certas restrições, como ausência de nutrientes, onde esse bacilo entra em processo de esporulação, produzindo uma grande quantidade de proteína com atividade inseticida. Essas proteínas acumulam-se formando um corpo de inclusão proteica, fato este que as denominou de proteína Cristal (Cry), também chamada de  $\delta$ -endotoxina (YAMAMOTO E DEAN, 2000; BRAVO et al.,2005).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que o *B. thuringiensis* possui. Estes genes codificam para as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI *et. al*, 1991). Ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino do inseto. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, e interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. O aumento na

absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, ele pára de se alimentar (HOFTE E WHITELEY, 1989; COPPING E MENN, 2000).

As protoxinas produzidas assumem formas morfológicas distintas que podem ser evidenciadas através do estudo morfológico realizado por microscopia eletrônica. Apresentam cristais bipiramidais, cuboidais, piramidais e esféricos, o qual pode fornecer indicações sobre a atividade tóxica e, conseqüentemente, a ligação dessa toxicidade aos diferentes tipos de genes codificadores de proteína cristal, efetivos contra vários insetos das ordens Lepidóptera, Díptera e Coleóptera (DE MAAGD *et al.*, 2003). Essas diferenças estruturais e tóxicas também são reveladas pelos alinhamentos, que mostram regiões comuns entre genes Cry, denominadas regiões conservadas, e regiões onde se apresentam diferenças na seqüência de nucleotídeos, resultando em diferentes proteínas Cry, ativas contra várias espécies de ordens distintas (SCHNEPF *et al.*, 1998).

O termo *B.thuringiensis*, geralmente, é empregado para uma única espécie, tomando por consideração os aspectos taxonômicos. Esta bactéria pertencente a um complexo de várias espécies (*B.anthraxis*, *B.cereus*, *B.mycoides*, *B. thuringiensis* e *B.weihenstephanensis*). Este complexo é denominado *B.cereus*.

Tanto o *B.cereus* e o *B. thuringiensis*, mostram entre si características bioquímicas e fenotípicas comuns, mas, por definição, podem ser diferenciados pela presença de cristais (LUTHY E WOLFERSBERGER, 2000), que podem ser vistos em microscopia de contraste de fase. A distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo discussão de muitos taxonomistas (SHENEPEPF *et al*, 1998).

Glare e Callagham (2000) confirmam que casos envolvendo o *B. thuringiensis* como causador de doença em seres humanos são raros, porém podem acontecer em número reduzido. O número de células de *B. thuringiensis* obtidas varia de  $10^2$  a  $10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC), por grama de solo (DAMGAARD, 2000).

Vários pesquisadores buscam caracterizar novos isolados de *B. thuringiensis* quanto ao seu potencial entomopatogênico, contra principais pragas de grãos armazenados. Dentre essas pragas, o *Sitophilus oryzae* (L. 1763) (Coleóptera, Curculionidae) é 1 das 11 principais pragas dos grãos armazenados no Brasil, por uma série de características que apresenta: elevado potencial biótico, infestação cruzada, praga de profundidade, elevado número de hospedeiros, e pelo fato de tanto larvas como adultos danificarem os grãos (GALLO *et al.*, 2002). Ademais, há uma espécie cosmopolita que, supostamente, teve sua

origem na Índia, e foi disseminada pelo mundo por grãos infestados e transportados em navios (ATHIE E PAULA, 2002).

As linhagens de *B. thuringiensis* podem ser encontradas na maioria dos nichos ecológicos, tais como solo (BERNHARDT *et al.*, 1997; MARTIN E TRAVERS, 1989), filoplano de diferentes plantas (HANSEN *et al.*, 1998; SMITH E COUCHE, 1991), insetos e seus habitats (CHILCOT E WIGLEY, 1993) e grãos estocados (MEADOWS *et al.*, 1992). Portanto, produtos à base de *B. thuringiensis* podem ser aplicados em vários ecossistemas para alcançar o controle de insetos, tais como folhagens, solos, ambientes aquáticos e grãos armazenados. Após a aplicação do *B. thuringiensis* a um ecossistema, o organismo pode persistir como um componente natural da microbiota. A sobrevivência e a atividade das linhagens de *B. thuringiensis* no ambiente foram revisadas por Hansen et al. (1996).

#### 4 – CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DO *B.cereus* E *B. thuringiensis*.

CARACTERÍSTICAS	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Bacillus Thuringiensis</i>
<b>Gram</b>	+ <sup>a</sup>	+
<b>Catalase</b>	+	+
<b>Motilidade</b>	+/- <sup>b</sup>	+/-
<b>Redução de Nitrato</b>	+	+/-
<b>Decomposição da tirosina</b>	+	+
<b>Resistência à lisozima</b>	+	+
<b>Reação com gema de ovo</b>	+	+
<b>Utilização anaeróbia da glicose</b>	+	+
<b>Produção de ácido por manitol</b>	-	-
<b>Hemólise</b>	+	+
<b>Características patogênicas</b>	Produção de enterotoxina	Cristais de Endotoxina

<sup>a</sup>+ 90-100% das cepas são positivas, <sup>b</sup>+/- 50-50% das cepas são positivas

## 5- MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 – AMOSTRAGEM

Foram analisados 03 lotes distintos de 10 marcas diferentes de café. Por intermédio de meio seletivo contendo lecitina da gema de ovo foi realizado o isolamento das linhagens de *B. cereus*, e também, a contagem do número de células viáveis por mg de amostra.

As análises microbiológicas e moleculares para *B. cereus* foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do IOC/FIOCRUZ.

### 5.2 – METODOLOGIA

#### 5.2.1 – ISOLAMENTO, CONFIRMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Bacillus cereus* DIRETAMENTE EM AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

A contagem, isolamento, confirmação e identificação de *B. cereus* foram realizadas conforme metodologia recomendada por Gordon *et al*, 1973; Claus e Berkeley (1986). Uma cepa padrão (*B. cereus* NCTC 2599) foi utilizada como controle. O meio de cultura da hidrólise da lecitinase foi realizado segundo Vasconcelos e Rabinovitch (1994).

O processo de isolamento e plaqueamento foram realizados da seguinte maneira: Pesou-se 2 g do material (pó de café); adicionou-se assepticamente em *Erlenmeyer* contendo 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 e agitou-se vigorosamente em vortex, deixou-se descansar por 2 min. Retirou-se 2 ml desta suspensão e adicionou-se em um tubo estéril. Colocou-se em banho-maria (termo-resistência) durante 5 min a 65°C. Deixou-se resfriar e plaqueou-se 100 µL da solução mãe e da diluição 10<sup>-1</sup> em placas com o meio de cultivo para hidrólise de lecitina. Levou-se para estufa a 31°C por 24 horas e após este período observou-se à presença das colônias lecitinase positivas. As que apresentaram o halo de hidrólise foram selecionadas e suas células foram observadas em microscópio óptico com um aumento de 1500X através de lâminas a fresco e também pelo método de Gram quando se obteve as dimensões celulares, já que o *B. cereus* possui largura  $\geq 1$  µm.

Esses isolados suspeitos para *B. cereus* foram mantidos em ágar nutriente (Nutrient agar; Merck) a 4°C e, em seguida, foram confirmados e identificados através da coloração de Gram, reação da catalase, fermentação anaeróbia da glicose, redução de nitrato, teste VP (Voges-Proskauer) modificado, decomposição da tirosina, resistência a lisozima, teste de motilidade, crescimento rizóide e atividade hemolítica.

## 5.2.2- EVIDENCIAÇÃO DO ESPORO E CORPO PARAESPORAL

Foi realizada através de observação por microscopia óptica, de montagem úmida entre lâmina e lamínula de culturas de 48 horas de crescimento a 30°C em Agar nutriente. Observou-se também a predominância do tipo de esporo, elipsoidal ou cilíndrico, posição do esporo se central, subterminal ou terminal. A deformação ou não, bem como a presença ou não de corpo paraesporal, característica presente no *Bacillus thuringiensis*.

## 5.2.3 – CRESCIMENTO E LISE CELULAR PARA ANÁLISE DE ISOENZIMAS

As isoenzimas detectáveis podem originar-se a partir de três fenômenos bioquímicos e genéticos, os quais devem ser considerados nas interpretações eletroforéticas. O primeiro, multialelismo em um único loco, ou seja, há mais de um alelo para um único loco que codifica uma enzima; em segundo, locos múltiplos, há mais de um loco, no cromossomo, que codifica uma enzima, e em terceiro, formação de enzimas secundárias, por modificações pós-traducionais na cadeia polipeptídica. Esta última formação é normalmente reconhecida pela produção de uma série de bandas para cada alelo (HARRIS E HOPKINSON, 1976).

Baptist; Mandel e Gherma (1978) afirmaram que se um número suficiente de enzimas (cinco ou mais) fosse comparado, o resultado desta análise mostraria que dois indivíduos da mesma espécie difeririam na mobilidade eletroforética em torno de 20% ou menos, enquanto que indivíduos de espécies diferentes difeririam em torno de 50% ou mais.

A partir de um crescimento de 24 horas em tubos contendo Caldo Nutriente (Difco), foi feita uma semeadura em placas de Petri contendo Ágar BHI (Difco). Estas foram divididas em seis partes, e assim foram semeadas até seis culturas por placa, incubadas a 30°C por 14 a 16 horas, a fim de se trabalhar com o estágio vegetativo de crescimento. Para cada cultura foi preparado um tubo Eppendorf com 200 µL de tampão de lise (1% Triton x-100; 0,1 M Tampão Tris pH 8.0; 0,001 M DTT e 13% ácido ε-aminocapróico), e a ele adicionadas 30 mg de pérola de vidro com 0,5mm de diâmetro. O material semeado foi coletado com o auxílio da alça de platina e então, colocado nesses tubos, sendo homogeneizado em vortex por um minuto. Desta forma realizou-se um processo de lise químico e físico das células bacterianas. O material lisado foi então acondicionado a 0°C. As células lisadas e congeladas foram utilizadas e reutilizadas até três vezes para as corridas eletroforéticas (ZAHNER *et al.*, 1989; ZAHNER, 1992).

#### **5.2.4 - TÉCNICA DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS**

Para a preparação do gel de agarose a ser utilizado na corrida de eletroforese, foi preparado uma solução de agarose a 1% (p/v) em tampão (Tris maléico pH 7,4 , Fosfato pH 8,0 , Tris citrato pH 8,1 ) na proporção de 1:2.

Após pesagem da agarose e colocação da solução tampão apropriada, este conjunto foi fundido e derramado sobre uma película plástica Gel Bond específica. Após secagem sobre o suporte, o gel foi acondicionado em geladeira por, no mínimo 18 horas, e no máximo 48 horas. Para sua utilização, o gel foi coberto com papel de filtro para secagem antes da aplicação dos lisados de células, o que permitiu uma melhor absorção. Para a aplicação das amostras colocou-se uma fita plástica com 24 orifícios eqüidistantes. Foram aplicados 5 µL, aproximadamente, de cada lisado em cada orifício da fita sobre o gel e em três orifícios aplicou-se junto com o lisado 5 µL, aproximadamente, de um composto de corantes (azul de bromofenol, 34 mg; xilenocianol, 28 mg; água destilada, 10 mL) utilizado como marcador de corrida, para facilitar a visualização e controle da velocidade e o término da corrida. Cada corante possui cargas diferentes de modo que se separam durante a corrida, ficando o xilenocianol mais próximo do anodo e o azul de bromofenol mais próximo ao catodo.

Após aplicação e secagem dos lisados, o gel foi colocado sobre uma cuba de eletroforese horizontal Multiphor II System, a temperatura constante de 10°C mantida por um circulador de água refrigerada Multitemp II. As duas câmaras, do catodo e do anodo, da cuba de eletroforese, foram preenchidas com dois litros cada com tampão apropriado para cada enzima a ser testada. As amostras foram colocadas no catodo e a migração dava-se para o anodo, tendo a maioria das enzimas testadas, sob as condições experimentais, carga negativa.

#### **5.2.5 - REVELAÇÃO DAS ISOENZIMAS**

Ao término da corrida eletroforética, o gel foi removido da cuba e imerso na solução de revelação específica e, em seguida, incubado a 37°C. O tempo depende de observação constante para determinar melhor o momento para a interrupção das reações enzimáticas para visualização das bandas. A interrupção foi feita adicionando-se ao gel uma solução de ácido acético a 5% (v/v). O material não precipitado durante a revelação foi removido através de seguidas trocas da solução de ácido acético.

### **5.2.6 - ANÁLISE NUMÉRICA**

Os resultados obtidos na eletroforese de isoenzimas foram transformados em matrizes binárias e submetidos ao programa de análise numérica NTSYS-pc versão 2.1, criado por James Rohlf, do Departamento de Ecologia e Evolução da Universidade Estadual de Nova York, Stony Brook, NY 11794-5245.

### **5.2.7 – ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA (HBL).**

Foi utilizada a verificação da produção de hemólise através do uso de placas de Petri com 5% de sangue desfibrinado de carneiro adicionado ao Ágar BHI (Brain Heart Infusion). A atividade hemolítica foi pesquisada a partir da semeadura de um inóculo de 5 mL do crescimento das culturas bacterianas sobre a superfície da placa contendo Ágar BHI (Difco) mais sangue desfibrinado de carneiro a 5%. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas, ao final e após esse período, foi verificada a existência de atividade hemolítica, indicada por uma zona de hemólise completa de 2-4 mm de diâmetro ( $\beta$  hemólise) ao redor do crescimento bacteriano.

