



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus*, AVALIAÇÃO DE SUA RESISTÊNCIA
TÉRMICA EM SISTEMA CONTÍNUO E SEU CONTROLE EM LEITE UHT

Ms. CRISTIANA DE PAULA PACHECO SANCHEZ

Engenheira de Alimentos

Orientadora: Profª Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cristiana de Paula Pacheco Sanchez**, aprovado pela Comissão Julgadora em 21 de outubro de 2005.

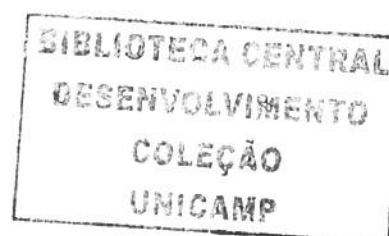
Campinas, 21 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Pilar Rodriguez de
Massaguer
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/VN/comp
	Sa 550
V	EX
TOMBO BC/	66666
PROC.	16-123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	11.000
DATA	11-01-08
Nº CPD	

Bib Id 375 333

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Sa550 Sanchez, Cristiana de Paula Pacheco
Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT / Cristiana de Paula Pacheco Sanchez. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Processo contínuo. 2. Leite UAT – (Ultra alta temperatura). 3. *Bacillus cereus*. 4. PCR - (Reação em cadeia da polimerase). I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Occurrence of *Bacillus cereus*, evaluation of its thermal resistance
in continuous system and its control in UHT milk.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Continuous process, UHT Milk – (Ultra high
temperature), *Bacillus cereus*, PCR - (Polimerase chain
reaction)

Titulação: Doutor em ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodríguez de Massaguer

Amauri Rosenthal

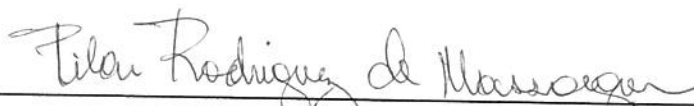
José Luiz Pereira

Mauro Faber de Freitas Leitão

Salvador Massaguer Roig

Yoko Bomura Rosato

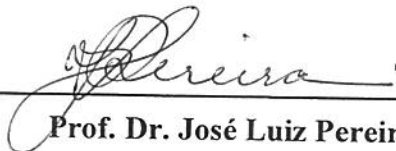
BANCA EXAMINADORA



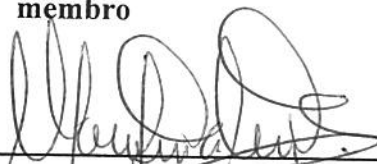
Profª Pilar Rodríguez de Massaguer, PhD
orientadora



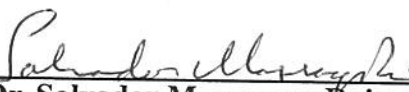
Dr. Amauri Rosenthal
membro



Prof. Dr. José Luiz Pereira
membro



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
membro



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
membro

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato
membro

AGRADECIMENTOS

- ℵ À Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação;
- ℵ À CNPq pela bolsa concedida;
- ℵ Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada;
- ℵ A meus pais que sempre me incentivaram;
- ℵ Ao meu marido, Maurício Carvalho Sanchez, por todo amor, compreensão e paciência durante estes anos;
- ℵ Ao Dr. John Miles, presidente da MicroThermics, pelo treinamento e colaboração;
- ℵ À Viviane Guerra pelo apoio na análise estatística dos dados experimentais e a Dra. Yoko Bomura Rosato pelo precioso ensinamento em análises genéticas;
- ℵ À Rosa Maria Tavares Andrasso pelo aprendizado e convivência diária;
- ℵ A André Pereira de Araújo e a todos os colegas do Laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP pela colaboração e interesse na pesquisa;
- ℵ Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos José Carlos Assis (*in memorian*) e Adauto Venâncio dos Santos; e ao funcionário da Secretaria de pós-graduação, Cosme Perota;

INDICE

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
NOMENCLATURA GERAL	XIII
SUBSCRIÇÕES.....	XIV
RESUMO GERAL	XVI
ABSTRACT	XX
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
PARTE I: ASPECTOS E DEFINIÇÕES DO LEITE FLUIDO UHT	13
1. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE FLUÍDO.....	13
2. A LEGISLAÇÃO DO LEITE FLUÍDO	15
3. A EVOLUÇÃO DO MERCADO DE LEITE FLUÍDO NO BRASIL	16
4. O CONSUMO DE LEITE LONGA VIDA NO BRASIL.....	17
4.1 Definição	17
4.2 A pasteurização no Brasil.....	18
4.3 A esterilização	18
4.4 O tratamento UHT (Ultra high temperature).....	18
4.5 Regulamentações do leite UHT	20
4.6 Os efeitos do tratamento térmico do leite fluído.....	21
5. ASPECTOS DO LEITE LONGA VIDA	24
5.1 Definição e variáveis de controle	24
5.2 A qualidade microbiológica da matéria prima.....	26
5.3 A embalagem.....	28
5.4 O envase asséptico.....	29

5.5 A limpeza CIP (<i>Cleaning in Place</i>)	29
PARTE 2: A CONTAMINAÇÃO EM LEITE FLUIDO E A IDENTIFICAÇÃO DE <i>B. CEREUS</i>	33
6. Ocorrência de contaminação bacteriana em leite fluído	33
6.1 A contaminação nos equipamentos de produção	33
6.2 <i>Bacillus spp. psicrotróficos</i> em leite cru	34
6.3 Ocorrência da contaminação microbiana em leite cru	35
6.4 Ocorrência de contaminação microbiana em leite pasteurizado	37
6.5 Ocorrência de contaminação microbiana em leite longa vida	38
7. CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO <i>CEREUS</i>	40
7.1 Características relevantes ao nível de gênero	40
7.2 Características relevantes ao nível de espécie	41
7.3 Características diferenciais do grupo <i>cereus</i>	46
8. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DE <i>B. CEREUS</i>	46
9. ASPECTOS DA CONTAMINAÇÃO DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE	48
9.1 Efeitos da contaminação no produto final	48
9.2 Medidas de controle	48
10. IDENTIFICAÇÃO DE <i>BACILLUS CEREUS</i> EM LEITE FLUIDO	50
PARTE 3: A RESISTÊNCIA TÉRMICA DE <i>B. CEREUS</i> E A ESTERILIDADE COMERCIAL	58
11. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE <i>BACILLUS CEREUS</i>	58
12. A RESISTÊNCIA TÉRMICA EM SISTEMAS ESTÁTICOS E CONTÍNUOS	61
13. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS EM SISTEMAS CONTÍNUOS	67
14. ROTINA DE CÁLCULO PARA O MÉTODO DO PONTO EQUIVALENTE-EPM NO PROGRAMA ALIKINETIC	70
15. ROTINA DE CÁLCULO PARA O MÉTODO DAS EXPOSIÇÕES ISOTÉRMICAS PAREADAS EQUIVALENTES-PEIE NO PROGRAMA ALIKINETIC	72
16. SUB-ROTINA PARA GERAÇÃO DE PERFIL DE TEMPERATURA (TEMPPROFILE.BAS) NO PROGRAMA ALIKINETIC	74
17. A ESTERILIDADE COMERCIAL EM PROCESSOS ASSÉPTICOS	75
17.1 O teste de esterilidade comercial	75

17.2 A incubação	76
17.3 Métodos alternativos não destrutivos para testes de esterilidade comercial	77
17.4 A amostragem para ensaios de esterilidade comercial	77
17.5 Critérios de esterilidade e estabilidade	79
17.6 Aspectos do sistema contínuo	81
17.7 A validação biológica para processos assépticos	82
17.8 Limitações da validação	84
17.9 Cálculo do tempo de residência e do inóculo para processos de validação biológica	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
PARTE 4: ESTRUTURAÇÃO DOS RESULTADOS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS	110
CAPÍTULO 2. MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK	111
ABSTRACT	114
RESUMO	115
INTRODUCTION	116
MATERIAL AND METHODS	121
RESULTS AND DISCUSSION	124
CONCLUSIONS	142
ACKNOWLEDGEMENTS	143
REFERENCES	144
CAPÍTULO 3. <i>BACILLUS CEREUS</i> KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS	153
ABSTRACT	156
RESUMO	157

INTRODUCTION	158
MATERIAL AND METHODS	164
RESULTS AND DISCUSSION.....	168
CONCLUSIONS	174
NOMENCLATURE.....	175
REFERENCES	176
ACKNOWLEDGEMENTS.....	182
CAPÍTULO 4 - <i>B. cereus</i> INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY.....	193
ABSTRACT	196
RESUMO	197
INTRODUCION.....	198
METHODOLOGY	204
RESULTS AND DISCUSSION	210
CONCLUSION.....	217
ACKNOWLEDGMENTS	218
NOMENCLATURE.....	218
REFERENCES	220
APÊNDICE.....	227