### **5.2.8 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS DIARRÉICAS DE CÉLULAS BACTERIANAS**

As cepas isoladas foram inoculadas em 3 mL de Caldo Infusão de Cérebro e Coração (Broth Heart Infusion – BHI/OXOID) suplementado com 1% de glicose e incubadas a 33°C  $\pm$  1°C durante 4h. Após este período, 100  $\mu$ L foram inoculados em 25 mL de Caldo BHI glicosado e incubado numa temperatura de 33°C  $\pm$  1°C e agitação em 175 rpm, durante um período de 18-20h. Posteriormente, cada cepa foi centrifugada a 2.200 rpm, a 10°C durante 20min. O material centrifugado (sobrenadante e resíduo) foi guardado em refrigeração até o momento de ser utilizado.

A placa de Elisa foi organizada de forma que cada fila consistia de 8 poços. Cada amostra necessitava utilizar duas dessas filas de poços. Com uma pipeta, foram depositados 25  $\mu$ L de diluente (TD 954) em cada poço das duas filas, exceto no 1º poço de cada fila. Em seguida, adicionou-se 25  $\mu$ L de amostra ao 1º e 2º poços de ambas as filas. Com auxílio de uma pipeta, foram retirados do 2º poço de cada fila 25  $\mu$ L e efetuaram-se diluições duplas ao longo de cada uma das filas e interrompeu-se no 7º poço, onde o último poço

conteve apenas o diluente (TD 954). A cada poço da 1<sup>o</sup> fila, adicionaram-se 25 µL de controle (TD 952). Para homogeneizar o conteúdo de cada poço, agitou-se manualmente. Para evitar a evaporação, cobriu-se a placa com uma tampa. A placa inoculada permaneceu sobre uma superfície livre de vibrações, à temperatura ambiente. Após 24h, foi examinado cada poço de cada fila, na qual se procurou vislumbrar sinais de aglutinação contra um fundo preto.

### **5.2.9 – DETECÇÃO DA PRESENÇA DA TOXINA HEMOLÍTICA – HBL C (L<sub>2</sub>)**

Para a detecção da presença da fração lítica L<sub>2</sub> do complexo HBL (toxina diarréica) foi utilizado um “kit” comercial BCET-RPLA/OXOID (Aglutinação Passiva de Látex Invertida), que permite a detecção do antígeno solúvel, como toxinas bacteriológicas, em um ensaio de aglutinação. Este “kit” foi usado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

### 5.2.10 – PCR (REAÇÃO DE CADEIA EM POLIMERASE)

A presença de genes que codificam os complexos HBL e NHE foi verificada através da técnica da PCR. Os iniciadores (primers) utilizados para a amplificação dos genes associados à produção das enterotoxinas estão listados na tabela 1.

A extração do DNA total das células foi realizada segundo a metodologia de lise térmica por Harwood e Cutting, 1990. As amostras foram cultivadas em meio de cultura sólida (Agar Nutriente), e após 18h, foi retirado com uma alça descartável o crescimento equivalente a uma colônia. O crescimento foi suspenso em 1 mL de tampão TE (Tris-HCl 1M, pH 8,0 e EDTA 0,5M, pH 8,0) para extração do DNA cromossômico e, posteriormente, homogeneizado em vórtex. Em seguida a este processo, centrifugou-se a 3000 rpm durante 5min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo (“pellet”) ressuspenso em 400 µL de tampão TE. O resíduo foi aquecido em banho-maria a 100°C por 10min. Após esse período, centrifugou-se a 11000 rpm por 1min. O sobrenadante foi retirado e transferido para micro-tubos estéreis (“ependorfs”) e mantido sob refrigeração.

Para obtenção do DNA cromossomal de cada linhagem autoaglutinantes de *B. thuringiensis*, a extração do DNA seguiu a metodologia usada por Harwood *et al* (1990) citado em Santos (2000), onde as estirpes foram inoculadas em 3 mL de Caldo Luria-Bertani (Bacto-triptona 10g/L, Extrato de levedo - 5g/L, Cloreto de sódio – 10g/L pH 7,2) a 33°C ± 1°C, 130 rpm por 4 horas. Desse pré-inóculo, foram retirados 100 µL e inoculados em 10 mL de Caldo Luria-Bertani, sendo incubados nas mesmas condições do pré-inóculo por 24 horas.

As células foram recolhidas do meio de cultivo por centrifugação a 5.000 rpm por 20 minutos, a 10°C. O resíduo resultante foi ressuspenso em 1 mL da solução tampão (10mM Tris-HCl pH 7,0; 10mM EDTA pH 8,0; 300mM NaCl). Em seguida, o sedimento de cada amostra foi centrifugado durante 5 minutos a 13.000 rpm e 10°C. Após o descarte do sobrenadante, foram acrescentados 300 µL da solução tampão, sendo homogeneizado em agitador magnético. A seguir, foram adicionados 150 µL de solução de Lisozima (20mg/mL), e homogeneizado por inversão (± 15 vezes) e resfriado em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi aquecido em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após retirar do banho-maria, foram adicionados 25 µL de Lauril sarcosil (30%), homogeneizando-se delicadamente e aquecendo em banho-maria a 65°C por 28 minutos. A seguir, deixou-se descansar por 10 minutos em gelo.

Seguiu-se o tratamento com fenol-clorofórmio (v/v), com homogeneização em agitador magnético até aparência leitosa. Em seguida, centrifugou-se por 6 minutos, a 3.000 rpm, a 10°C. Posteriormente, passou-se à recuperação da fase superior e posterior tratamento

com clorofórmio 1:1 com homogeneização em agitador magnético. Após a centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos a 10°C), seguiu a recuperação da fase superior pela centrifugação e posterior tratamento com 2,5X de álcool etílico gelado (v/v) e 10 µL de acetato de sódio 3 M (pH 7,0). A homogeneização foi feita por inversão dos tubos suavemente. Os tubos foram depositados em freezer (-20°C) para precipitar até o dia seguinte.

Após 24 horas, esses tubos foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e 10°C. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 500 µL de etanol a 70% gelado, centrifugando-se por mais 5 minutos a 10.000 rpm e 10°C. O sobrenadante foi desprezado e colocavam-se os tubos contendo o DNA extraído na capela química com exaustão por 1 hora para evaporação do etanol. O material extraído foi ressuspensão em 120 µL de água bidestilada estéril e, posteriormente, homogeneizado e tratado com 1 µL de RNase (30mg/mL) e aquecido em banho-maria a 37°C por 1 hora. Ao final desse período, o material extraído foi estocado em freezer (-20°C) para uso posterior.

Para os ensaios foi utilizado um Kit da Amersham Pharmacia Biotech denominado “Ready to Go PCR Analysis Beads”. A metodologia utilizada, bem como os ciclos para PCR seguiram as recomendações do fabricante.

#### **5.2.11 – DETECÇÃO DOS GENES DE *B. cereus* CODIFICADORES DAS ENTEROTOXINAS ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)**

O conjunto de iniciadores usados neste estudo encontra-se descrito na tabela 3. A detecção através da PCR para os genes *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* e *nheC* foi efetuado como descrito por Hansen *et al* (1998). Um microlitro do DNA extraído foi amplificado com 1.25 U de *Taq* polimerase em um volume total de 25 µL usando 30 ciclos a 94°C por 15s, 55°C por 45s e 72°C por 2 min para a desnaturação, anelamento e extensão do iniciador, respectivamente. Todas as amostras do PCR foram submetidas a uma pré-amplificação por 5 min a 95°C e uma pós- amplificação por 7 min a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados pela separação de 10 µL do produto amplificado e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em Tris-borato EDTA (TBE 0,5X) (Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) a 90V, por 35 min e visualizados sob a luz ultravioleta, após tratamento por 10 min com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL. Um peso molecular de 100 pb de DNA da “Amersham Pharmacia Biotech” foi usado como referência.

**Tabela 3:** Sequências dos iniciadores das enterotoxinas utilizados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

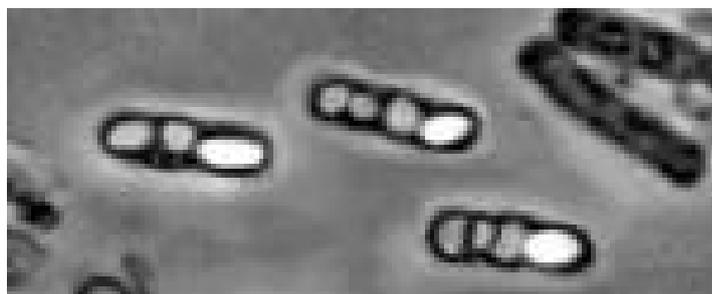
<b>Iniciadores<sup>a</sup></b>	<b>Seqüência (5' - 3')</b>
<b><i>HBLA</i></b>	<b>HBLA1: GTGCAGATGTTGATGCCGAT (F) HBLA2: ATGCCACTGCGTGGACATAT (R)</b>
<b><i>HBLC</i></b>	<b>L2A: AATGGTCATCGGAACTCTAT (F) L2B: CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT (R)</b>
<b><i>HBLD</i></b>	<b>L1A: AATCAAGAGCTGTCACGAAT (F) L1B: CACCAATTGACCATGCTAAT (R)</b>
<b><i>NHEA</i></b>	<b>NHEA 344 S: TACGCTAAGGAGGGGCA (F) NHEA 843 A: GTTTTTATTGCTTCATCGGCT (R)</b>
<b><i>NHEB</i></b>	<b>NHEB 1500 S: CTATCAGCACTTATGGCAG (F) NHEB 2269 A: ACTCCTAGCGGTGTTCC (R)</b>
<b><i>NHEC</i></b>	<b>NHEC 2820 S: CGGTAGTGATTGCTGGG (F) NHEC 3401 A: CAGCATTCGTACTIONGCCAA (R)</b>

**a** = Referência dos iniciadores, Hansen e Hendriksen, 2001

## 6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1- ISOLAMENTO, CONFIRMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Bacillus cereus* EM AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

Das 30 amostras analisadas, 25 linhagens foram isoladas, das quais 14 eram representantes da espécie *B. cereus* e 11 de *B. thuringiensis* (figura 8) espécies estas que têm a característica de dividirem o mesmo habitat. Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados referentes ao isolamento e provas bioquímicas de *B. thuringiensis*.



**Figura 8:** Microfotografia de *Bacillus thuringiensis* em microscópio Eletrónico de transmissão.

**Tabela 3:** *Bacillus thuringiensis* isolados das distintas marcas de café torrado e moído

Cepas Isoladas <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tamanho das células		Esporos			Coloração	Toxicidade para *	
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Forma	Deformação/ Esporângio	Posição	Gram	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
1.1	2,6	0,7	E	-	ST	+	+	+
3.1	3,0	1,2	E	-	ST	+	+	+
4.1	2,9	1,1	E	-	ST	+	+	+
10.1	3,1	1,2	E	-	ST	+	+	+
1.2	3,0	1,2	E	-	ST	+	+	+
3.2	2,6	1,2	E	-	ST	+	+	+
4.2	2,9	0,7	E	-	ST	+	+	+
10.2	3,1	0,6	E	-	ST	+	+	+
1.3	3,0	1,2	E	-	ST	+	+	+
2.1	2,9	1,1	E	-	ST	+	+	+
2.2	2,6	1,2	E	-	ST	+	+	+

+ = positivo - = negativo **E** = elíptico **ST** = subterminal \*+ = > 50% de mortalidade larval igual a alta toxicidade

**Tabela 5:** Resultados das provas bioquímicas de *Bacillus thuringiensis* isoladas das distintas marcas de café torrado e moído.

<b>Provas Bioquímicas</b>	<b>1.1</b>	<b>3.1</b>	<b>4.1</b>	<b>10.1</b>	<b>1.2</b>	<b>3.2</b>	<b>4.2</b>	<b>10.2</b>	<b>1.3</b>	<b>2.1</b>	<b>2.2</b>
CIT	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ACE	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
NaCl 7%	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
ARA	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
MAN	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
TIR	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

**CIT** = Utilização do Citrato **ACE** = Produção de Acetil Metil Carbinol **NaCl 7%** = Crescimento em Cloreto de Sódio 7% **ARA** = Fermentação da Arabinose **MAN** = Fermentação da Manitol **TIR** = Hidrólise da Tirosina

Todas as cepas de *B. thuringiensis* isoladas apresentaram resultados positivos para: Hidrólise do Amido, Hidrólise da Caseína, Hidrólise da Lecitina, Produção de Catalase, Crescimento em Anaerobiose, Redução do Nitrato a Nitrito, Produção de Hemólise do tipo  $\beta$ , Crescimento em NaCl 5%, Fermentação da Glicose e Verificação da Oxidase.

Todas as cepas de *B. thuringiensis* apresentaram resultados negativos para: Crescimento em Diferentes Temperaturas: 40°C; 50°C; 55°C; 65°C, Fermentação da Xilose, Crescimento em NaCl 10% e Produção de Indol.

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, da família *Bacillaceae* que apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição e outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporos. Hoje, vários estudos têm sido realizados no esforço de utilizar o *Bacillus thuringiensis* no controle de algumas pragas de plantas, inclusive o grão do café.

Os novos bacilos isolados foram submetidos às provas fenotípicas próprias para o estudo taxonômico de bactérias do Gênero *Bacillus*. Nas tabelas 5 e 6 são apresentados os resultados referentes ao isolamento dos microrganismos do grupo *B. cereus* das diferentes amostras do café torrado e moído, bem como os testes microbiológicos e bioquímicos de confirmação e identificação.