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DO GRUPO CEREUS (FDA, 1998).....	46
---	----

CAPÍTULO 2 - MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

TABLE 1. RESULTS FROM THE FIRST COMMERCIAL STERILITY TESTS	124
TABLE 2. RESULTS FROM THE SECOND COMMERCIAL STERILITY TEST AFTER INCUBATION AT 37C	125
TABLE 3. PH VALUES FOR UHT MILK SAMPLES INCUBATED AT 37 C.....	126
TABLE 4. RESULTS FROM THE SECOND COMMERCIAL STERILITY TEST AFTER INCUBATION AT 7C	127
TABLE 5. PH VALUES FOR UHT MILK SAMPLES INCUBATED AT 7C.....	128
TABLE 6. CHARACTERIZATION OF NON-STERILE SAMPLES OF UHT WHOLE MILK.....	134
TABLE 7. CONFIRMATORY AND DIFFERENTIAL TESTS FOR ISOLATES FROM NON STERILE UHT WHOLE MILK SAMPLES COMPARED WITH B. CEREUS ATCC 11778	136
TABLE 8. FTIR IDENTIFICATION FOR ISOLATES FROM NON STERILE UHT WHOLE MILK SAMPLES.....	137

CAPÍTULO 3 - *Bacillus cereus* KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS

TABLE 1. MEAN RESIDENCE TIME (RT) AND HOLD TUBE* (HT) LENGTH TO EACH SAMPLE PORT FOR ALL RUN TESTS.	185
--	-----

TABLE 2. <i>B. CEREUS</i> KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS SYSTEM BY ALIKINETIC SOFTWARE.	192
--	-----

CAPÍTULO 4 - *B. cereus* INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY

TABLE 1. DIRECT INOCULATION HEAT TREATMENT WITH <i>B. CEREUS</i> SPORES.....	211
--	-----

TABLE 2. MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NON STERILE UNITS PROCESSED AT 121C FOR 150.5S, 1º REPETITION, WITH INOCULATION LEVEL OF 5.0E+06 <i>B. CEREUS</i> SPORES/ML OF MILK.....	212
---	-----

TABLE 3. MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NON STERILE UNITS PROCESSED AT 121C FOR 150.5S, 2º REPETITION, WITH INOCULATION LEVEL OF 5.0E+06 <i>B. CEREUS</i> SPORES/ML OF MILK.....	214
---	-----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2 - MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

GRAPH 1. AVERAGE AND PH SUPERIOR LIMIT FOR UHT MILK SAMPLES INCUBATED AT 37 C	126
GRAPH 2. MEAN AND SUPERIOR LIMIT OF PH FOR UHT MILK SAMPLES INCUBATED AT 7C	128
GRAPH 3. COMPARISON BETWEEN PH MEASUREMENTS AFTER INCUBATION AT 7C AND 37C.....	129
GRAPH 4. PH FREQUENCY DISTRIBUTION FOR SAMPLES FROM BRAND A	130
GRAPH 5. PH FREQUENCY DISTRIBUTION FOR SAMPLES FROM BRAND B	130
GRAPH 6. PH FREQUENCY DISTRIBUTION FOR SAMPLES FROM BRAND C	131
GRAPH 7. PH FREQUENCY DISTRIBUTION FOR SAMPLES FROM BRAND D	132
GRAPH 8. PH FREQUENCY DISTRIBUTION FOR SAMPLES FROM BRAND E	132
FIGURE 1. VALIDATION OF B. CEREUS PRIMER	141
FIGURE 2. IDENTIFICATION OF TYPICAL CULTURES BY PCR AGAINST B. CEREUS.....	141

CAPÍTULO 3 - *Bacillus cereus* KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS

FIGURE 1. SCHEMATIC OF LABORATORY SCALE STERILIZER WITH ASEPTIC SAMPLE PORTS	184
FIGURE 2. TIME-TEMPERATURE CURVE ILLUSTRATING THE HEAT ACTIVATION OF <i>B. CEREUS</i> 0486	187
FIGURE 3. TIME-TEMPERATURE PROFILES FOR INOCULATED PASTEURIZED WHOLE MILK IN TDT AND CONTINUOUS SYSTEMS.	189
FIGURE 4. <i>B. CEREUS</i> KINETIC PARAMETERS IN STATIC SYSTEM.	191

CAPÍTULO 4 - *B. cereus* INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY

FIG. 1.TIME-TEMPERATURE PROFILE AT 121C FOR 150.5S WITH INOCULATION LEVEL OF 5.0E+06 <i>B. CEREUS</i> SPORES/ML OF MILK.....	216
FIG. 2.TIME-TEMPERATURE PROFILE AT 134C FOR 36.3 S WITH INOCULATION LEVEL OF 1.0E+02 <i>B. CEREUS</i> SPORES/ML OF MILK.....	217

NOMENCLATURA GERAL

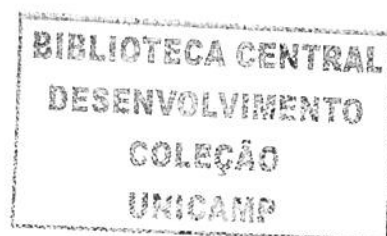
A	Área da superfície de troca térmica. (m^2)
Ac	Área da seção circular ($\pi (\phi_{\text{interno}})^2 / 4$). (m^2)
C_p	Calor específico. (J/kg.K)
D	Tempo requerido para destruir 90% de determinada população microbiana. (s ou min)
Ea	Energia de ativação. (J/mol ou KJ/mol)
F₀	Valor de Esterilização. Tempo requerido para inativar microrganismos à temperatura de referência constante ($121/^\circ\text{C}$) considerando $z = 10^\circ\text{C}$. (min)
G	Relação de redução térmica. (s ou min)
J	Expoente que representa a relação ($U_t.A/\varpi_p.c_p$). (seg^{-1} ou min^{-1})
k	Constante de taxa de morte. Coeficiente angular da curva linearizada. (seg^{-1} ou min^{-1})
K	Conditividade térmica. (Pa.s^n)
k_e	Constante de taxa de morte equivalente. Coeficiente angular equivalente da curva linearizada. (s^{-1} ou min^{-1})
log	Função logarítmica.
min	Minuto.
N₀	População inicial de microrganismos por unidade de volume. (UFC/ml ou esporos/ml)
N	População final de microrganismos sobreviventes após um tempo t de tratamento térmico a uma temperatura definida, por unidade de volume, o que equivale à probabilidade de uma unidade não estéril. (UFC/ml ou esporos/ml)
n	Índice de comportamento do escoamento
Q	Vazão ou taxa de fluxo. (m^3/s ou l/min)

R	Constante universal dos gases. (8,1314 J/mol.k)
R²	Coeficiente de correlação.
Re	Número de Reynolds
s	Segundo
T	Temperatura. (°C)
T_e	Temperatura equivalente. (°C)
T_{ref}	Temperatura de referência. (°C)
t	Tempo. (s)
t_e	Tempo equivalente. (s)
U	Coeficiente global de transferência de calor. (J/m ² .s.K)
UFC	Unidades formadoras de colônias.
V_{média}	Velocidade média desenvolvida por um fluido durante seu escoamento. (m/s)
V_{máxima}	Velocidade máxima desenvolvida pela partícula mais rápida de um fluido durante seu escoamento. (m/s)
z	Diferença de temperatura necessária para variar 10 vezes o valor D. (°C)
ρ	Densidade do fluido. (g/ml)
ω	Massa do meio fluindo no trocador de calor. (kg)
φ_{interno}	Diâmetro interno da tubulação. (m)

SUBSCRIÇÕES

H	Meio de aquecimento.
C	Meio de resfriamento.

- o Condição inicial.
- p Produto.
- t Tempo ou tempo dependente.



RESUMO GERAL

Esta pesquisa visou determinar a presença/ausência de *Bacillus cereus*, a partir de 6.500 amostras de leite integral UHT (Ultra High Temperature) com pH 6,5-6,8; processadas assepticamente e envasadas em embalagem cartonada multicamadas de 1 litro, com 1 a 2 meses de vida de prateleira. Tais amostras foram submetidas ao ensaio de esterilidade comercial. A amostragem englobou cinco plantas de processo UHT brasileiras processadoras de leite integral UHT. Mil e trezentas embalagens de cada empresa foram avaliadas, após incubação a 7°C (50%) e 37°C (50%) por dez dias, para verificar a esterilidade comercial e isolar, respectivamente, linhagens mesofílicas e psicrotóficas de *B. cereus*.