Das 30 amostras analisadas, 25 cepas foram isoladas, dentre as quais, 14 (56%) foram positivas para a presença de *B.cereus*. Esse valor é maior do que: os achados de Gomes et al, 2004 que tiveram 20% das amostras de doces contaminadas por *B. Cereus*; os de Costa et al (2004), que obtiveram 17,3 % de amostras contaminadas por *B.cereus* em amostras de leite em pó integral.

No entanto, vale mencionar que, dentre as amostras analisadas, apenas uma foi apresentada isenta de sujidades. Tal amostra apresentou-se isenta de qualquer tipo de sujidade em todos os testes executados, levando-a a condição de controle dentre as demais.

A constatação de tal qualidade no mercado interno, ainda que, em apenas uma marca, evidencia o fato de que o Brasil tem plenas condições de produzir, fomentar e exigir dos seus produtores um café torrado e moído de boa qualidade. Caso isso venha ocorrer de modo generalizado, qualquer café comercializado no mercado interno poderia ser exportado, uma vez que todos se encontrariam também dentro dos padrões estabelecidos pelas legislações internacionais.

**Tabela 6 - Contagem e Isolamento das Linhagens de *Bacillus cereus* do Número de Células Viáveis por mg de Amostra de café torrado e moído**

<b>Lotes dos cafés torrado e moído</b>	<b>N<sup>o</sup> de amostras</b>	<b>Contagem Total de Microorganismos Produtores de Fosfolipase</b>	<b>N<sup>o</sup> de amostras com <i>B.cereus</i></b>
1°	10	10 <sup>3</sup> to 10 <sup>5</sup>	3
2°	10	10 <sup>4</sup> to 10 <sup>5</sup>	3
3°	10	10 <sup>2</sup> to 10 <sup>4</sup>	8

**Tabela 7:** Resultados das provas bioquímicas de *Bacillus cereus* isolados das distintas marcas de café torrado e moído

Cepas Isoladas	Provas Bioquímicas						
	ANI	CAT	ANA	NaCl 5%	NaCl 7%	TIR	MOB
<i>Bc 5.1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bc 6.1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bc 7.1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bc 5.2</i>	+	+	-	-	-	+	+
<i>Bc 6.2</i>	+	+	-	+	-	-	+
<i>Bc 7.2</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>Bc 5.3</i>	-	+	+	+	+	+	-
<i>Bc 6.3</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>Bc 7.3</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bc 2.3</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bc 3.3</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>Bc 4.3</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>Bc 5.3</i>	+	+	-	+	-	-	+
<i>Bc 10.3</i>	+	+	+	-	-	+	+

5.1- lote 1; 5.2 lote 2; 5.3 lote 3

**Legenda:** (+) = positivo (-) = negativo ANI = Hidrólise do Amido ANA = Crescimento Anaeróbico TIR = Hidrólise da Tirosina CAT = Produção de Catalase NaCl 5% e 7% = Crescimento em Cloreto de Sódio MOB = Mobilidade; *Bc* – *Bacillus cereus*

Todas as cepas de *B. cereus* isoladas apresentaram resultados positivos para: Utilização do Citrato, Hidrólise da Caseína, Hidrólise da Lecitina, Produção de Hemólise do tipo  $\beta$  e Verificação da Oxidase. Igualmente todas as cepas de *B. cereus* apresentaram resultados negativos para: Produção de Indol, Fermentação da Xilose, Crescimento em NaCl 10%, Fermentação da Arabinose e Fermentação do Manitol.

A solução de sal pode ser tóxica ao microorganismo dependendo da concentração e da tolerância que o microorganismo tem pelo sal. O crescimento de algumas bactérias é inibido às concentrações baixas como 2%, de cloreto de sódio, mas outras bactérias, leveduras e fungos são capazes de crescer dentro de uma larga margem de concentrações salinas elevadas, incluindo até o ponto de saturação. Esses microorganismos são denominados halotolerantes, por isso a importância de se realizar a prova bioquímica de NaCl 5% e NaCl 7% para o *B.cereus* (BENNETT, R. W.; BELAY, N, 2001).

Dentre as formas esporuladas, *B.cereus* destaca-se na indústria alimentícia como agente causador de toxinfecção alimentar, além de provocar grandes prejuízos econômicos, por ser um potencial deteriorante de alimentos (COSENTINO *et al.*, 1997). A literatura registra vários surtos envolvendo *B. cereus*. Um deles ocorreu na Romênia e atingiu 221 crianças, sendo o leite o veiculador da enfermidade (CHRISTIANSSON, 1992). De acordo com Becker e Wong. (1994), cerca de 18% dos casos de toxinfecção alimentar ocorridos entre 1985 e 1989 foram provocados por *B. cereus* e, na maioria desses casos, os alimentos envolvidos estavam contaminados com uma população pequena do microrganismo.

A alta proporção de positividade para *B.cereus* nas amostras de café é de extrema importância, pois o café torrado e moído é mundialmente consumido. Além disso, é comumente utilizado na fabricação de bolos, balas, que ficam expostos por longos períodos em temperatura ambiente, favorecendo não só a multiplicação microbiana, como também a produção de enterotoxinas.

A incidência desta contaminação, no que se refere ao café torrado e moído, pode estar relacionada ao fato de que os frutos e grãos de café estão sujeitos a sofrerem contaminação por bactérias em diferentes fases de desenvolvimento, da colheita ao preparo. Esses microrganismos encontram-se presentes no ambiente das lavouras, compreendendo desde a colheita, até o preparo e o armazenamento do café (MARTINS *et al* 2004).

Chalfoun e Carvalho (1989) relatam em seus estudos que a influência dos microrganismos na qualidade do café indica que o gosto ruim do café estava associado à comunidade microbiana presente no grão brocado do café.

Os microrganismos podem estar presentes naturalmente em todas as etapas de pré e pós-colheita do café, influenciando na qualidade final da bebida, seja pela degradação de compostos presentes nos grãos ou pela excreção de metabólitos. A incidência de microrganismos deve-se, principalmente, quando há a colheita de uma mistura de diferentes estágios de maturação e o processamento via seca, adotados em grande parte do Brasil, onde o produto sai direto da lavoura para ser secado com casca, ao natural, em terreiros ou secadores mecânicos (SALVA e LIMA, 2007).

As contaminações microbianas são geralmente favorecidas pela falta de cuidado durante as operações agrícolas, que podem comprometer a qualidade do produto final, principalmente em situações em que ocorre a secagem desuniforme dos grãos, grãos estes colhidos do chão ou que permanecem sob chuva durante a secagem (ANGÉLICO 2008).

## 6.2 – PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS

O presente trabalho assume uma importância ainda maior quando se verifica a capacidade enterotoxigênica dos isolados. A presença dos genes do complexo HBL e NHE foi analisada pela PCR com iniciadores específicos para cada gene que compõem as enterotoxinas.

Os resultados revelaram expressiva frequência desses genes de enterotoxinas nas cepas isoladas, que foram: *hblA* (57%); *hblC* (71%); *hblD* (64%); *nheA* (50 %); *nheB* (100%); *nheC* (64%), como observado na tabela 7 e figura 9.

**TABELA 8** - Análise da Presença de Genes das Enterotoxinas Através da Reação em Cadeia da Polimerase nas amostras de café torrado e moído

Cepas isoladas	Complexo HBL <sup>a</sup>			Complexo NHE <sup>a</sup>			Grupo	BCET-RPLA <sup>b</sup>
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>		Enterotoxina L <sub>2</sub>
<i>Bc</i> 5.1	+	+	+	+	+	+	I	+++
<i>Bc</i> 6.1	+	+	+	+	+	+	I	+++
<i>Bc</i> 7.1	+	+	+	+	+	+	I	+++
<i>Bc</i> 5.2	+	+	+	+	+	+	I	+++
<i>Bc</i> 6.2	+	+	+	+	+	+	I	+++
<i>Bc</i> 7.2	+	+	+	-	+	+	II	+++
<i>Bc</i> 5.3	+	+	+	-	+	+	II	+++
<i>Bc</i> 6.3	+	+	-	+	+	+	III	+++
<i>Bc</i> 7.3	-	+	+	+	+	-	IV	+++
<i>Bc</i> 2.3	-	+	+	-	+	-	V	+++
<i>Bc</i> 3.3	-	-	-	-	+	-	VI	-
<i>Bc</i> 4.3	-	-	-	-	+	-	VI	-
<i>Bc</i> 5.3	-	-	-	-	+	-	VI	-
<i>Bc</i> 10.3	-	-	-	-	+	+	VII	-

### 5.1- lote 1; 5.2 lote 2; 5.3 lote 3

<sup>a</sup> +, um produto de PCR do tamanho esperado; -, nenhum produto de PCR foi amplificado.

<sup>b</sup> +++, produção da enterotoxina diarréica; -, ausência de produção da enterotoxina diarréica.

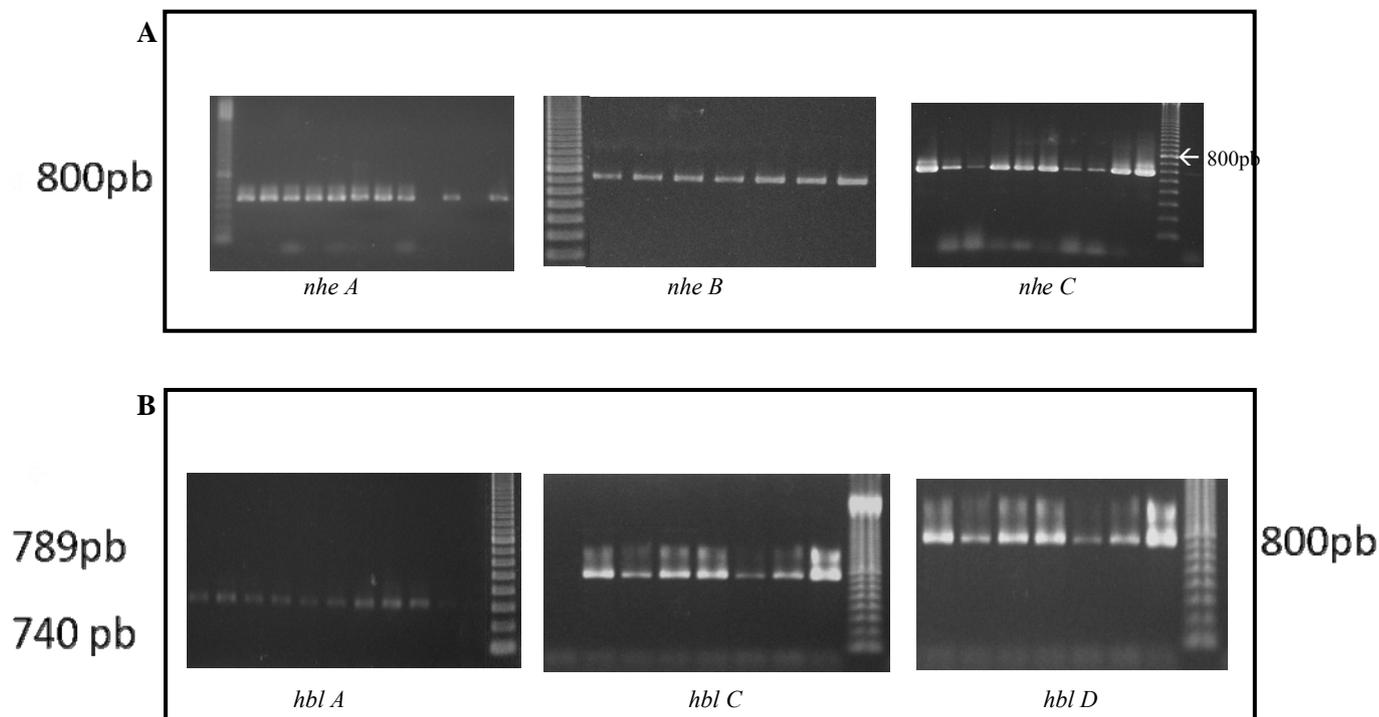
HANSEN & HENDRIKSEN (2001)

Grupo I: Positivo para os três genes HBL e os três de NHE

Grupo II: Positivo para os três genes de HBL e = para dois genes do NHE

Grupo III: Positivo para dois genes do HBL e três do NHE

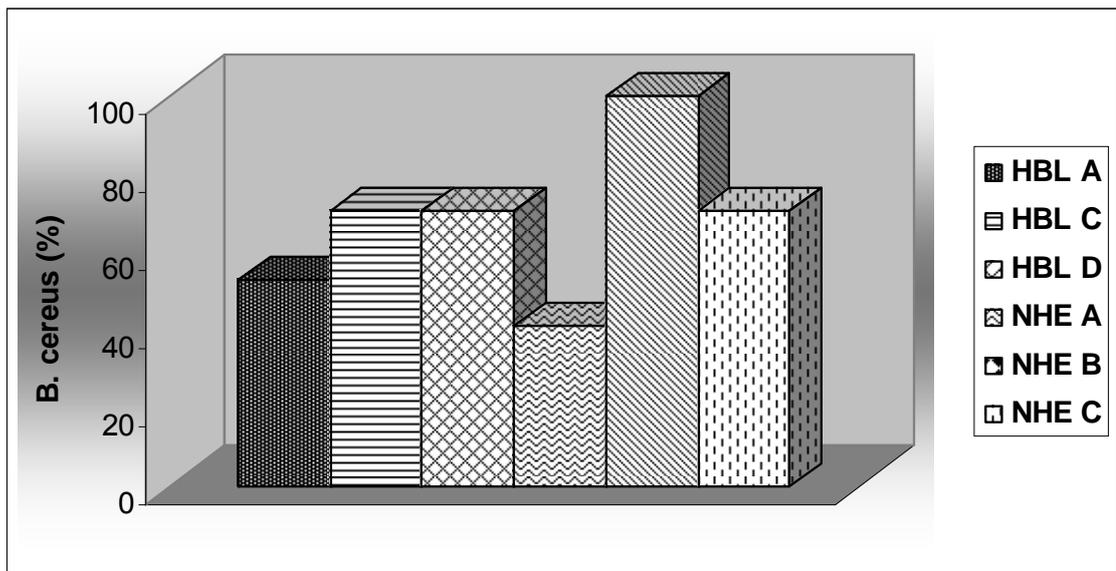
Grupo IV: Positivo para dois genes do HBL e dois do NHE  
Grupo V: Positivo para dois genes do HBL e um do NHE  
Grupo VI: Positivo para um gene NHE  
Grupo VII: Positivo para dois genes do NHE



**Figura 9:** Resultados representativos da PCR para as cepas isoladas de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. (A) Géis da PCR para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (codificadores da “enterotoxina não hemolítica”–NHE); (B) Géis da PCR para os genes *hblA*, *hblC* e *hblD* (codificadores da “hemolisina BL”– HBL).

A eletroforese de DNA em gel para a pesquisa dos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* demonstra que todas as estirpes analisadas amplificaram um único fragmento na reação de PCR, de dimensões de 800 pb, (Figura 9). O tamanho esperado do fragmento amplificado para o gene *hblA* era de 740 pb e para o gene *hblC* de 789 pb e de 800 pb, aproximadamente, para o *hblD*. Estes resultados confirmam assim, que todas as estirpes, consideradas positivas ou duvidosas mediante a análise do gel, são possivelmente positivas para os três genes.

A figura 10 mostra de forma clara a presença dos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* e dos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*, o que deixa claro a importância deste trabalho, uma vez que tais genes podem desencadear a produção de enterotoxinas no organismo do indivíduo.



**Figura 10:** Porcentagem de genes de HBL e NHE isolados de *B. cereus* em amostras de café torrado e moído.

A identificação dos principais locais como origens potenciais do microrganismo ou de seus esporos devem ser consideradas para evitar ou reduzir a contaminação dos alimentos na linha de processamento, como relatam alguns pesquisadores (GUINEBRETIERE E NGUYEN-THE, 2003). Neste trabalho, ficou evidente a importância do café torrado e moído como fonte de *B. cereus*.

As enterotoxinas HBL e NHE são atualmente apontadas como causadoras das infecções diarreicas por contaminação alimentar, devido ao *B. cereus*. Estas também possuem o gene *plcR* (regulador pleiotrópico) que atua como fator de virulência, pois contribui na lesão do tecido, induzindo a degradação dos neutrófilos.

Uma parte considerável das amostras analisadas apresentou valores acima de  $10^3$  UFC/g, o que é preocupante, principalmente pelo fato destes valores estarem na faixa requerida ( $10^4$  UFC/g a  $10^8$  UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para a produção de enterotoxinas; e em quantidades suficientes e necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar. Entretanto a dose infecciosa, estabelecida como limites superiores a  $10^5$ , é assim determinada para pessoas saudáveis, sendo que a mesma varia de acordo com as serovariedades, o tipo de produto alimentar e a susceptibilidade dos indivíduos. Varnam e Evans (1991) indicam como dose infecciosa mínima um valor tão baixo como 20 células, enquanto que outros estudos apontaram para uma ordem de grandeza  $>10^6$  células. Em se tratando de um indivíduo imunocomprometido, ou portador de doença de base, uma dose no valor de  $10^2$  já seria prejudicial à saúde deste indivíduo.

Os sintomas da síndrome diarreica causada por estas enterotoxinas são parecidos com os causados pelo *Clostridium perfringens*, onde o quadro clínico se manifesta por diarreia intensa, cólicas abdominais entre 8 e 16 horas, após o consumo de alimentos contaminados com grande número de *B.cereus*, em cerca de  $10^4$  células/g ou mL (GRANUM, 1997). Entretanto, já foram descritos casos de intoxicação, relatados por Becker e Wong (1994), onde continha-se cerca de  $1,2 \times 10^3$ .

Apesar das diferenças encontradas na detecção de enterotoxinas produzidas por *B. cereus* provenientes das amostras analisadas, fica clara a alta porcentagem de amostras que estavam contaminadas por esse microrganismo, colocando assim em risco a saúde pública. A alta positividade de amostras contaminadas por *B. cereus* enterotoxigênicos sugere a necessidade de melhorias higiênico-sanitárias em todo o processamento do café para evitar danos à população.

Os resultados demonstrados no presente estudo comprovam um elevado percentual de cepas de *B. cereus* enterotoxigênicos nas amostras avaliadas, o que serve de alerta para a indústria e autoridades sanitárias, pois as mesmas podem ser consideradas de risco à saúde da população consumidora, indicando a necessidade de melhorias na obtenção e transporte do café torrado e moído.

As linhagens de *B. cereus* que produzem NHE podem manifestar seus sintomas de forma branda apenas com os componentes  $L_1$  e B, porém, sua ação máxima, também se dá pela ação conjunta dos três componentes. Neste trabalho os resultados para os genes de NHE mostraram que 42,8% apresentaram os três componentes. Ainda analisando os resultados, pode-se comprovar que 35,7% das amostras apresentaram os três componentes do complexo HBL e NHE. A presença dos três genes que codificam as enterotoxinas tri-partidas HBL e NHE é requisito necessário para que ocorra a produção da toxina.

Os pesquisadores discordam quanto à forma como a síndrome diarreica se desenvolve, sendo esta atribuída à ingestão da toxina pré-formada nos alimentos, ou à ingestão de esporos ou células viáveis da bactéria. Vários autores creditam que a produção da mesma é mais intensa no intestino do que no alimento (GRANUM *et al* 1993). Segundo Granum *et al* (1993), a síndrome provavelmente é causada por ingestão de esporos e células viáveis, presente nos alimentos. Assim, através da colonização, logo depois da multiplicação no intestino delgado, estas produziram suficiente toxina para provocar a doença.

Desse modo, o café torrado e moído pode ter sido contaminado por diversas fontes de esporos de *B.cereus* incluindo o solo, esterco e equipamentos do processo de moagem, que podem permanecer no restante do processo, quando o tratamento térmico não for suficiente para destruir os esporos.

Das várias formas de tratamento térmico para o *B.cereus*, o cozimento em vapor sob pressão, a fritura e o assar em forno a temperaturas superiores a 100 °C permitirá a eliminação das células vegetativas. Contudo, parte dos esporos pode não ser eliminada, pois já se sabe que nem todos os esporos poderiam germinar ao mesmo tempo e que estes podem resistir a temperaturas superiores a 130°C (CLAVEL et al, 2004).

Por outro lado, o solo é um dos principais reservatórios e também veículo disseminador de *B.cereus*, também podendo ser encontrado em outros alimentos e ambientes. A microbiota do solo, concluiu que 1g de solo pode ter até 10<sup>5</sup> esporos *B.cereus* (PELCZAR et al; 1996). Este dado deixa claro para o presente estudo, que o contato com o mesmo durante a colheita do grão de café, através de coleta de grãos caídos no solo, torna-se fator importante pela presença de *B.cereus* no produto final, ou seja, o café torrado e moído, objeto deste trabalho.

Durante a torrefação, as células vegetativas do *B.cereus*, exceto algumas psicrotróficas, são destruídas. Dessa forma, a presença de *B.cereus* nas amostras analisadas poderia ser explicada tão somente devido aos esporos presentes no grão perfurado pela broca de café, concomitante com a entrada de microorganismos, neste caso, as cepas de *B.cereus* que sobreviveram, germinaram e cresceram no café torrado e moído.

A Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003 aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados, considerando que a obtenção de alimento seguro deve abranger toda cadeia produtiva, ou seja, da produção até o consumo. Leva-se em conta que a análise de matérias macroscópicas e microscópicas presentes nos alimentos deve ser baseada em aspectos relacionados ao risco à saúde; considerando a necessidade de estabelecer disposições gerais para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados.

Assim sendo, a resolução acima citada determina que vetores mecânicos sejam animais que veiculam o agente infeccioso desde o reservatório até o hospedeiro potencial, agindo como transportadores de tais agentes, carreando contaminantes para os alimentos, causando agravos à saúde humana mas, não são responsáveis pelo desenvolvimento de qualquer etapa do ciclo de vida do contaminante biológico. Além disso, matéria prejudicial à saúde humana é também aquela matéria detectada macroscopicamente e ou microscopicamente, relacionada ao risco à saúde humana e abrange: insetos, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos.

Com base nestes incisos, os resultados encontrados na presente pesquisa evidenciam a presença destes vetores mecânicos.

A broca-do-café, que uma vez infestando a cultura do grão do café acaba por permitir através da perfuração total ou parcial do grão a entrada de microorganismos como o *B. cereus* e este, por sua vez, carreando enterotoxinas que podem causar danos a saúde do consumidor.

Atualmente 46% das amostras (14 das 30 iniciais) estariam em desacordo com a RDC 175/2003, visto as mesmas apresentarem matérias estranhas, e estas representarem um risco potencial. Porém, sob a aplicação da legislação específica, a Portaria 377 de 26/04/1999, todas seriam satisfatórias, mostrando assim o impacto dos novos parâmetros na saúde do consumidor.

A política para alimentos da ANVISA sustenta-se nos seguintes pilares: - *“A ação deve ser no processo produtivo e não no produto final; - O produto final deve ser o termômetro para a adoção de medidas de intervenção; - O setor produtivo é o responsável pela garantia sanitária dos alimentos que fabricam”*.

Portanto, a qualidade total do alimento deve ser assegurada pelo setor produtivo. Porém, acredita-se que nem todos têm acompanhado as mudanças que vem ocorrendo, assim como implantado as “ferramentas” de garantia da qualidade, a fim de atender tal política e garantir produtos isentos de qualquer matéria macroscópica ou microscópica, seja ela prejudicial ou não.

Apesar da resolução RDC 12/2001 não possuir limites de tolerância para *B. cereus*, a realização das contagens desses microrganismos forneceu informações sobre a qualidade desses produtos, uma vez que as mesmas indicam as condições higiênicas tanto das matérias-primas, como do processamento e armazenamento. O controle dessa bactéria visa prevenir o seu desenvolvimento, uma vez que é difícil impedir a sua presença nas matérias-primas, em função da sua grande disseminação no meio ambiente, sendo o solo o seu reservatório natural e principal habitat.

Todavia, é indispensável o controle desta bactéria, uma vez que neste trabalho foi evidenciada a presença de suas enterotoxinas, mostrando assim, seu perfil toxigênico e, por conseguinte, seu risco potencial.

A fim de acompanhar a evolução da contaminação e avaliar a médio e longo prazo o impacto da RDC nº 175/2003 na aprovação dos inúmeros produtos alimentícios, torna-se necessário que sejam empreendidas pesquisas relacionadas aos aspectos sanitários do grão do café e que sejam fornecidos subsídios para posteriores discussões e ações ligadas ao tema. Com relação aos aspectos microbiológicos, a determinação de *B. cereus* em amostras de

café é importante, principalmente porque algumas espécies têm grande potencial toxigênico e a exposição humana a estas enterotoxinas, através de alimentos contaminados, é questão de saúde pública, o que reforça a necessidade da ANVISA rever a legislação atual (RDC nº 12/2001).

Atualmente, o Brasil tem buscado através da Instrução Normativa 16, instrução esta que terá alguns meses para ser aplicada, a garantia de produção de um café torrado e moído de qualidade, qualidade esta que deverá ser fiscalizada.

Para tanto, o café produzido no Brasil ou o importado só poderá ter, no máximo, 1% de impurezas. A presença de umidade no grão torrado ou moído também não poderá ultrapassar 5%. Ainda serão analisados o estado de conservação do produto, a aparência, o odor e as informações de rotulagem, como nome de fabricante, lote, prazo de validade e país de origem, quando for o caso.

A norma determina, também, critérios para características sensoriais do café: aroma, sabor, fragrância e sabor residual. Com bases nessas determinações, os resultados deste trabalho evidenciam que além destas, caberá também a exigência de que este café apresente-se também isento de microorganismos que possam ser capazes de produzir enterotoxinas prejudiciais a saúde do consumidor, pois vários estudos comprovam que a presença de bactérias, fungos, vírus, prejudica sabor, odor e fragância do café.