Para as embalagens suspeitas (pH < 6,50), foram realizados procedimentos de isolamento, identificação e enumeração de *B. cereus*, bem como, isolamento de *B. sporothermodurans* e contaminantes “flat sour”. A identificação mediante ensaios fenotípicos e genotípicos foi procedida para confirmação da espécie *B. cereus*. Para os *Bacillus* não confirmados como *B. cereus* foi realizada a identificação por FTIR (*Espectroscopia Infravermelha de Transformada de Fourier*) e para os outros grupos somente identificação ao nível de gênero.

A otimização da metodologia PCR, e do respectivo primer, foi concluída frente ao padrão *B. cereus* (ATCC 14579 e ATCC 11778) e frente ao antipadrão *B. thuringiensis* (ATCC 10972).

A medida de pH representou um método prático, rápido e barato enquanto índice para procura de embalagens contaminadas em laboratórios de controle de qualidade existentes em plantas industriais de laticínio. Este método pode ser aplicado desde que o pH apresente uma distribuição normal de medidas, sendo que estas serão consideradas após parametrização das variações de pH em função das alterações físico-químicas pertinentes.

As amostras analisadas apresentaram diferenças significativas nos valores de pH, refletindo, assim, a variabilidade da matéria-prima, a severidade do processo térmico aplicado e as condições de manipulação na cadeia de distribuição do produto.

Nenhuma amostra contaminada com *B. cereus* foi encontrada a partir de 6.500 embalagens de leite integral UHT analisadas. Somente após incubação, a 37°C e 7°C, bactérias deteriorantes esporuladas e não esporuladas foram encontradas. Assim, dentro do espaço amostral analisado, o leite UHT Brasileiro não apresenta o microrganismo patogênico procurado e, portanto, está em concordância com a corrente legislação, sem gerar problemas de saúde ao consumidor.

Como, a partir do levantamento microbiológico descrito não foram isoladas cepas de *Bacillus cereus*, uma cultura de *B. cereus* 0486, disponível no Laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP foi utilizada nos ensaios de determinação dos parâmetros cinéticos “D” e “z” determinados no leite UHT em sistema estático (tubo TDT), e “k” e “Ea” em sistema contínuo (unidade de processamento asséptico *Microthermics* UHT-HTST Lab 25-DH de escala laboratorial), para fins de comparação.

Os dados gerados em sistema contínuo foram tratados no programa ALIKINETIC, pelo método do Ponto Equivalente (EPM) e pelo Método das Exposições Isotérmicas Pareadas (PEIE), para gerar os parâmetros cinéticos (k e E_a) e o coeficiente de correlação (R^2).

O Método EPM apresentou melhor coeficiente de correlação e, por isso, seus respectivos parâmetros cinéticos calculados, $k_{121C} = 0.1657069 \text{ s}^{-1}$ e $E_a = 151.107,677 \text{ J/mol}$; e, foram considerados como resultado. Extrapolações de dados cinéticos, obtidos em sistema estático, para estimar processos UHT não são eficazes e podem produzir sub ou super processamentos.

O aumento da resistência térmica, observado após ativação não isotérmica, indica que é necessário considerar a ativação, representada no processo pelo tempo de pré-aquecimento, como importante variável antes da execução dos ensaios de inativação.

A partir dos parâmetros cinéticos calculados, o binômio 134°C por 36,3 s, localizado no extremo superior da região UHT para leite, foi dimensionado em sistema indireto a fim de avaliar a taxa de defeitos de processamento térmico de leite UHT, bem como, o número de reduções decimais na população inoculada de *B. cereus* 0486. Este binômio juntamente com outro aplicado fora da região UHT para leite (121°C por 150,5 s), orientou a verificação dos processos térmicos de aquecimento indireto que foram testados mediante inoculação direta de esporos do alvo, na unidade piloto, simulando a rotina praticada em planta de produção contínua, porém em embalagens de vidro.

Os parâmetros cinéticos, obtidos em sistema contínuo, permitiram melhor predição da taxa de defeitos em processos térmicos, com *B. cereus* como alvo, dentro e fora da região UHT para leite.

O processo equivalente, a 134°C por 36,3 s, não permitiu a sobrevivência de *B. cereus* 0486 ou qualquer outro microrganismo quando o nível de inoculação de *B. cereus* 0486 foi de 1.0E+02 esporos/mL de leite pasteurizado.

Apesar da Portaria nº 370 de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1997), indicar que o tratamento térmico de leite UHT compreende a faixa de 130-150°C por 2-4 s; experimentalmente somente processos equivalentes ou mais severos que 134°C por 36,3s poderiam garantir um produto livre de contaminantes deteriorantes e/ou patogênicos, considerando a qualidade do leite cru Brasileiro.

ABSTRACT

This research aimed to determine the presence or absence of *Bacillus cereus*, from 6,500 whole UHT milk samples with pH 6.5-6.8 aseptic packages in one liter carton packages, with 1 to 2 months of shelf life. These samples were submitted to commercial sterility test. The sampling considered five Brazilian UHT plants based on direct steam injection processors of whole UHT milk. One thousand and three hundred packages from each plant were analyzed, after ten days incubation at 7C (50%) and 37C (50%), in order to verify the commercial stability and isolate vegetative cells of mesophilic and psychrotrophic *B. cereus* strains, respectively.

For suspicious samples (pH < 6.5), the isolation, identification and enumeration of *B. cereus* and only isolation and identification of *B. sporothermodurans* and flat sour contaminants were carried. The identification by phenotypical and genetic (PCR) tests was applied for confirmation of *B. cereus* at species level. For other *Bacillus* species, the identification by FTIR was used and, other groups were identified only at genus level.

The standardization of PCR methodology and specific primer for *B. cereus* was implemented using two typical strains of *B. cereus* ATCC 11778 and ATCC 14579 and one strain of *B. thuringiensis* ATCC 10972, as a negative standard, available at UNICAMP Termobacteriology Laboratory.

pH measurement represented a practical, quick and cheap method as an index to the quality control laboratories of the dairy plants. This method can be applied since pH measurements present a normal distribution and this will be considered after pH variations standardization in function of its physical-chemical alterations.

All dairy samples analyzed showed significant differences in pH values; demonstrating the variability in raw material, severity of the thermal process and packages handling conditions.

It was not found any positive sample contaminated by *B. cereus* from 6,500 packs of UHT milk tested. Only after incubation at 37°C and 7°C deteriorative sporeforming bacteria were found. Thus, within the experimental sampling space analyzed, Brazilian UHT milk does not present this pathogenic microorganism and, therefore, is in accordance with the current law, without generating health problems to the consumer.

As no *B. cereus* strain was isolated from commercial sterility test, a *B. cereus* 0486 culture, available at Thermobacteriology Laboratory (FEA/UNICAMP) was used in several tests to determine, in UHT milk, the kinetic parameters “D” and “z” in static system (TDT tubes) and “k” and “Ea” values in continuous system (MicroThermics UHT-HTST Lab-25-DH laboratory scale aseptic unit). Data from continuous system were given as input to ALIKINETIC to generate, by EPM and PEIE methods, the kinetic parameters (Ea and k values) and coefficient of correlation (R^2).

The EPM method presented the best coefficient of correlation and its calculated kinetic parameters, $E_a = 151.107,677 \text{ J/mol}$ and $k_{121C} = 0.1657069 \text{ s}^{-1}$, were considered as results. Extrapolation of batch kinetic data to estimate UHT processes may not be accurate and may result in under or over processing to assure safety, sterility and sensorial quality.

The increased thermal resistance observed after non-isothermal activation indicates that it is necessary to consider the spore activation, represented by pre heating phase in continuous processes, as an important task before carrying out the inactivation treatment.

From calculated kinetic parameters, the binomium 134°C for 36,3 s, at the upper limit of UHT region, was determined in indirect system to analyze the UHT milk rate of defects and to calculate the decimal reduction in *B. cereus* 0486 population. The referred binomium and another one applied outside the UHT region for milk (121°C for 150.5s) guided the redesign of thermal processes tested with direct inoculation of target spore suspension, in pilot unit, simulating with glass bottles the practical procedures applied in industrial dairy plants.

Kinetic parameters in dynamic systems allowed better prediction of thermal process rate of defects, with *B. cereus* as target, outside and inside UHT region for milk. The equivalent process, for 36.3 s at 134°C , did not allow the survival of *B. cereus* 0486 or any other microorganisms if the contamination level is $1.0\text{E}+02$ spores/mL of milk.