## 7 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, são feitas as seguintes conclusões:

- Comprovou-se a presença de *Bacillus cereus* em 46% das amostras de café torrado e moído.
- Apesar da legislação brasileira atual não estabelecer padrões para a contagem de *Bacillus cereus* em café torrado e moído, 14 amostras (46%) das 30 analisadas apresentaram-se contaminadas por esta espécie, com valores para as enterotoxinas, como descrito na literatura, considerados dose infectiva, a qual já seria suficiente para desencadear uma intoxicação alimentar.
- De fato, a análise de PCR é um método bem específico, porém ele determina os genes que podem vir a produzir as enterotoxinas. Assim sendo, a concomitância de métodos moleculares com métodos imunológicos tornar-se-á essencial para sobrevir uma detecção e confirmação efetiva da presença das enterotoxinas.
- Nesta pesquisa, verificou-se que o café torrado e moído apresentou elevada percentagem de estirpes de *B. cereus* potencialmente patogênicas. A presença deste microrganismo nesta bebida de consumo nacional pode estar relacionada com falhas nas Boas Práticas Agrícolas, pois de acordo com o conhecimento a cerca do *B.cereus*, sabe-se que é um constituinte normal do solo, contaminando com facilidade alimentos que estejam em contato direto com o mesmo.
- Os resultados deste estudo tornam-se, portanto, importantes, uma vez que fornecem novas perspectivas sobre a ocorrência e distribuição dos genes que codificam as enterotoxinas já no grão do café, contribuindo também para um melhor conhecimento da epidemiologia de *B. cereus*.
- Segundo Fermanian e Wong (1996), a hemolisina BL produzida por *B. cereus* é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2, as quais não são tóxicas individualmente, mas quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecróticas e citotóxicas para vários tipos de células e tecidos. Sendo, portanto o complexo HBL o maior fator de virulência. Assim sendo, 50% das amostras analisadas apresentaram os três componentes, comprovando assim sua virulência.
- Espera-se que os resultados deste trabalho possam servir de subsídios para que a legislação específica do café torrado e moído que vigora no Brasil, possa ser alterada. Assim como àquela que trata dos padrões microbiológicos possa ser alterada no sentido de adicionar à lista de microorganismos limites para a espécie *B.cereus* no produto em questão.
- Presença de *Bacillus thuringiensis* em 54% das amostras analisadas.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: [www.abic.com.br](http://www.abic.com.br)>. Acesso em 18 Jul. 2008
- AFONSO JÚNIOR, P.C.; CORRÊA, P.C.; GONELI, A.L.D.; SILVA, F.S. Contribuição das etapas do pré-processamento para a qualidade do café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, Especial Café, n. 8, p. 46-53, 2004.
- ANGÉLICO, C.L. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) em diferentes estádios de maturação e submetido a cinco tempos de ensacamentos antes da secagem**. 2008.149f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, lavras, MG.
- ALVES, E.; CASTRO, H.A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 4-7, 1998
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2<sup>a</sup>ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, dec. 1995
- ANDERSSON, A., GRANUM, P. E., & RONNER, U. (1998). The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 93-99.
- APHA (American Public Health Association). Microbiological monitoring of the food processing environment. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3th. ed., Washington. Chap. 3, p.51: 75. 2001
- ARNESEN, L. P. S., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Acedido em 23-07-2008, <http://www3.interscience.wiley.com/journal/120085025/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

- ATHIE, I.; PAULA, D.C. de. Insetos de grãos armazenados – aspectos biológicos e identificação. 2. ed. Sao Paulo: Varela. 2002. 244p.
- AZEVEDO, J. L. Engenharia Genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- BACHHIL, V. N.; JAISWAL, T. N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. **J. Food Sci. Technol.**, v. 25, n. 6, p. 371-372, Nov./ Dec. 1988
- BAPTIST J M, MANDEL,M & GHERMA R L.1978. Comparative zone eletrophoresis of enzymes in the Genus *Bacillus*. Int J Syst Bacteriol. 28:229-244.
- BALBANI,A.P.S.; BUTUGAN.O. **Contaminação biológica de alimentos**. REVISÃO E ENSAIO REVIEW AND ESSAY REVISIÓN Y ENSAIO 2001.
- BARRIOS, B.E.B. **Caracterização física, química, microbiológica e sensorial de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande – Sul de Minas Gerais**. 2001. 72 p.: il. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C., MIGUEL, O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. Rev. Educ. Contin. CRMV-SP, v.4, p.45-51, 2001.
- BECKER, H.; SCHALLER, G; WIESE, W.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 1-15, set. 1994.
- BEECHER, D.J.; MACMILLAN, J.D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.59,n.5, p.1778-1784, 1991.
- BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin immunoassay kits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4614-4616, dec. 1994.
- BEECHER, D.J. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4423-4428, 1995.

- BENEDICT, R. C.; PARTRIDGE, T.; WELLS, D.; BUCHANAN, R. L. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 211-214, mar. 1993.
- BERG, R. W.; SANDINE, W. E. Activation of bacterial spores. A review. **Journal Milk Food Technology**, v.33, p.435-441. 1970.
- BENNETT, R. W.; BELAY, M. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup>, American Public Health Association, cap. 32, p. 311-316, 2001.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M. et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.70, p.59-68, 1997.
- BIOCHER, J. C. e BUSTA, F. F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, v.37, p.87-89. 1983.
- BHUNIA, A. K. (2007). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In A. K. Bhunia (Eds.) *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*; (1<sup>a</sup> Edição). (276). Springer.
- BITANCOURT, A.A. **O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida**. O Biológico, São Paulo, 2001, vol. 23, n. 1, p. 1-11.
- BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S.M.; REYNAUD, D.T.; GABARDO, J.; VALASKI, J.C.; MARANGONI, P.B.; PIMENTEL, I.C. Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 529-534, 2009.
- BORGE, G. A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P. E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 237-246, sept. 2001.
- BUGNO, A.; BUZZO, A.A.; NAKAMURA, C.T.; PEREIRA, T.C.; MATOS, D.; PINTO, T.J.A. **Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais**. Revista Brasileira de

- Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 41, n. 4, out./dez., 2005.
- BURDON K.L. 1946. **J Bacterio**. 52:665-678.
  - BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 7ª ed, 2005.
  - BRASIL, Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde - Aprova Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.
  - BRASIL, Resolução RDC nº 175 , de 08 de julho de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde - Aprova o regulamento técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas prejudiciais a Saúde Humana em alimentos embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de julho de 2003.
  - BRASIL. Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999. Institui normas básicas de alimentos. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 abr. 1999.
  - BRASIL. **Portaria n ° 451, de 19 de setembro de 1997**. Institui Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, Poder Executivo, Brasília, 19 de setembro de 1997.
  - BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus Thuringiensis*: Mecanismos and use In:\_\_\_\_\_. Comprehensive molecular inset science. Amsterdam:Elsevier BV, 2005. p.175-206.
  - CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

- CARVALHO, V.D.; Chagas, S.J.R.; Souza, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 2005, v.18, n.187, p.5-20.
- CARVALHO, V.D. 1997. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade - qualidade do café.**
- COSTA, F.N, OLIVEIRA, E.M, BORGES, R.G. **Ocorrência de bactérias da espécie *Bacillus cereus* em amostras de leite em pó integral obtidas no comércio varejista da cidade de São Luís, MA.** Hig. aliment; 18(121): 104-107, jun. 2004.
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. de. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas do preparo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 15., 1989, Maringá, PR. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989, p. 17-21.
- CHALFOUN, S.M.; PARIZZI, F.C. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: BORÉM, F.M. **Pós-colheita do café.** Lavras: UFLA, 2008. cap. 14, p. 512-54.
- CLAUS D & BERKELEY RCW. Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986, vol. 2, 1104-1139p.
- CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C., & SCHMITT, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 214-219.
- CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 79-87, 1993.
- CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.275, p.30-35, 1992.

- CHILCOTT, C. N.; WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 244-247, 1993.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest management science, Sussex*, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.
- COSENTINO, S.; MULARGIA, A.F.; PISANO, B. et al. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, v.38, p.235-238, 1997.
- DAMGAARD, P.H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.23-40.
- DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review Genetics, Palo Alto*, v. 37, p. 409-433, 2003.
- DELAZARI, I. **Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves**. In: *Semana Acadêmica Veterinária*, 8., 1998, São Paulo. *Anais*. São Paulo: 1998. p.71-77.
- DOYLE, M. P. *Bacillus cereus*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.199-200, 1988
- DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, oct. 1993.
- EDWARDS, P.R, EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae** 3ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co, 1972.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. & SCHERER, S. (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness.

- EMBRAPA – CAFÉ. Disponível em:<  
[http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/relatorio\\_gestao.htm](http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/relatorio_gestao.htm)>. Acesso em 24 Jul.2008.
- EDWARDS K.; JONHSTONE C.; THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucl. Acid Res.**, 19- 1349, 1991.
- EVANS, J. A.; RUSSEL, S. L.; JAMES, C.; CORRY, J. E. L Microbial contamination of food refrigeration equipment. **Journal of Food Engineering**, v.62, n. 3, p. 225-232, may 2004.
- ERLICH, H.A. **PCR: technology: principles and applications for DNA amplification**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1992.
- FERMANIAN, C.; LAPEYRE, C.; FRÉMY, J. M.; CLAISSE, M. Production of diarrhoeal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 345-358, july 1996.
- FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved *in vitro* detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FRANCO, G. M. B.; Landgraf, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo.: Editora Atheneu, 1996, cap.4, p. 33-81.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. cap. 4, p. 41-43.
- FRITZE, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Acessada em 12/08/2009  
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245?cookieSet=1>.
- GALLO, D; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, S. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p

- GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L. F., eds. **Foodborne Infections and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.
- GUINEBRETIERE, M.H.; NGUYEN-THE, C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurised zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.43, n.2, p.207-215, 2003.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 2000.
- GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W. M.; KIM, H. U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 35, n. 4, p. 213-226, 1972.
- GOMES.L.P.; RODRIGUES M.M.; SOARES.G.; BARONI.F.A.; SOUZA.M.M.S. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de seropédica e itaguaí – Rj. Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida. Seropédica, RJ, EDUR, v. 24, n.2, Jul.-Dez., p.181-184, 2004.
- GORDON R E, HAYNES W C & PANG C H N. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook n° 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- GORE, H.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. Real-time molecular beacon NASBA reveals HBLc expression from *Bacillus* spp. In milk . Biochem. Bioph. Res. Com., v. 311, p. 386-390, 2003.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Bacteriology, 1994, v.76, p.61S-66S.
- GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L.R. MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 327–336.

- GRANUM, P. E, BAIRD-PARKER, T. *Bacillus* species. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. **The microbiological safety and quality of food.** Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000. Vol. II. Chap. 39, p. 1029-1039.
- GRANUM, P. E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 269-279, feb. 1993
- GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 2, p. 223-228, dec. 1997.
- Granum, P. E., O' Sullivan, K., & Lund, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 177, 225-229.
- GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 9, p. 790-792, sep. 1990.
- GRIFFITHS, M. W. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 275, p.36-39, 1992.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS. IN: **Controle Microbiano de Insetos.** Editado Por S.B. Alves. 2. Ed. Fealq, Piracicaba, 1998. p. 383-446.
- HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 185-189, jan. 2001.
- HANSEN BM, DAMGAARD PH, EILENBERG J, & PEDERSEN JC (1998) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J Invertebr Pathol*, **71**: 106–114.
- HANSEN BM, DAMGAARD PH, EILENBERG J, & PEDERSEN JC (1996) *Bacillus thuringiensis*, ecology and environmental effects of its use for microbial pest control

- (Environmental Project No. 316). Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency.
- HARRIS H & HOPKINSON D A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Elsevier Science Publish, New York.
  - HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North- Holland, 1976.
  - HARWOOD. CR & CUTTING S.M. **Molecular Biological Methods for *Bacillus***. Wiley e Sons Ltda, West Sussex, England; 1990. 65p.
  - HEALTH PROTECTION BRANCH. **Guidelines for the general cleanliness of food: an Overview (Hpb)**. Ottawa, Ontario, 1999. 9p.
  - HEINRICHS, A.H. et al. Molecular cloning and characterization of the HBLA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v.175, p.6760- 6766, 1993.
  - HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Inseticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Review, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.
  - HUSMARK, U.; SIK, U. R. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. The Journal of Applied Bacteriology, v. 69, n. 4, p. 557-562, oct. 1990.
  - ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego: Academic Press, 1995. 253 p.
  - JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness - an update. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 2, p. 145-153, feb. 1983.
  - JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 286-287, 1983

- JÄÄSKELÄINEN, E. (2008). Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. Department of Applied Chemistry and Microbiology - Division Microbiology. Helsinki, University of Helsinki: 74.
- JAY, J. M. (2005). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In J. M. Jay (Eds.) *Modern Food Microbiology*, (6ª Edição). (720). Springer.
- KNIEHL, E., BECKER, A. AND FORSTER, D. H. (2003). Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *Journal of Hospital Infection* 55, 33-38.
- KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K., HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n.2, p. 189-198, feb. 2000.
- KUSKE, C. R., BANTON, K. L., ADORADA, D. L., STARK, P. C., HILL, K. K. & JACKSON, P. J. (1998). Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(7), 2463-2472.
- LAGO.N.C.M.R.;ROSSI.O.D.;VIDAL MARTINS.; AMARAL.L.A. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.
- LI, CARREL, J. J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature*, London, v. 353, n. 6.347, p.815-821, 1991.
- LINDBACK, T., FAGERLUND, A., RODLANDT, M. S., & GRANUM, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* NHE enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-3967
- LUND, T.; GRANUM, P.E. Characterisation of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v.141, n.2-3, p.151-156, 1996.

- LUTHY P., WOLFERSBERGER, M.G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In CHARLES J.F., DELECLUSE A., NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds.) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers, 2000. p.167-180.
- MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.
- MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A Rapid PCR-Based DNA Test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.5, p. 1634-1639, May 1998.
- MARTINS. H. M, MARTINS. M. L, BERNADO, F. **Caracterização microbiológica e detecção de aflatoxina e de ocratoxina A em grãos de café torrados, comercializados em Portugal. 2004**, Revista de Ciências Agrárias. Lisboa, Portugal.
- MARTIN, P.A.; TRAVERS, R.S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.55, n.10, p.2437-2442, 1989.
- MEADOWS MP, ELLIS DJ, BUTT J, JARRETT P, & BURGESS HD (1992) Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol*, **58**(4): 1344–1350.
- MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1535-1541, oct. 2001
- MONNERAT, R; BRAVO A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO IS, AZEVEDO JL, (eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. p.163.
- NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, Reading, v. 84, p. 51S-61S, 1998 (Supplement Symposium).

- ODOMERU, J. A.; TONER, A. K.; MUCKLE, C. A.; GRIFFITHS, M. W.; LYNCH, J. A. Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 30, n.11, p.1391-1393, 1997.
- PELCZAR J.M; CHAN S.C.E; KRIEG R.N. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Editora Afiliada, 1996. v. 2, p. 306-311.
- PEREIRA, M. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. C.; PRADO, J. C. A. Contagem, isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em condimentos preparados, utilizados em embutido cárneo (mortadela). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 137-140, set.-dez. 1999.
- PIELAAT, A., WIJNANDS, L. M., TAKUMI, K., NAUTA, M. J., & VAN LEUSDEN, F. M. (2006). *The fate of Bacillus cereus in gastro-intestinal tract*: National Institute for Public Health and Environment.
- PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: SONESHEIN, A. L., HOCH, J. A.; LOSIK, R. (ed.). ***Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria***. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993. p. 3-16.
- PRÜSS, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5436-5442, dec. 1999.
- RABINOVITCH, L; VICENTE MMA; GUAYCURÚS TV; FREITAS JPGV & MESQUITA RP.. Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , 1985, 80(1):1-9.
- RADHIKA, B.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A.; KESHAVA, N. and VARADAJ, M. C. Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, V. 74, p. 131-138, 2002.

- RYAN, P.A. et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v.179, n.8, p.2551-2556, 1997.
- RAJKOWSKI, K. T. & BENNETT, R. W. (2003). *Bacillus cereus*. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds.) *International Handbook of Foodborne Pathogens*, (1ª Edição). (688). CRC
- RESENDE, J. R.; CARVALHO, V.D.; COSTA, L.; LEITE, I.P.; BARROS, E. B. *XIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, Poços de Caldas-MG, 1997.
- REZENDE, N.C.M.; ROSSI JR., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo de *Bacillus cereus* em leite UHT integral (Ultra-High-Temperature). *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.7, p.162-166, 2000.
- ROBINSON, R.K.; PHILL, M.A.D. *Microbiologia lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1987, p. 18-32.
- RUSUL, G.; YAACOB, N. H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin usin TECRA - VIA and BCET - RPLA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 131-139, apr. 1995.
- SALLUM Jr,B. **Capitalismo e Cafeicultura: Oeste Paulista: 1888-1930**. São Paulo, Duas Cidades, 1982.
- SALVA, T.J.G.; LIMA, V.B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O agrônomo**, Campinas. v.59, n.1, p. 57-59, 2007.
- SANTOS, D. F. S. **Estrutura, conduta e desempenho do mercado exportador brasileiro de café em grão e de café solúvel**. Dissertação (Mestrado). Viçosa, MG: UFV, 1996.
- SANTOS BS. 2000. **Estudo de doze sorovares de *Bacillus thuringiensis***: Atividade larvicida, Curva de crescimento, Determinação da Presença de Genes CRY 4A/B utilizando a PCR e Variabilidade Genômica. Observada por AP-PCR. MSC. Thesis, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 131p.

- SCHOENI, J. L., & WONG, A. C. L. (2005). Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, 53, 159-167.
- SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café (Coffea arabica L.) processados por via seca nas fases pré e pós-colheita**. 120p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 2000.
- SILVA, N, JUNQUEIRA, V.C. A, SILVEIRA, N.F.A. 1997. **Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 295p.
- SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2<sup>o</sup>ed. Livraria Varela, 1997, 385 p
- SMITH RA & COUCHE GA (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Appl Environ Microbiol**, 57: 311–315.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SHINAGAWA, K. Analytical methods of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, **Int. J. Food Microbiol.**, v. 10, p. 125-141, 1990.
- SHINAGAWA, K. Serology and characterisation of toxigenic *Bacillus cereus*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 89-103, 1993.
- SOARES, C. M. ***Bacillus cereus* produtores de toxinas diarreicas em serviços de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos**. Campinas, 2004. 150 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2004.
- SOUZA, C.M.O.C.C, ABRANTES, S.M.P & CAVADOS. C.F.G. **Avaliação dos Parâmetros Microscópicos do café torrado e moído interno e externo e Detecção da**

- Presença de *Bacillus cereus*.** Revista Brasileira de Vigilância Sanitária. São Paulo. Vol. 1. n.1, p. 16-21. 2005.
- SOUZA, S.M.C. DE & CARVALHO, V.L. de **Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1997, vol. 18, n. 187, p. 21-26.
  - SOUZA, C.M.O.C.C. **Avaliação dos Parâmetros Microscópicos do café torrado e moído interno e externo e Detecção da Presença de *Bacillus cereus*.** Dissertação de Mestrado, p.93. 2005.
  - SOUZA, C.M.O.C.C, ABRANTES, S.M.P & CAVADOS. C.F.G. **Investigação física química e microscópica de contaminantes em amostras de café torrado e moído comercializado no varejo.** Revista Higiene Alimentar. , v.16, p.4 - 114, 2003.
  - STADHOUDERS. J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.275, p.15-18, 1992.
  - VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W.; Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico In: MELO, I. L.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico.** Embrapa. Jaguariúna, p.102-225. 1998.
  - VALERO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, L. A.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 491-499, oct. 2002.
  - VAUGHN, R.H.; CAMARGO, R.; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G. GEDEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v.12, p.12-57, 1958.
  - VARNAM.A.H, EVANS, M.G, Foodborne Pathogens-An illustrated Text. Ch 14. Wolfe Publishliing Ltd. London; p. 313-326,1991.

- VASCONCELOS FJM & RABINOVITCH L. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food. *J. Food Microbiol.* 1994; 58(3): 235-238.
- VIDAL-MARTINS, A. M. C., ROSSI, O.D., REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra-alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.
- YAMAMOTO. T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE. A.; NIELSEN-LE ROUX . C. (Ed). *Etmopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Netherlands: kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.
- WIJNANDS, L., DUFRENNE, J., & LEUSDEN, F. v. (2005). *Bacillus cereus: characteristics, behaviour in the gastro-intestinal tract, and interaction with Caco-2 cells*: National Institute for Public Health and Environment.
- ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F.X. PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. **Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças**. In: Ribeiro do Vale, F.X.; Zambolim, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas** Viçosa: Departamento de Fitopatologia; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, v.2, p83-179, 1997.
- ZAHNER V, MOMEN H, SALLES C A & RABINOVITCH L. 1989. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl Bacteriol.* 67:275-283.
- ZAHNER V, 1992. Análise isoenzimática de algumas espécies entomopatogênicas de *Bacillus*. [Dissertação de Mestrado- Instituto Oswaldo Cruz].

## ANEXO: ARTIGO PUBLICADO - SBCTA

Detection of enterotoxins produced by *B. cereus* through PCR analysis of samples of roasted and ground coffee from the city of Rio de Janeiro

Cyllene de Matos Ornelas da Cunha Corrêa de Souza<sup>1/+</sup>; Shirley de Mello

Pereira Abrantes<sup>2</sup>

<sup>1/+</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA Rodovia BR 465, km 7 Seropédica -RJ CEP: 23.890-000 <sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde – INCQS Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

### Abstract

Coffee is one of the most appreciated drinks in the world. Coffee grounds are obtained from the fruit of a small plant that belongs to the genus *Coffea*. *Coffea arabica* and *Coffea canephora robusta* are the two species of highest commercial importance. They are more commonly known as arabica and robusta, respectively. Two-thirds of *Coffea arabica* plants are grown in South and Central America and Eastern Africa (the place of origin for this coffee species). Contamination with microorganisms has been a major factor affecting coffee quality, due to the method of harvest adopted in Brazil. Brazilian harvests are based on mixing fruits collected from the ground with those that fall on cloths. As the *Bacillus cereus* bacterium frequently uses soil as an environmental reservoir, it is easily capable of becoming a contaminant.

In the current study, microbiological analysis and polymerase chain reaction (PCR) analysis of the toxicogenic profile of isolated strains were used to evaluate *B. cereus* contamination in commercial samples of ground and roasted coffee in the city of Rio de Janeiro.

**Key words:** *Bacillus cereus*, NHE, HBL, coffee

## Introduction

*Bacillus cereus* is a Gram-positive bacterium that can live in both anaerobic and aerobic conditions. *B. cereus* is also mesophilic and produces at least two types of toxins that are important in the symptomatology of food-borne illnesses: diarrheic (heat-labile) and emetic (heat-stable) toxins. These bacteria can be found in a variety of foods, such as meat, fish, milk and its derivatives, and raw foods, including fruits and vegetables (Harmon et al. 1992), both dry and processed (Doyle 1998).

It is difficult to eliminate microorganisms from the industrial environment (Bryan et al. 1992), because many spores are able to survive at different temperatures and pH levels. Spores are often resistant to dehydration and irradiation and present a notable capacity of adherence to food surfaces.

*B. cereus* is frequently isolated from uncooked and unprocessed products, such as rice, condiments, vegetables, meat, and milk products. This microorganism is associated with two food-borne illnesses, called “emetic syndrome” and “diarrheic syndrome.” Its colonies can be identified by their irregular morphology; they are albescent and generally shiny. *B. cereus* uses glucose as a carbon source, instead of mannitol, arabinose, or xylose, and is able to hydrolyze starch and gelatin. It is positive for lecithinase and exhibits hemolytic activity and resistance to ampicillin (Agata et al. 2002).

*B. cereus* secretes a set of extracellular enzymes and toxins that are considered important factors for its pathogenicity. Two enterotoxins, HBL and NHE each formed by three components, are currently considered to be the main agents of diarrheic infection in food poisoning cases caused by *B. cereus*. Hemolytic activity, cytotoxicity and vascular dermonecrosis, together with permeability and fluid accumulation in rabbit ileal loops, are symptoms associated with the enterotoxins detected in filtered cultures of toxigenic *B. cereus* strains (Beecher et al. 2001).

The hemolysin BL (HBL) is composed of a binding component (B) and two lytic components, L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>, transcribed from the genes *HBLA*, *HBLD*, and *HBLC*, respectively. All three genes are required for maximal activity. The NHE complex is also composed of three different proteins, NHEA, NHEB, and NHEC, encoded by the three genes *NHEA*, *NHEB*, and *NHEC* (Granum et al. 1999). In both cases, the genes for each toxin's three components are found as an operon.

The noNHEmolytic enterotoxin (NHE) is the second three-component enterotoxin responsible for diarrhea caused by *B. cereus* food poisoning. NHE is composed of NHEA, NHEB, and NHEC. The three genes encoding the NHE components constitute an operon. The hemolytic enterotoxin, HBL, is encoded by the *HBLCDA* operon and is composed of three protein components, L1, L2, and B. The B component mediates binding; L1 and L2 are lytic components. This toxin also has dermonecrotic and vasculature-permeabilizing activities and causes fluid accumulation in rabbit ileal loops (Tsen et al. 2000).

*B. cereus* contamination of roasted and ground coffee may occur due to the presence of the strain in the soil, where it adheres to coffee plants. Due to its ability to sporulate, *B. cereus* can survive the roasting process (Lund et al. 1996). The infectious dose of *B. cereus* ranges from 10<sup>4</sup> to 10<sup>11</sup> cells per gram of food. The exact value depends on a number of factors, including the presence of viable cells or spores in the food, the amount of enterotoxin(s) produced, and the susceptibility of the target population (Beecher et al. 1995).

It is believed that all individuals are susceptible to *B. cereus* food poisoning; however, more severe symptoms have been associated with young adults and the elderly (Ghelardi et al. 2002).

In a previous analysis based on 30 collected samples, representing all commercial roasted and ground coffees in Rio de Janeiro, the presence of *B. cereus* was detected in 85% of the analyzed samples (Souza 2005) These results highlight the necessity for measuring the occurrence of *B. cereus* in coffee, as this product represents a potential

means of dissemination for a microorganism already known to be involved in cases of food poisoning. Detection of enterotoxins from *B. cereus* is critical in order to effectively evaluate the risk that this species poses to public health.

## **Materials and methods**

### **Sampling**

Ten different brands of roasted and ground coffee were analyzed. Three different samples of each brand were collected for analysis. The isolation of viable cells from the samples and their subsequent quantitation were performed as described (Vasconcellos and Rabinovitch 1994). Cytomorphologic, biochemical, and physiologic identification was carried out according to the protocols of Gordonet et al. and Claus and Berkeley (1986).

### **Isolation and enumeration of *B. cereus sensu lato* strains**

The method described by Speck (1984) was used for isolation of contaminants from ground and roasted coffee. First, 1 g of ground and roasted coffee was homogenized in an Erlenmeyer flask containing 10 mL of phosphate buffer (pH 7.0). After homogenization, 2 mL of the suspension was transferred to a 10-mL sterile tube and heated at 65°C for 5 minutes. After cooling, 1 mL was transferred to a 10-mL test tube containing 9 mL of sterile, distilled water, and 3 serial ten-fold dilutions were generated.

Detection and enumeration of cultured bacteria were performed by plating on selective solid medium. VRM medium, which allows for visualization of the hydrolysis of egg lecithin, was designed by Vasconcellos and Rabinovitch (1995) and has been adopted by the Laboratório de Fisiologia Bacteriana as a selective medium for the *B. cereus* family. Cultures were incubated at 33°C for 24 h, at which time many colonies were surrounded by cloudy haloes, caused by the hydrolysis of lecithin. These colonies were pale pink, in contrast to the more intense pink that characterizes the rest of the medium. They were considered to be positive for lecithinase activity and were subsequently enumerated.