Despite the Regulation n° 370 de 4 de setembro de 1997, from Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1997) indicates that UHT milk treatment range is between $130 - 150^\circ\text{C}$ for 2-4 s, experimentally only equivalent thermal processes for Brazilian milk at 134°C for 36.3 s or higher, at the upper limit of UHT region for milk,

could assure with safety the absence of *B. cereus*, considering the microbial quality of Brazilian milk.

INTRODUÇÃO GERAL

O leite apresenta grande importância comercial devido ao seu valor nutricional; fato que o configura como produto de destaque do ponto de vista social e econômico.

Os atributos do leite de qualidade podem ser resumidos em três componentes: qualidade higiênica, valor nutritivo e manutenção das propriedades sensoriais. As principais causas de perda de qualidade do leite estão relacionadas a saúde e ao manejo dos rebanhos nas propriedades rurais.

Segundo *Franklin (1970)*, o leite é tratado termicamente por dois motivos: proporcionar ausência de bactérias patogênicas e prolongar a manutenção de sua qualidade. Na primeira situação, a 70-72°C/15s ocorre destruição das bactérias patogênicas não esporuladas, mas bactérias termodúricas como *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e esporos de bactérias podem sobreviver, contaminando o produto final envasado, com conseqüente alteração de suas propriedades após poucos dias à temperatura ambiente ou após uma semana sob refrigeração. No entanto, um tratamento mais severo (a temperaturas de esterilização) por menos tempo poderia denotar um produto mais satisfatório e estável a temperatura ambiente, porém sua aplicação só seria viável em sistemas contínuos.

A eficiência da ação esporicida requerida para um tratamento de esterilização em sistemas fechados está relacionada ao número de esporos resistentes ao calor existentes no leite cru e ao valor da respectiva resistência térmica, bem como, aos números aceitáveis da população microbiana no produto final.

No mercado de leite fluído longa vida a existência de uma embalagem contaminada em mil embalagens processadas é comercialmente aceitável, embora se deva considerar que a indústria poderia conseguir um nível menor do que este na prática (*Franklin, 1970*). Assim, determinar qualitativamente a presença das bactérias formadoras de esporos, em leite cru, orientará a severidade do processo térmico que será aplicado, bem como, indicará a porcentagem das embalagens defeituosas, num mesmo lote, a fim de avaliar o nível de qualidade do processamento térmico aplicado.

Um dos critérios para determinar a razão de defeitos de um lote, recomendado por *von Bockelmann (1982)*, é a medida de pH, já que este procedimento constitui um método rápido, barato e de fácil aplicação em ambiente industrial.

Bacillus spp. são os maiores responsáveis pela deterioração de alimentos, como leite e seus derivados (*Meer et al, 1991*). Dentre as espécies relevantes é importante citar *Bacillus cereus*, pois além de ser um organismo patogênico para o consumidor, causando intoxicações ou toxi-infecções, sua incidência em leite tem sido reportada desde 1916, já que é um contaminante comum do leite cru (*Kim & Goepfert, 1971*).

Na Europa da década de 50, foi relatado o primeiro caso confirmado de intoxicação por *B. cereus* a partir de baunilha (*Hauge, 1950*). Relatórios adicionais, nos anos posteriores, também confirmaram a incidência do organismo em outros alimentos contaminados, gerando a mesma intoxicação. Neste sentido, *Mindura et al (1970)* documentaram com o primeiro relato da intoxicação, por *B. cereus*, nos Estados Unidos.

É conhecido que *B. cereus*, pode sobreviver a processos de pasteurização, pois sua resistência térmica é de 5,5 min a 100°C (Mossel et al, 1995), mas sua sobrevivência a 145°C é muito rara. Anteriormente, Burton (1977) afirmou que a deterioração de leite UHT, por este microrganismo, poderia resultar da contaminação da unidade de esterilização, do tanque pulmão e/ou do sistema de enchimento asséptico.

A deterioração, como resultado da sobrevivência de microrganismos ao processo, apresentaria baixos índices e a contaminação pós-processo poderia ocorrer devido a sanitização e limpeza inadequada dos equipamentos, bem como, ocorrer por contaminação direta com ar não estéril no ambiente asséptico. Atualmente, a afirmação de Burton (1977) não está mais atualizada, já que a ocorrência de microrganismos esporulados mesofílicos termoresistentes tem sido reportada durante os últimos anos por muitos autores (Foshino et al, 1990; Kessler et al, 1994; Hammer et al, 1995). Investigações realizadas mediante análises moleculares de 16s rRNA, destes esporulados, apresentaram uma nova espécie de *Bacillus* (Klijn et al, 1997), que foi descrita por Petterson et al (1996) como *Bacillus sporothermodurans*.

Bacillus sporothermodurans poderia resistir às condições de processo UHT, por injeção indireta de vapor, condenando lotes do produto. Segundo Lembke (1998), somente uma temperatura maior ou igual a 150°C poderia inativar os esporos deste microrganismo. Já Huemer et al (1998) afirmaram que seria necessário aplicar um tempo de 3,4 a 7,9 minutos, a 140°C, para eliminar 90% da população deste organismo, quando o mesmo apresenta um valor z de 11,3°C.

No entanto, como *Bacillus sporothermodurans* não apresenta patogenicidade e seus efeitos deteriorantes não alteram as propriedades sensoriais do produto, esta bactéria não é comumente tratada como alvo do processo térmico comercial. De qualquer maneira, sua contaminação em níveis acima de 100 esporos/ml de leite, colocaria este produto UHT fora dos padrões da União Européia (*Directive 92/46/EEC, 1992*).

Processos térmicos aplicados para leite integral na região UHT, de 135° a 150°C, estão limitados, segundo *Kessler (1981)*, pelo limite inferior da curva TDT com inativação de nove ciclos logarítmicos para esporos termófilos e mais de nove para mesófilos, bem como, pelo limite superior com a inativação de até 3% de tiamina, que é a vitamina mais termodegradável do leite; assim, eliminar o espectro de contaminação de *B. sporothermodurans* alcançaria os limites de alteração sensorial do produto UHT, gerando um impasse que poderia ser atenuado pela manutenção da qualidade da matéria prima, das condições higiênico-sanitárias durante o processamento como um todo, do envase e da distribuição.

Os relatos de incidência de contaminação por *Bacillus* em leite UHT, no Brasil, têm despertado grande demanda por pesquisas neste sentido. *De Rezende (1998)* analisou 120 amostras de leite integral UHT produzidas no Brasil, na procura por espécies do grupo cereus. Seus resultados indicaram uma positividade em 34,17% do total de amostras analisadas, sugerindo a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas no processo térmico comercial do produto.

Cabe indicar que as espécies do grupo cereus envolvem *B. cereus var mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. cereus*, nem todas patogênicas ao homem. No entanto, revisando a metodologia proposta por este autor, observou-se falta de consistência no plano de amostragem, na metodologia experimental, bem como, na identificação bioquímica dos isolados comprometendo, portanto, a veracidade dos dados apresentados.

Considerando a ocorrência da contaminação por *Bacillus* e a patogenicidade de *B. cereus*, tornou-se relevante desenvolver esta pesquisa, no mercado nacional de leite UHT, a fim de estabelecer a incidência real desta espécie patogênica no referido produto. Como a série bioquímica confirmatória e diferencial do grupo cereus não é totalmente eficiente para discriminar as espécies envolvidas, a identificação de *B. cereus* por ensaio genético de PCR foi incluída como ferramenta para confirmar sua identificação ao nível de espécie.

Além de verificar e identificar *B. cereus* em leite UHT, devido a sua patogenicidade que atinge os consumidores e, em especial as crianças, torna-se relevante determinar sua resistência térmica frente a toda cadeia dos processamentos térmicos comercialmente aplicados no Brasil até o momento da distribuição do produto final.

Segundo *Davies et al (1977)*, a caracterização microbiológica de sistemas e processos é importante no sentido de validar a sua letalidade. Processos a ultra-alta temperatura (UAT) são de difícil caracterização devido à dificuldade de aplicar altas temperaturas sob pequenos intervalos de tempo em unidades piloto. Além disso, a severidade e a concentração verificada, em uma suposta contaminação, exigiriam o uso de um sistema de processamento contínuo de escala comercial.

Neste sentido, *Franklin (1970)* já havia discutido que a grande concentração da suspensão de esporos necessária para inoculação em plantas comerciais acarretaria problemas em relação a sua idade e consistência.

No entanto, a cinética de inativação térmica determinada pelos procedimentos de imersão tradicionais, como tubos TDT (Thermal Death Time), simula condições de processos em bateladas; eles não consideram que os efeitos de pressão e de tensão de cisalhamento ocasionam um stress nos microrganismos submetidos a processos térmicos contínuos (*Burton, 1977; Swartzel, 1984*). Sob este aspecto várias pesquisas foram desenvolvidas a fim de estudar a cinética de morte de microrganismos que contaminam alimentos processados em sistemas contínuos.