The number of lecithinase-positive *B. cereus sensu lato* colonies was calculated based on viable spore counts, and the results were expressed as colony forming units (CFU) per gram of analyzed sample. Only colonies without parasporal crystalline inclusions (visible under phase-contrast microscopy) were classified as *B. cereus sensu stricto*, whereas those with parasporal crystalline inclusions were determined to be *B. thuringiensis*.

Positive colonies from each sample were then streaked onto nutrient agar and were subsequently confirmed to be *B. cereus s.s.* by phenotypic testing. They were then streaked in nutrient agar slants and refrigerated as pure cultures.

#### Phenotypic identification and confirmation of strains as *B. cereus sensu stricto*

Isolates of *B. cereus s.s.* were identified by Gram staining, hemolytic activity, and specific biochemical, physiologic, and cytomorphologic tests for taxonomic studies of bacteria belonging to the genus *Bacillus*, according to the protocols of Gordon et al. (1973), Gibson and Gordon (1974), Claus and Berkeley (1986), and Vasconcellos and Rabinovitch (1995).

#### Detection of the hemolysin BL enterotoxin

Hemolysin BL (HBL) enterotoxin production was assessed by detection of the L<sub>2</sub> lytic fraction of the HBL complex, using the *B. cereus* Enterotoxin Reverse Passive Latex Agglutination test kit (BCET-RPLA, Oxoid), according to manufacturer's instructions. This test allows for the detection of the toxins as soluble antigens in an agglutination assay.

#### Production of diarrheal enterotoxins in bacterial cells

*B. cereus* strains were inoculated in 3 μL of Heart Infusion Broth (Oxoid) supplemented with 1% glucose (HIB broth) and incubated at 33°C ± 1°C for 4 h. After this

period, 100  $\mu$ L was inoculated into 25 mL HIB, incubated at  $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , and agitated at 175 rpm for a period of 18 to 20 h. Finally, each strain was centrifuged at 2200 rpm for 20 min at  $10^{\circ}\text{C}$ . The centrifuged material (both pellets and supernatants) were kept under refrigeration until use.

Microplates for microagglutination were organized in rows consisting of eight wells. Two rows were used for each sample. Using a micropipette, 25  $\mu$ L of diluent (TD 954) was dispensed into each well of 2 rows, except for the first well in each row. Next, 25  $\mu$ L of the sample to be tested was added to the first and second wells of both rows. Starting at the second well of each row, 25  $\mu$ L was pipetted and diluted two-fold into the next well in the row. This process was continued along each row through the seventh well; the last well contained only diluent.

Each well in the first row received 25  $\mu$ L of sensitized latex (TD 951), and each well in the second row received 25  $\mu$ L of latex control (TD 952). Manual agitation was used to homogenize the content of each well. To avoid evaporation, plates were covered. Inoculated plates were left undisturbed on a vibration-free surface at room temperature. After 24 h, wells in each row were examined for agglutination against a black background. The amount of enterotoxin produced was determined using index values derived from the Oxoid reading scale.

#### Polymerase chain reaction (PCR) analysis of enterotoxin genes

All strains were tested for the presence of the *HBLCDA* and *NHEABC* genes with primers designed by Hansen and Hendriksen (22), as listed in Table 1. Total genomic DNA for PCR analysis, extracted by boiling, was prepared from overnight cultures of *B. cereus* isolates in Luria-Bertani medium, as described by Nunes et al. (23). PCR amplifications were performed in an MJ Research thermocycler with PCR conditions as follows: a single denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min, 30 cycles with denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  (*HBLA*, *HBLD*, *NHEA*, and *NHEC*) or  $50^{\circ}\text{C}$  (*HBLC* and *NHEB*) for 45

seconds, extension at 72°C for 30 seconds, and a final extension step at 72°C for 4 min. Each 25- $\mu$ L reaction mixture contained 200  $\mu$ M dNTP mix solution, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng of template DNA, 0.5  $\mu$ L of each primer, and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). *B. cereus* ATCC 14579 was used as positive control. Amplicons were electrophoresed in 1.5% agarose gels in Tris-borate EDTA buffer (0.5X TBE; 89 mM Tris-borate, 2 mM, EDTA, pH 8.0) at 90 V for 35 min. Products were visualized under ultraviolet light after 10 min of treatment with 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide solution. As a reference, a 100-bp DNA ladder (Amersham Pharmacia Biotech) was used.

## Results

To assess the level of ground and roasted coffee contamination by *B. cereus s.s.*, were analyzed 30 samples from 10 distinct manufacturers using viable spore counting analysis. Although the occurrence of *B. cereus* in the ground and roasted coffee was relatively high (46%), the bacterial counts of *B. cereus* isolates in samples were low. As shown in Table 2, the average numbers of *B. cereus s.l.* in ground and roasted coffee ranged from  $10^2$  to  $10^5$ CFU/g. Isolated colonies of *B. cereus s.s.* were initially identified based on their lecithinase-positive morphology on plates, their cellular appearance as viewed by light microscopy, and their production of subterminal and cylindrical spores. Table 3 presents the identification parameters obtained by phenotypic tests. Nevertheless, some strains demonstrated characteristics different from the reference strain *B. cereus* ATCC 14579. For example, some isolates showed phenotypes distinct from the reference strain in terms of growth in Nutrient Broth containing 5% and 7% NaCl and acetyl-methyl-carbinol production (Voges-Proskauer reaction). All the isolates were  $\beta$ -hemolytic, but three isolates did not decompose L-tyrosine.

The production of selected protein component ( $L_2$  lytic fraction), and the presence of selected genes encoding proteins involved in *B. cereus*-related diarrhea are listed in Table 3. According to the presence of various enterotoxin genes, the 14 *B. cereus s.s.* isolates could be divided into 7 groups. All six genes were detected in group I. Groups II and III did not contain *NHEA* and *HBLA*, respectively. The *HBLA* and *NHEC* genes were not detected in group IV. Group V did not contain the *HBLA* and *NHEAC* genes, while groups VI and VII both lacked *HBLCDA* as well as *NHEAC* and *NHEA*, respectively.

The presence of six enterotoxigenic genes was detected by PCR in all *B. cereus* isolates. Of the 14 total strains, 100% were positive for at least 1 enterotoxin gene; 35% were positive for the 3 genes encoding the HBL complex; 35.3% (6/17) were positive for the 3 genes encoding the NHE complex; and 35% (5/17) were positive for all enterotoxigenic genes

(Figure 1). The 14 isolates characterized as *B. cereus s.s.* were also tested for diarrheal enterotoxin production; (Table 3).

The occurrence of each enterotoxin gene in the *B. cereus s.s.* isolates was: HBL A (57%); HBL C (71%); HBL D (64%); NHE A (50 %); NHE B (100%); NHE C (64%) and *NHEB* was detected in all isolates analyzed (Figure 2).

These results showed that all strains examined possess genes or protein components for toxins involved in human diarrheal disease. The consequence of this finding in terms of food safety regulations remains to be evaluated. .

## **Discussion**

The results described in this report may have relevant consequences. They may lead to the re-evaluation of levels of tolerance for the presence of *B. cereus* in roasted and ground coffee. Until now, there is no tolerance limits established for *B. cereus* in coffee, despite the potential of this bacterium to cause foodborne illness.

The microbiological parameters defined by Brazilian legislation on January 2<sup>nd</sup>, 2001 (RDC n°12, Brasil 2001) did not establish tolerance levels for *B. cereus s.s.* in roasted and ground coffee. However, they established limits for other similar foods, such as tea (Mate, *Ilex paraguariensis*). In the RDC n°175 of July 8<sup>th</sup>, 2003 (Brasil 2003), samples from foods carrying *B. cereus* or other microorganisms were at least unsatisfactory, since these microorganisms can cause serious health problems. In the present study, the average counts of *B.cereus*-like bacteria detected in samples of ground and roasted coffee revealed presence of this pathogen in 14 out of 30 analyzed samples (incidence of 46%). It should be emphasized that Brazilian legislation (Brasil 2003) has set a limit of 10<sup>3</sup> CFU/g for *B. cereus* in matt tea, which is prepared similarly to coffee. If similar limits were set for coffee, the results here demonstrate that many commercial brands of coffee would be considered unsuitable for consumption.

The frequency with which *B. cereus* was detected in coffee samples suggests a widespread distribution of this microorganism throughout several steps of coffee production. The identification of vine plants carrying enterotoxins indicates that contamination may occur from tilling. This particular result also indicates that control of the microorganism must occur from the beginning of the process of coffee harvesting. An appropriate, healthy harvesting process will reduce the risk of food-borne illness associated with *B. cereus*.

The presence of *B. cereus* in roasted and ground coffee may be due to several factors, including the elevated heat-resistance of spores, the application of thermally unsuitable treatments in the coffee-roasting house, and storage of the coffee at inappropriate temperatures.

The enterotoxins HBL and NHE are the primary cause of diarrhea after infection by *B. cereus* from contaminated foods. Actually, an immunoassay method to identification of diarrhoeal enterotoxin in *B. cereus* is being using on foods. The BCET-RPLA kit, which detects the hemolytic fraction L<sub>2</sub> (HBLC), has been used to assess the production of this toxin by members of the *B. cereus* group (Guinebretière et al. 2002). Among the 14 strains tested, 71% were found to synthesize the proteic subunit L<sub>2</sub>, as indicated by the BCET-RPLA index. For the 14 *B. cereus* strains, *HBLC* gene detection by PCR method correlated well with the results of BCET-RPLA test.

All seventeen *B. cereus* strains tested possessed at least one gene or component of HBL and NHE complex. A high occurrence of protein components and/or genes involved in human diarrhoeal disease has previously been described for *B. cereus* from foods (Gaviria-Rivera et al. 2000, Valero et al. 2002, Rosenquist et al. 2005).

The percentage of food poisoning outbreaks associated with *B. cereus* varies from country to country and is dependent on the reporting system. In Japan the emetic type is reported about 10 times more frequently than the diarrhoeal type, while in Europe and North

America the diarrhoeal type is the most frequently reported (Kotiranta et al. 2000). In the Netherlands, for example, from 1991 to 1994 *B. cereus* was identified as the most common cause (19%) of food poisoning outbreaks (Simone et al. 1997). Mead et al. (1999) estimated that more than 27,000 foodborne illnesses annually in the United States are caused by *B. cereus*. However, very little is known about food poisoning outbreaks from Central and South America. A better knowledge of the characteristics of these strains that cause foodborne illnesses by *B. cereus* will help to establish their risk and provide information for microbiological risk evaluation.

Of the 14 *B. cereus* strains, 5 lacked the three genes from the HBL operon and the remaining 12 strains had at least two genes of the HBL complex. *B. cereus* strains with incomplete HBL complex have been reported (Mäntynen and Lindström 1998). Three strains were negative for *HBLA* gene and positive for *HBLCD* genes in the PCR. This indicates that the *HBLA* gene is present in these strains, but one of the primer binding sites was likely modified (Prüss et al. 1999).

Recent studies using PCR-based methods (Ghelardi et al. 2002, Phelps and McKilip 2002) attest the heterogeneity of *B. cereus* and the presence of virulence factors carried by the pathogen.

Hansen & Hendriksen (2001) reported that functioning of the HBL complex depends on products from all three genes, and is most probably that polymorphism among the genes causes the inability to detect all genes in some strains by PCR. Polymorphism similar results in the *HBL* or *NHE* operon have been reported by Guinebretière et al. (2002) among diarrheal *B. cereus* strains.

Hsieh et al. (1999) investigated the virulence profiles of *B. cereus s.l.* group bacteria, including *B. cereus* strains isolated from foods and samples associated with food-poisoning outbreaks. For this investigation, the presence of enterotoxins genes were assayed

by PCR methods and the authors concluded that all *B. cereus* group strains may be potentially toxigenic, because of that the detection of these strains in foods is important.

Among the six genes tested, *NHEB*, coding for the 39-kDa component of NHE complex, was the most frequent, detected in all *B. cereus* strains by PCR. In contrast, the percentage of strains harboring *NHEA* was smaller (41.2%) among the isolated strains. Because all the *NHE* genes belong to the same operon (Granum et al. 1999), it is, however, possible that the negative *NHEAC*-PCR results were due to gene polymorphism rather than to its absence.

In group VI and VII there are five strains of *B. cereus* (29.4%) that did not allow the amplification of the genes from HBL complex, but it demonstrated hemolytic activity by producing  $\beta$ -like hemolysis. This is in agreement with the evidence that several hemolytic factors are expressed in *B. cereus* group, such as, cereolysin, sphingomyelinase, cereolysin AB, or cereolysin-like hemolysin (Prüss et al. 1999). These strains were not able to degrade starch, and grown at 40°C. Thus, these strains could be *B. cereus* strains producing emetic toxin which are usually unable to degrade starch (Valero et al. 2002; Agata et al. 1996).

Biochemical features as starch hydrolysis, acetyl-methyl-carbinol production, and tyrosine degradation presented discriminative results which demonstrated that isolated strains with different biochemical metabolism may be strains deriving from diverse contamination sources. Germination of *B. cereus* strains take advantage among 10°C and 48°C, and temperatures lower than 100°C cannot be efficient for the spores' destruction of *B. cereus*. This bacteria is not a competitive organism, and germinate well in foods containing flour or starch, in particular, boiled rice after the cooling (below of 48°C) can enable the growth of this microorganism. After heating, with absence of competitive flora, the spores germinate and can produce toxins (Silva et al. 2007).