Muitos pesquisadores observaram a inativação térmica de bactérias em sistemas contínuos com base nas análises do processo global. No entanto, somente alguns determinaram valores D e z monitorando o perfil de destruição do microrganismo ao longo do processo, como *Fairchild et al (1994)* que, trabalhando com *Listeria innocua*, concluíram que como os valores z foram diferentes nos dois sistemas utilizados, o mecanismo de destruição térmica poderia ser diferente entre sistemas em batelada e processos com escoamento contínuo, como o pasteurizador de escala laboratorial com portas assépticas para coleta das amostras. Neste sentido, comparar a resistência térmica de microrganismos esporulados termoresistentes em regime estático e contínuo pode garantir dados mais precisos quando os mesmos são processados em temperaturas de esterilização.

Desta maneira, os processos térmicos industriais podem ser redimensionados em função do alvo mais termoresistente em sistema contínuo, já que, o princípio da validação biológica está fixado na avaliação do processo térmico que começa com a escolha do valor F_0 , usando um organismo indicador, com parâmetros cinéticos conhecidos, que é introduzido no processo sendo, posteriormente, recuperado e quantificado. Partindo do mesmo princípio seria possível identificar pontos críticos do processo asséptico garantindo um produto microbiologicamente seguro e estável para a comunidade em geral.

Assim os objetivos gerais desta pesquisa foram:

- Detectar a **presença ou ausência de *B. cereus*** em amostras de **leite integral UHT**, considerando cinco empresas do setor.
- **Confirmando** a presença de *B. cereus* nas amostras analisadas, **isolar** a cepa mais **termoresistente** e comparar com uma **cepa padrão**, para realizar ensaios de embalagens inoculadas no processamento asséptico de leite integral UHT em **planta piloto** de esterilização contínua, a fim de avaliar os parâmetros cinéticos calculados, bem como, a taxa de defeitos induzida com base no processo térmico comercial.
- **Não confirmando** a presença de *B. cereus* nas amostras analisadas, utilizar uma **cepa padrão** ou cepa identificada como *B. cereus*, disponível no laboratório de Termobacteriologia, para realizar ensaios de embalagens inoculadas no processamento asséptico de leite integral UHT em **planta piloto** de esterilização contínua, a fim de avaliar os parâmetros cinéticos calculados, bem como, a taxa de defeitos induzida com base no processo térmico comercial.

Para tanto, objetivos específicos foram desenvolvidos a fim de alcançar os objetivos gerais da pesquisa:

- Ensaios de Esterilidade Comercial com acompanhamento por medida de pH e pesquisa de *B. cereus*
- Ensaios Bioquímicos para *B. cereus*
- Ensaios Genéticos para *B. cereus*
- Produção e Contagem da suspensão de esporos

- Ativação Ótima dos Esporos
- Determinação dos parâmetros cinéticos de *B.cereus* em tubo TDT e em trocador de calor
- Inoculação Direta com Esporos de *B. cereus*
- Avaliação dos parâmetros cinéticos
- Cálculo da taxa de defeitos em 2 processos térmicos

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Parte 1: Aspectos e definições do leite fluido UHT

1. Aspectos físico-químicos do leite fluído

Da silva et al (1997) atestam que a composição do leite é determinante para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e aptidão para processamento térmico e consumo humano. Provavelmente o leite possui em torno de 100.000 constituintes distintos, embora a maioria deles ainda não tenha sido totalmente identificada.

Os mesmos autores citam que a composição centesimal do leite de vaca engloba, aproximadamente, 80,5% de água como o constituinte mais importante no qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes; 8,1% de extrato seco desengordurado; 3,6% de gordura que ocorre como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoprotéica; 3% de proteínas, que envolvem 80% de nitrogênio caseínico e 20% de nitrogênio não caseínico; 4,2% de lactose formada por glicose e galactose, sendo o constituinte sólido predominante e menos variável; e finalmente 0,6% de substâncias minerais, em, como cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e traços de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês. A associação entre os sais e as proteínas é um fator determinante para a estabilidade das caseínas e diferentes agentes desnaturantes.

Além dos componentes principais, enzimas podem ser encontradas no leite, como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. O desenvolvimento intencional ou não de microrganismos no leite, contribui para o complexo enzimático.

As vitaminas A, D, E e K também estão presentes, no leite, associadas aos glóbulos de gordura; as demais vitaminas, B e C, ocorrem na fase aquosa do leite. O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor pouco pronunciado, devido à relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo. Sabores e odores pronunciados são atribuídos à alimentação e ao ambiente de ordenha. A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. Cores anormais podem resultar de desenvolvimento microbiano. *Da silva et al (1997)*

A acidez natural do leite varia entre 0,13 e 0,17%, expressa como ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela hidrólise da lactose, com formação de ácido láctico por enzimas microbianas da flora láctica, caracterizando a acidez desenvolvida no leite. A presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos exerce efeito tampão no leite caracterizando seu pH entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20°C. Já a densidade do leite a 15°C, apresenta valor médio 1,032 g/ml. No entanto, sob temperaturas mais elevadas, este valor decresce. *(Da silva et al, 1997)*

O leite, com alto teor de gordura apresenta maior densidade em relação ao leite com baixo teor de gordura, em razão do aumento de extrato seco desengordurado que acompanha o aumento no teor de gordura *(Da silva et al, 1997)*. Segundo dados fornecidos pela *Tetra Pak, 2004*, a 83°C a densidade do leite integral atinge 0,991 g/ml. Regressionando os dados fornecidos a quatro temperaturas, obtém-se um valor de 0,971g/ml a 121°C.

O conhecimento do calor específico do leite e dos produtos lácteos é essencial para aspectos de engenharia de processos e dimensionamento de equipamentos. A 15°C o leite integral apresenta calor específico de 3,93 J/K.kg. Já a tensão superficial do leite integral é de 55,3 dinas/cm, sendo que um aumento nos teores de proteínas e ácidos graxos livres ocasiona abaixamento da tensão superficial do produto. (*Da silva et al, 1997*)

O leite é mais viscoso do que a água em razão da presença de proteínas e lipídeos, podendo sofrer alterações com o processo industrial. O leite integral tem viscosidade, a 20°C, de 1,6314 cP. Segundo *Steffe (1992)*, a viscosidade também varia com a temperatura. Através de sua tabela de dados regressionados (temperatura *versus* viscosidade), obteve-se o valor de 0,483 cP a 121°C.

2. A legislação do leite fluído

Segundo o artigo 475 do RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, denomina-se “leite, sem qualquer outra especificação, o produto fresco e integral oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias”, apresentando as seguintes características: acidez Dornic de 15 a 20°D; 3% de teor mínimo de gordura, densidade de 1,02 a 1,03 g/ml a 15°C; 4,3% de teor mínimo de lactose; 11,5% de teor mínimo de extrato seco e 8,5% de extrato desengordurado com índice crioscópico de -0,55°H. (*RIISPOA, 1952*)

3. A evolução do mercado de leite fluído no Brasil

É importante ressaltar que a cadeia produtiva de lácteos no Brasil vem enfrentando mudanças importantes, principalmente desde a segunda metade da década de 80, quando as condições da produção foram transformadas, lançando novos desafios em busca do aumento da eficiência produtiva para atender um mercado consumidor cada vez maior e mais exigente.

De acordo com *Martins (1997)*, no caso do agronegócio do leite, as transformações ocorridas são históricas, já que o consumidor assumiu uma posição atuante no processo ditando padrões de qualidade, apresentação e praticidade. A desregulamentação do setor e outros fatores como: a concentração de capitais e a mudança nas estratégias das empresas; a integração ao MERCOSUL, bem como, a abertura e a estabilização da economia, produziram impactos sem precedentes na cadeia produtiva de lácteos, apontando disposição, pelos agentes, em realizar mudanças de maneira mais ágil (*Bortoleto, 1998*).

Segundo *Wilkinson*, citado por *Martins & Yamaguchi (1998)*, o elemento fundamental que desencadeou todo o processo de reestruturação da cadeia agroindustrial do leite centrou-se na transformação dos mercados regionais em nacionais, enfraquecendo o poder dos grandes pasteurizadores constituídos regionalmente em torno dos centros consumidores dominando, portanto, toda comercialização do produto. Grande relevância nesse contexto dirige-se à nacionalização do mercado de leite através da inovação do leite longa vida, na superação dos problemas relacionados à alta perecibilidade do leite levando à modernização da lógica de comercialização com a rede varejista de comércio.

4. O consumo de leite longa vida no Brasil

Segundo publicação da *ABLV* - Associação Brasileira de Leite Longa Vida (2003), o comportamento das vendas internas de leite longa vida aumentou em 64,4% de 1993 a 2003. Apesar disso, em 2002, foram importados 25 milhões de litros de leite longa vida. Portanto, como a demanda ainda não foi superada, o mercado poderia incrementar seu volume de produção, atendendo tanto o mercado interno quanto o mercado externo.

4.1 Definição

O emprego de altas temperaturas na segurança ou conservação do leite está fundamentado nos efeitos deletérios do calor sobre os microrganismos. O controle do crescimento microbiano visa eliminar riscos à saúde do consumidor, e prevenir ou retardar as alterações indesejáveis no leite, aumentando seu prazo de validade (*ABLV*, 2003; Tetra Pak, 2003). Ao sair do úbere de uma vaca sadia, o leite é praticamente isento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, mas sua contaminação pode ocorrer durante a ordenha, após sua obtenção, ou ao entrar em contato com utensílios e equipamentos contaminados pela microflora do ambiente. Assim, é preciso submeter o leite a um processo que garanta sua assepsia.

Dos processos térmicos, os mais comumente aplicados ao leite de consumo são: a pasteurização, a ultrapasteurização e a esterilização. A diferença entre a ultrapasteurização e a pasteurização está na temperatura e no tempo de processamento. Essas diferenças de processamento resultam em qualidade de produto semelhante, mas em tempos de armazenamento muito diferentes (*ABLV*, 2003; Tetra Pak, 2003).

4.2 A pasteurização no Brasil

Na pasteurização, a temperatura aplicada é de 72°C a 75°C, por 15 a 20 segundos. O leite pasteurizado tem o número total de bactérias reduzido, com destruição, por exemplo, das patogênicas *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes*. O produto pode ser armazenado por até 72 horas, desde que mantido e transportado em temperaturas inferiores a 10°C até chegar ao consumidor final (RIISPOA, 1952).

Kessler (1981) discorre sobre três métodos de pasteurização com seus respectivos binômios. Entre eles cita a pasteurização por tempo curto que preconiza 71°C por 15-40 segundos.

4.3 A esterilização

No Brasil não há uma legislação específica para leite esterilizado. Kessler (1981) cita processos entre 109°C a 115° por 20-40 minutos necessários para completa inativação enzimática (exceto para lipases e proteases termoresistentes advindas da contaminação por *Pseudomonas*) e microbiológica (exceto esporos termoresistentes como de *B. stearothermophilus*).

4.4 O tratamento UHT (Ultra high temperature)

Segundo o RIISPOA (1952) no tratamento UHT o leite é submetido a 130°C-150°C por curto tempo (2-4s), com conseqüente resfriamento até 32°C e envase asséptico.

Já Kessler (1981) atesta temperaturas entre 135-150°C por 2-6 segundos. Reuter (1989) cita que, em 1989 os processos para leite UHT estavam caracterizados entre 136-138°C por 2-8 segundos seguindo de resfriamento até 20°C.

No caso do leite UHT, após o processamento, teoricamente não há nenhum tipo de bactéria contaminante e/ou patogênica e, por isso, ele poderia ser estocado por até 180 dias, a temperatura ambiente. Existem dois tipos de equipamentos para este fim:

- **Aquecimento direto.** O produto é aquecido em contato direto com vapor culinário (MAFF, 1972 ; Lewis, 2000), fato que gera aquecimento rápido com diluição no alimento (considerado na estimativa do tempo de retenção). Há o pré-aquecimento a 70-80°C, seguido do aquecimento à temperatura desejada. Se o produto for processado a 145°C, a diluição considerada será de 10 a 15%. Em todos os casos a água excessiva é removida por um rápido resfriamento em câmara de expansão.
- **Aquecimento indireto.** O produto é aquecido pela troca indireta de calor com vapor (água de regeneração, vapor ou água pressurizada), mantido por 2 a 8 s na retenção e resfriado pela água de regeneração e/ou Chiller. Trocadores de calor a placas ou tubulares são utilizados para fluidos de baixa viscosidade. No entanto, o nível de depósito orgânico no trocador a placas é maior devido aos espaçamentos entre as placas serem pequenos, propiciando entupimento rápido (Burton, 1977). Para produtos contendo particulados é preferível um trocador de superfície raspada. Pressões de 1 bar são recomendadas para evitar que o ar altere as temperaturas durante o fluxo pelo



sistema resultando em um sistema não isotérmico. Estocagem e envase asséptico são essenciais para manter o produto estéril.

4.5 Regulamentações do leite UHT

A Food Milk e Dairy Hygiene Regulations (*Statutory Instruments, 1995*) declaram que:

- O leite UHT deve ser obtido pela aplicação de altas temperaturas por curtos períodos de tempo através de um sistema de fluxo contínuo de leite a fim de destruir microrganismos e seus esporos com mínima alteração das características físicas, químicas e sensoriais. Nos Estados Unidos, a ultrapasteurização de leite é descrita por 2 s a 138°C.
- Segmentos alternativos de retorno de fluxo devem ser utilizados quando a temperatura for inferior a programada. Os termopares e/ou termômetros devem ser monitorados e suas leituras de temperatura gravadas e mantidas por 3 meses.
- O leite processado termicamente deve ser envasado assepticamente, selado com segurança e apresentar rotulagem informativa.
- A amostragem do lote produzido deve satisfazer a contagem permitida.
- A especificação microbiológica inferior a 100 UFC/ml após 15 dias a 30°C ou 7 dias a 55°C deve ser verificada.

4.6 Os efeitos do tratamento térmico do leite fluído

Até o leite materno tratado termicamente tem o perfil de suas vitaminas alterado, como, por exemplo, o ácido fólico (*Tetra Pak, 2003*).

A pasteurização reduz 16% o teor dessa vitamina no leite materno e 12% no de vaca. Outro efeito do tratamento térmico é a **transformação dos aminoácidos** da forma L para a forma D — que é menos absorvida, afetando a qualidade protéica. Mas no leite de vaca comercial tal transformação não é significativa a ponto de inviabilizar sua comercialização (*Tetra Pak, 2003*).

Dependendo da temperatura à qual o leite é submetido, a **digestibilidade** de suas proteínas é mais ou menos afetada, sendo que as principais consequências são: alterações físico-químicas; reação de Maillard; desnaturação e coagulação. O leite longa vida sofre maior desnaturação das proteínas do que o pasteurizado, mas não diminui o seu valor nutricional (*Tetra Pak, 2003*).

Das **proteínas do leite**, as do soro são mais afetadas pelo calor. Já a caseína, principal proteína do leite, tem maior estabilidade. Dependendo da intensidade do processamento térmico, alterações nas proteínas do soro como sabores estranhos, gelatinização, formação de sedimento, incrustação na superfície de transferência de calor da tubulação, perda de valor nutricional e escurecimento do produto podem ocorrer. O principal efeito do tratamento UHT, nas caseínas, é a mudança na distribuição do tamanho das micelas que são aumentadas.

Quando as proteínas do soro são desnaturadas, formam complexos entre si, com as caseínas e/ou com os glóbulos de gordura (*Dunkley & Stevenson, 1987*).

Holdsworth (1992) afirmou que a formação de sedimento (floculação) aumenta quando o pH do produto está abaixo de 6,6 e a temperatura mais severa durante o aquecimento direto. Sob este enfoque, *Singh (2004)* discute os mecanismos que geram a coagulação, define o tempo de coagulação das proteínas β -lactoglobulina e κ -caseína a 140°C, e cita as seguintes mudanças no leite que promovem sua instabilidade a temperaturas de esterilização: decréscimo no valor do pH, deposição do fosfato de cálcio nas micelas, associação de proteínas com micelas de caseína, desfosforilação da caseína, dissociação e hidrólise da caseína, redução do potencial de hidratação, formação de ligação covalente.

A **lactoglobulina e a globulina** do soro do leite são as mais atingidas pelo calor. A albumina só é inativada a 143°C. Mas essas alterações não significam perdas nutricionais do leite. Já os **aminoácidos** não são afetados com o aquecimento do leite. A única exceção está na lisina, que sofre uma pequena alteração, menos que 4% com tratamento acima de 120°C (*Tetra Pak, 2003*).

O calor em combinação com a homogeneização reduz o tamanho dos **glóbulos da gordura** do leite, fato que melhora a digestibilidade do alimento. Além disso, com o maior tempo de armazenamento, o leite longa vida ou ultrapasteurizado tem aumento na concentração dos ácidos graxos livres, que em nada altera o seu valor nutricional. A única mudança é em relação ao sabor (*Tetra Pak, 2003*).