The high number of samples containing enterotoxigenic *B. cereus* strains highlights the necessity of improvements the hygiene conditions during the processing of coffee, in order to avoid risks for public health.

### **Acknowledgements**

I thank Dra Clara Fátima Cavados of the Institute Oswaldo Cruz for the given up space of the Laboratory of Bacterial Physiology, as well as the teacher Jeane Quintanilha for the help in the inquiries.

## Tables

Table 1: Polymerase chain reaction (PCR) primers used in this study.

<i>Primers</i>	<i>Target genes</i>	<i>Primer Sequence (5' -3')</i>	<i>Positions (5' -3')</i>	<i>Product size (bp)</i>	<i>References</i>
HBLA1	<i>HBLA</i>	GTGCAGATGTTGATGCCGAT	671-690	320	Hansen and Hendriksen (2001)
HBLA2		ATGCCACTGCGTGGACATAT	990-971		
L <sub>1</sub> A	<i>HBLD</i>	AATCAAGAGCTGTCACGAAT	2854-2873	430	Hansen and Hendriksen (2001)
L <sub>1</sub> B		CACCAATTGACCATGCTAAT	3283-3264		
L <sub>2</sub> A	<i>HBLC</i>	AATGGTCATCGGAACTCTAT	1448-1467	750	Hansen and Hendriksen (2001)
L <sub>2</sub> A		CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	2197-2178		
NHEA-S	<i>NHEA</i>	TACGCTAAGGAGGGGCA	344-360	500	Hansen and Hendriksen (2001)
NHEA-A		GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	843-823		
NHEB-S	<i>NHEB</i>	CTATCAGCACTTATGGCAG	1500-1518	770	Hansen and Hendriksen (2001)
NHEB-A		ACTCCTAGCGGTGTTCC	2269-2253		
NHEC-S	<i>NHEC</i>	CGGTAGTGATTGCTGGG	2820-2836	582	Hansen and Hendriksen (2001)
NHEC-A		CAGCATTCGTACTIONGCCAA	3401-3383		

Table 2: Average *Bacillus cereus sensu lato* counts obtained from different manufacturers of roasted and ground coffee.

<i>Roasted and ground coffee of lots</i>	<i>N° of samples</i>	<i>Average counts (cfu/g)*</i>	<i>N° of samples containing B. cereus s.l.</i>	<i>% of samples containing B. cereus s.l.</i>
1°	10	10 <sup>3</sup> to 10 <sup>5</sup>	3	30
2°	10	10 <sup>4</sup> to 10 <sup>5</sup>	3	30
3°	10	10 <sup>2</sup> to 10 <sup>4</sup>	8	80

\*CFU/g – colony forming units per gram of analyzed sample

Table 3: Occurrence of genes encoding enterotoxins and phenotypic characteristics of isolated *Bacillus cereus sensu stricto* from roasted and ground coffee.

Cepas isolated	HBLa complex			NHEa complex			Grupo	BCET-RPLA <sup>b</sup>
	HBL A	HBL C	HBL D	NHE A	NHE B	NHE C		Enterotoxina L <sub>2</sub>
<i>Bc</i> 5.1	+	+	+	+	+	+	<b>I</b>	+++
<i>Bc</i> 6.1	+	+	+	+	+	+	<b>I</b>	+++
<i>Bc</i> 7.1	+	+	+	+	+	+	<b>I</b>	+++
<i>Bc</i> 5.2	+	+	+	+	+	+	<b>I</b>	+++
<i>Bc</i> 6.2	+	+	+	+	+	+	<b>I</b>	+++
<i>Bc</i> 7.2	+	+	+	-	+	+	<b>II</b>	+++
<i>Bc</i> 5.3	+	+	+	-	+	+	<b>II</b>	+++
<i>Bc</i> 6.3	+	+	-	+	+	+	<b>III</b>	+++
<i>Bc</i> 7.3	-	+	+	+	+	-	<b>IV</b>	+++
<i>Bc</i> 2.3	-	+	+	-	+	-	<b>V</b>	+++
<i>Bc</i> 3.3	-	-	-	-	+	-	<b>VI</b>	-
<i>Bc</i> 4.3	-	-	-	-	+	-	<b>VI</b>	-
<i>Bc</i> 5.3	-	-	-	-	+	-	<b>VI</b>	-
<i>Bc</i> 10.3	-	-	-	-	+	+	<b>VII</b>	-

+, positive; -, negative

<sup>1</sup>+, a PCR product of the expected size was observed; -, no PCR product was observed

<sup>2</sup>+++ , production of diarrheal enterotoxin detected by the Oxoid test; -, absence of diarrheal enterotoxin

<sup>3</sup>See Claus and Berkeley (1986)

<sup>4</sup>AMI = starch hydrolysis; VP = Voges-Proskauer test (acetyl-methyl-carbinol production); NaCl 5% = growth in Nutrient Broth containing 5% NaCl; NaCl 7% = growth in 7% NaCl; TIR = tyrosine degradation; Temp. 40°C = growth at 40°C

<sup>5</sup>All isolated *B. cereus* strains presented **positive results** for: utilization of citrate, casein hydrolysis, lecithinase reaction, catalase production, anaerobic growth, acid production from glucose, production of hemolysis, and oxidase reaction. All isolated *B. cereus* strains presented **negative results** for the following: growth at 50°C, 55°C, and 65°C, growth in 10% NaCl, acid production from D-xylose, arabinose, and mannitol, and gas production from D-glucose.

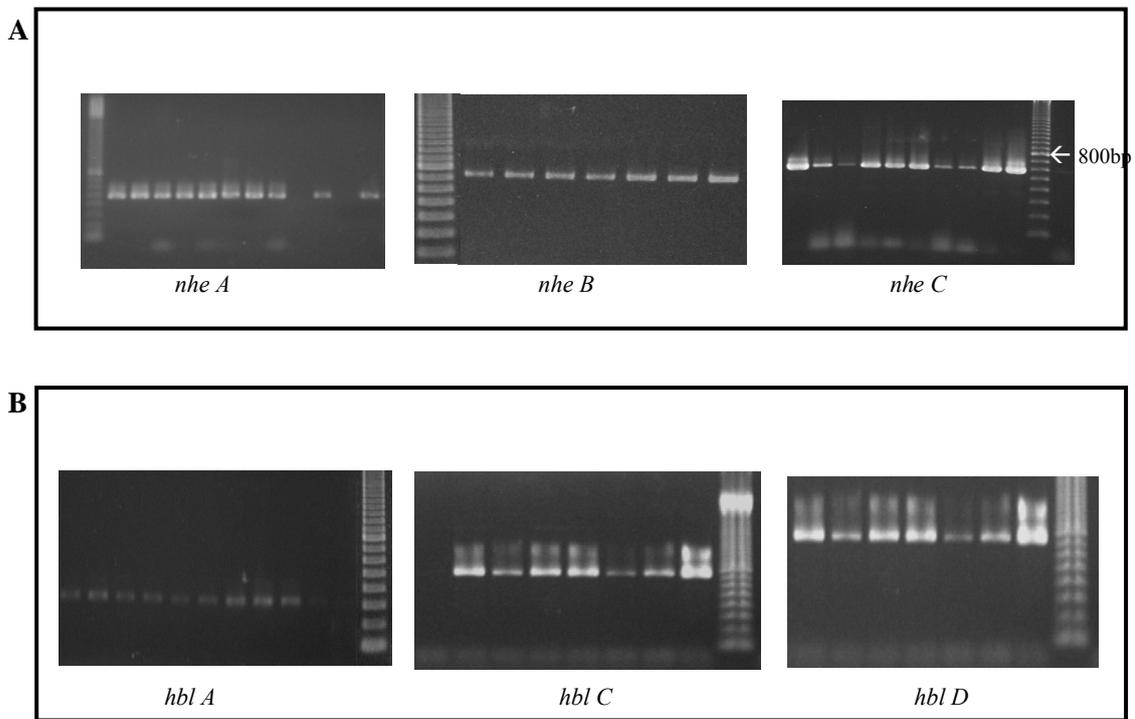


Figure 1: Representative PCR results from isolated *Bacillus cereus*. (A) Agarose gel of PCR products for the *NHEA*, *NHEB*, and *NHEC* genes encoding the “NoNHemolytic Enterotoxin,” NHE; (B) Agarose gel of PCR products for the *HBLA*, *HBLC*, and *HBLD* genes encoding the “Hemolysin BL,” HBL.

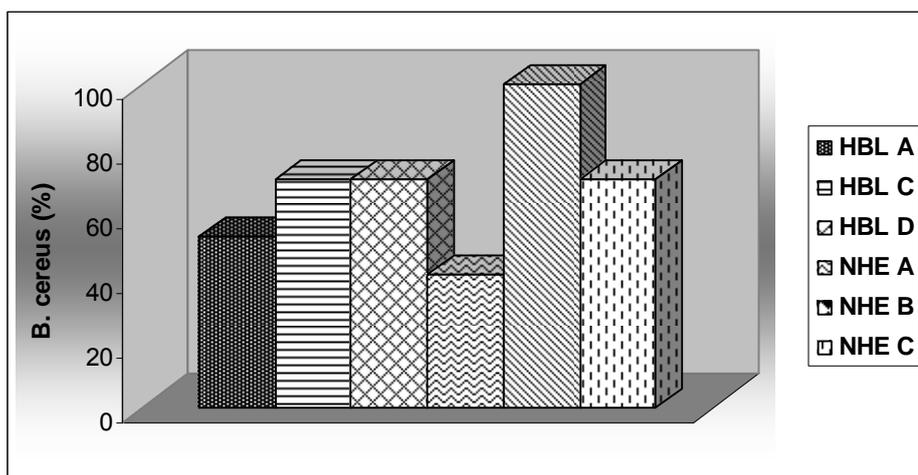


Figure 2: Percentage of the *HBL* and *NHE* genes from isolated *Bacillus cereus*

S.S..

## REFERENCES

Agata N, Ohta M, Mori, M 1996. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 33: 67-69.

Agata N, Ohta M, Yokoyama K 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 23-27.

Bartoszewick M, Hansen BM, Swiecicka I 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* 25: 588-596.

Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL 1995. Enterotoxin activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 63: 4423–4428.

Beecher DJ & Macmillan JD 2001. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59: 1778-1784.

BRASIL. Resolução - RDC n.12, 2 jan. 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde - Aprova Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Resolução - RDC n.175, 8 jul. 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde - Aprova “Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas em alimentos”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 06 de julho de 2003.

Bryan FL 1990. Systems for retail food and restaurant operations. *J. Food Protect.* 53: 978-983.

Claus D & Berkeley RCW 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.1104-1139.

Doyle MP 1998. *Bacillus cereus*. *Food Technol*, 42(4):199-200.

Gaviria-Rivera AM, Granum PE, Priest FG 2000. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190: 151-155.

Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Barsotti C, Baggiani A, Senesi S 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 129-134.

Gordon RE, Haynes WC, Pang CN 1973. The Genus *Bacillus*. U.S. Department of Agriculture agricultural handbook n° 427. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Granum, P. E, & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letter*, 157, 223-228

Granum PE, O'Sullivan K, Lund T 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 225-229.

Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3053-3056.

Hansen BM & Hendriksen NB 2001. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 185-189.

Harmon SM, Goepfert JM, Bennett RW 1992. *Bacillus cereus*. In: Vanderzant C, Splittstoesser F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC: American Public Health Association, p.593-604.

Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY 1999. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* groups cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.* 87: 481-490.

Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2: 189-198.

Lechener S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp.nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1373-1382.

Le Scanff J, Mohammedi I, Thiebaut A, Martin O, Argaud L, Robert D 2006. Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient. *Infection* 34: 98-99.

Lund T & Granum PE 1996. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 151-156.

- Mäntynen V & Lindström KM 1998. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxigenic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1634–1639.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McGaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Trauxe RV 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625.
- Nakamura LK 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1031-1035.
- Nunes ELC, Santos KRN, Mondino PJJ, Bastos MCF, Giambiagi-de Marval M 1999. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 77-81.
- Phelps RJ & McKillip JL 2002. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3147-3151.
- Prüss BM, Dietrich R, Nibler B, Märklbauer E, Scherer S 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5436-5442.
- Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 129-136.
- Ryan PA, Mcmillan JD, Zilinskas BA 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> components hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 179: 2551-2556.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Bacillus cereus*. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 2007. p. 149-160.

Simone E, Goosen M, Notermans SHW, Borgdorff MW 1997. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in The Netherlands, 1991-1994. *J. Food Prot.* 60: 442-446.

Souza CMOCC 2005. Avaliação dos parâmetros microscópicos do café torrado e moído interno e externo e detecção da presença de *Bacillus cereus*. MSc. Thesis, Instituto Nacional de Controle e Pesquisa de Qualidade em Saúde – INCQS, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 93p.

Speck LM 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2<sup>nd</sup> ed. Washington, DC: American Public Health Association.

Tsen HY, Chen ML, Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL 2000. *Bacillus cereus* group strains, their hemolysin BL activity, and their detection in foods using a 16s RNA and hemolysin BL gene-targeted multiplex polymerase chain reaction system. *J. Food Protect.* 63: 1496-1502.

Valero M, Hernández-Herrero LA, Fernández PS, Salmerón MC 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiol.* 19: 491-499.

Vasconcelos FJM & Rabinovitch L 1994. A new for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food. *J. Food Microbiol.*58: 235-23