Fink & Kessler (1985) observaram um pequeno aumento no tamanho dos glóbulos de gordura quando o leite foi processado entre 90 e 125°C e uma diminuição nas mesmas quando a temperatura aplicada esteve entre 125-150°C.

Meier et al (1995) avaliaram a formação de HMF (hidroximetilfurfural) que aparece no início da reação de Maillard e de lactulose em leite UHT processado por aquecimento direto e indireto e concluíram que no aquecimento indireto a concentração de HMF, em $\mu\text{mol/l}$ é em média 16% maior do que no aquecimento direto, e a de lactulose, em mg/Kg , é de 6% maior muitas vezes ultrapassando o limite alemão permitido de 400mg/Kg (*Federal German Legislation, 1989*).

Além dos fatores citados acima, *Lewis & Heppell (2000)* acrescentam as possíveis alterações para leite UHT:

- Abaixamento do pH,
- Precipitação do fosfato de cálcio e redução do cálcio iônico,
- Sedimentação com alteração de textura (proteína, gordura, lactose e minerais),
- Desnaturação das proteínas e interação com a caseína,
- Desfosforilação e hidrólise da k-caseína com alteração das micelas,
- Escurecimento de Maillard,

- Sabor a cozido, a manteiga, sulfurado, caramelizado e/ou oxidado (ex. produção de sulfeto de hidrogênio)

White & Sweetsur (1977) caracterizaram a cinética de agregação das micelas de caseína em leite aquecido. Os autores observaram que a reação de agregação foi visível, no produto, entre temperaturas de 110 e 140°C sendo, aparentemente, de segunda ordem. A energia de ativação média, entre quatro amostras de leite, foi de 128.500 J/mol.

5. Aspectos do leite longa vida

5.1 Definição e variáveis de controle

O que se denomina leite longa vida é o leite ultrapasteurizado e não o leite esterilizado, como muitas vezes é confundido. A denominação correta do processamento, no Brasil, é o tratamento UHT-Ultra High Temperature, que traduzido seria UAT-Ultra Alta Temperatura (*MAPA 1997*).

Segundo a Portaria nº 370 de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (*MAPA, 1997*), o Leite Longa Vida, ou UHT, é o leite líquido homogeneizado, submetido durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150° C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo; imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C, e envasado assepticamente em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. A mesma Portaria, internalizou os padrões estabelecidos pela Resolução MERCOSUL GMC. nº 135/96, que aprovou a inclusão do citrato de sódio, como estabilizante, no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UHT.

Para o leite ser classificado como longa vida precisa ter matéria prima de boa procedência, conforme descrito no item 1, pois, o equipamento que processa este leite não opera, economicamente, com matéria-prima de má qualidade. O aspecto do leite longa vida deve ser líquido apresentando cor branca sem sabores ou odores estranhos.

Segundo a Portaria nº370 (MAPA, 1997) a tecnologia utilizada na produção do Leite Longa Vida permite que este seja isento de conservantes.

Finalmente, vale ressaltar que além do controle de qualidade, próprio da indústria de leite longa vida, todo processo deve ser controlado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) tanto para comercialização no território nacional quanto internacional.

Condições de operação como temperatura e tempo constituem as principais variáveis de controle do processamento de leite, mas *Lewis & Heppell (2000)* também citam:

- Qualidade da matéria prima (em termos de esporos termo resistentes);
- Controle das variáveis de transferência de calor;
- Tamanho do espaço livre na embalagem,
- “Ratio” de sólidos e líquidos,
- Viscosidade de líquidos,
- Integridade da selagem.

Zacarchenco (2000) analisou amostras de leite UHT brasileiro indicando processamentos comerciais entre 137°C e 150°C por 3 a 4 segundos, em trocadores de calor a placas ou tubulares com aquecimento direto ou indireto apresentando vida de prateleira de 3 a 4 meses.

5.2 A qualidade microbiológica da matéria prima

Mogens (2003) cita os principais contaminantes patogênicos do leite cru, bem como sua proveniência. Assim segue:

- **Via mastite:** *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.
- **Via contaminação fecal:** *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e leveduras.
- **Via estábulo e coxo:** *Bacillus cereus* e *Clostridium spp.*
- **Via ordenha e estocagem:** *Bacillus cereus*.

Uma pesquisa de opinião com consumidores de leite cru (Tetra Pak, 2001) indicou que o quesito saúde é o mais valorizado (50%) frente à aparência (24%) e praticidade (21%), quando se trata da compra do mesmo. Sob este enfoque, para avaliação dos aspectos de saúde, no leite cru, obteve-se como maior exigência a higiene durante a ordenha (39%) frente ao valor nutritivo (21%), pureza (18%), origem (10%), gordura (7%) e frescor (6%). Portanto, são especialmente importantes os procedimentos higiênicos sanitários adotados durante a produção e o armazenamento do leite na fazenda e nos centros de distribuição.

Problemas relacionados à saúde dos animais podem favorecer a presença de patógenos e/ou suas toxinas, resíduos de drogas veterinárias, além de elementos da reação inflamatória que são responsáveis por alterações físico-químicas do leite (*Embrapa, 2003*).

Em relação à falta de higiene, temperatura e tempo de estocagem do leite propiciam a contaminação e favorecem a multiplicação de microrganismos deteriorantes, que exercem sua ação deletéria, produzindo, por exemplo, enzimas proteolíticas e lipolíticas termoeestáveis. As alterações citadas resultam em prejuízos financeiros pela redução do rendimento industrial, alterações nas propriedades sensoriais e redução da vida de prateleira do leite. Afinal, as variabilidades na população e na concentração microbiana do leite cru, influenciam a qualidade do leite UHT (*Gillis et al, 1985*).

Através da Instrução Normativa nº 51, (*MAPA, 2002*) que desde primeiro de julho de 2005 já está em vigor, foram introduzidos requisitos que permitem, em alguns anos, alcançar padrões de qualidade consoantes aos adotados internacionalmente, bem como, foram introduzidas ou ampliadas exigências quanto à composição e à saúde/higiene, entre outros.

Queiróz & Rosa (2003) verificaram problemas na higienização das ordenhadeiras de propriedades rurais na região Sul do Brasil, já que 77% das amostras analisadas estavam acima do limite de controle estabelecido para contagem de aeróbios mesófilos e psicrotróficos (100UFC/ml). Tal fato demonstra a necessidade de adotar boas práticas de higiene para submissão a inspeções periódicas por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

5.3 A embalagem

No Brasil, o leite UHT é embalado, na maioria dos casos, em embalagem cartonada composta por seis camadas de materiais. As duas primeiras camadas mais internas são de polietileno, um plástico inerte que evita o contato do alimento com as demais camadas da embalagem. A terceira camada é de alumínio, cuja função é evitar a passagem de oxigênio, luz e microrganismos. Após esta, segue mais uma camada de polietileno que faz a adesão da camada de alumínio com a quinta camada, de papel. Esta última confere a resistência à embalagem, além das características gráficas personalizadas; sendo seguida pela última camada, de polietileno. O resultado é uma embalagem de alta qualidade, totalmente reciclável que confere proteção ao produto, mantendo o alimento distante de qualquer contato com as bactérias e microrganismos, bem como as possíveis sujidades do ambiente.

Petrus e Faria (1999) comentam que, em geral, a inadequação ou ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderia resultar no aumento da contaminação do produto em questão, reduzindo sua vida útil já que o grau de esterilização obtido em embalagens depende do nível de contaminação inicial, da área da embalagem e da eficiência do seu processo de assepsia.

A assepsia da embalagem é feita com um banho de hidroxiperoxido (H_2O_2), utilizada normalmente para higienização em serviços de saúde, permitindo um bom efeito esporicida em tempo viável de produção. Depois disso, a embalagem é submetida a um jato de ar quente a $270^{\circ}C$. Esse processo, além de secar o hidroxiperoxido, esteriliza a embalagem. Com essa temperatura, o hidroxiperoxido é totalmente evaporado e nenhum resíduo fica na embalagem.

5.4 O envase asséptico

O envase de Leite Longa Vida é uma etapa de fundamental importância, pois não pode comprometer a integridade do produto, por isso, deve ser realizado em ambiente asséptico sendo que os equipamentos de envase, assepsia do material de embalagem e o processamento térmico do produto devem estar conectados, apresentarem grau sanitário e poderem ser esterilizados antes da produção, bem como, serem capazes de manter sua condição estéril durante todo o período de produção de modo viável sob o ponto de vista econômico e energético (Marcy & Nagy, 2000). É fundamental que não haja qualquer contaminação durante o envase. Portanto este deve ser realizado em condições completamente assépticas.

O enchimento asséptico tem como princípio envasar, em atmosfera estéril, o leite ultrapasteurizado em embalagens que passaram pelo processo adequado de assepsia. Esta tecnologia permite que o Leite Longa Vida possa ser mantido fora da geladeira, antes de aberto, por até 180 dias depois do envase. A vida de prateleira é estabelecida pelo fabricante, o que explica a diversidade dentre as marcas.

5.5 A limpeza CIP (*Cleaning in Place*)

A limpeza correta das superfícies é essencial para remover todas as partículas que funcionam como meio de propagação de bactérias. Para Stinson & Forwalter (1978), a limpeza eficiente dos equipamentos representa 90% de todo o trabalho de sanitização, enquanto que a aplicação dos sanitizantes permanece em 10%.

Para equipamentos e sistemas fechados como silos, evaporadores, pasteurizadores, tanques pulmão e linhas contínuas de processo, os mesmos autores recomendam como procedimento de limpeza após esterilização e processamento térmico, a circulação de compostos alcalinos e depois de ácidos através de bombas, sprays e/ou tanques CIP com enxágües intermediários.

No procedimento de limpeza de qualquer linha de processamento asséptico várias etapas estão envolvidas, segundo *Nelson (1981)*:

- Um primeiro enxágüe, com água a 38-49°C, para retirar o produto e seus resíduos mais grosseiros da linha além de dissolver resíduos solúveis e liquefazer resíduos gordurosos,
- A rápida circulação de um detergente que remova resíduos sólidos. Age esporadicamente para remover sólidos que se acumulam independente da aplicação dos álcalis,
- Um segundo enxágüe para remover o detergente e os resíduos sólidos suspensos e/ou dissolvidos,
- Um tratamento microbiocida com vapor, água quente ou agentes químicos. Lembrando que resíduos sólidos não removidos podem exercer efeito protetor ao microrganismo, frente ao agente químico, como também dissipar a atividade do agente devido a sua interação química.

- Drenagem e secagem para minimizar as condições de proliferação microbiana enquanto o equipamento está parado.

Kessler (1981) sugeriu um procedimento CIP para linhas produtoras de leite pasteurizado e/ou UHT:

- Enxágüe com água a várias temperaturas e pressões, em função do processo aplicado, com vazão suficiente para gerar um regime turbulento,
- Ação mecânica de escovação e/ou raspagem de material aderido,
- Circulação de detergente alcalinos com aditivos que decomponham depósitos de proteínas, emulsifiquem e saponifiquem os resíduos de gordura, além de hidratarem as superfícies e as partículas sólidas,
- Enxágüe com água aplicando vazão suficiente para gerar um regime altamente turbulento e remover possíveis resíduos,
- Circulação de sanitizantes ácidos para dissolver pedras de leite como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,
- Enxágüe com água com vazão suficiente para gerar um regime altamente turbulento e remover resíduos remanescentes,
- Enxágüe final com água de boa qualidade.

Holdsworth (1992) compilou uma tabela apresentando parâmetros cinéticos de certos *Bacillus* frente a sanitizantes como peróxido de hidrogênio e ácido peracético. Para *B. cereus* reportou $z = 22,4^{\circ}\text{C}$ e $E_a = 76.600 \text{ J/mol}$ para sua eliminação com peróxido de hidrogênio. Já para *B. stearothermophilus*, frente a ácido peracético 0,04-0,2% (p/v) reportou $z = 26,6^{\circ}\text{C}$ e $E_a = 64.500 \text{ J/mol}$. É importante ressaltar que, para ambos os microrganismos os valores z frente aos sanitizantes superam seus respectivos valores z frente ao calor estático em mais do que 100%.

Parte 2: A contaminação em leite fluido e a identificação de *B. cereus*

6. Ocorrência de contaminação bacteriana em leite fluido

6.1 A contaminação nos equipamentos de produção

As três principais causas de contaminação microbiana em plantas processadoras de leite UHT compõem temperatura de esterilização insuficiente frente ao alvo biológico, ineficiência durante a esterilização do equipamento e o processo e/ou falha no procedimento de assepsia no envase (*Mehta, 1980*).

A contaminação microbiológica em leite pode ser incrementada pela contaminação em equipamentos utilizados na manipulação, processamento e/ou envase, pela habilidade dos microrganismos proliferarem nestas superfícies (*Speers et al, 1984*). Fatores que podem influenciar a interação entre as bactérias e as superfícies dos equipamentos incluem os diferentes materiais utilizados na construção de cada equipamento, a microflora viável do leite que estará em contato com cada superfície, bem como, as características das células, o potencial de absorção da matéria orgânica pelas superfícies e as condições do ambiente (*Meadows, 1971*). Enquanto a microbiota da planta de processo é constituída, na maioria, por bactérias mesófilas, os ambientes de ordenha, estocagem e transporte constituem fontes de bactérias psicrotróficas, sendo que a adesão das Gram negativas é consideravelmente maior do que a das Gram positivas, mas isto não inviabiliza a contaminação por microrganismos esporulados patogênicos (*Lewis & Gilmour, 1987*).

6.2 *Bacillus* spp. psicrotróficos em leite cru

Em 1960, *Eddy* definiu o termo psicrotrófico como aquele relacionado com os microrganismos que podem desenvolver-se a 5°C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. No entanto *Jay (1992)* cita que a partir de 1992 foi universalmente padronizada a temperatura de 0 a 7°C para o desenvolvimento destes organismos. Por várias décadas bactérias psicrotróficas têm sido reconhecidas como contaminantes de leite fluído estocado e distribuído sob refrigeração. Muita ênfase tem sido focada na contaminação pós-pasteurização. A maioria dos contaminantes é Gram-negativa, não esporulada, estando aderida a superfícies de equipamentos e presentes na fonte de suprimento de água. Estes microrganismos são termosensíveis e muitos estão associados a proteinases e lipases que resistem, moderadamente, a tratamentos térmicos, podendo causar deterioração (*Meer et al, 1991*).

Com o incremento do controle na contaminação pós-pasteurização por organismos termo sensíveis, mais atenção tem sido dispensada para os contaminantes esporulados e psicrotróficos, bem como, para o potencial de impacto na qualidade do leite e nas suas propriedades durante o tempo de vida de prateleira. Psicrotróficos termoresistentes incluem membros dos gêneros *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Micobacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus*, sendo que as espécies de *Bacillus* predominam. O último gênero microbiano poderia ser introduzido no leite através da fonte de suprimento de água, das tetas dos animais, do solo e de depósitos de leite que poderiam ficar incrustados nos tanques, bombas e equipamentos de processo.

Além dos fatores citados, ainda há a possibilidade de germinação e crescimento vegetativo pós-pasteurização, já que processos térmicos de pasteurização podem permitir a sobrevivência dos esporos com conseqüente crescimento pós-germinativo. Estes organismos produzem enzimas, similares as dos Gram negativos, cuja atividade resulta no desenvolvimento de odores estranhos e outros defeitos de qualidade sensorial nos produtos de leite ou a base deles (*Meer et al, 1991*).

Assim, a associação entre propriedades de termoresistência e de psicrotrofia, em um único gênero de microrganismo contaminante, exposto à pasteurização e tempos estendidos de estocagem refrigerada, representa risco potencial de deterioração em produtos lácteos e, por isso a necessidade de estudá-las concomitantemente.

Mikolajcik & Simon (1978) trabalharam com leite pasteurizado a 80°C por 12 min que foi mantido resfriado a 7°C por 7 dias. Realizaram contagens de bactérias mesofílicas (32°C) e psicrotróficas (7°C) no início da incubação e após o sétimo dia e observaram que a concentração dos psicrotróficos foi 5 vezes maior do que a dos mesófilos.

6.3 Ocorrência da contaminação microbiana em leite cru

O leite cru é um excelente meio de cultura para os microrganismos devido, principalmente, à sua riqueza em nutrientes, valor de pH próximo a neutralidade e alta atividade de água e ausência de tratamento térmico. Assim, intoxicações e infecções podem ser transmitidas aos consumidores (*ABLV, 2005*).

A intoxicação caracteriza-se pela presença de toxinas, produzidas por microrganismos contaminantes do leite, que podem resistir à acidez estomacal e até a altas temperaturas. À ação destas toxinas são atribuídos os sintomas que aparecem rapidamente, em questão de horas, na maior parte das vezes.

A infecção caracteriza-se pela sintomatologia que aparece em consequência da ingestão do microrganismo. A patogenia pode ser causada pela ação direta do microrganismo (caráter invasivo) ou ainda pela produção de toxinas, por estes microrganismos após a colonização do intestino (**toxi-infecções**) (ABLV, 2005).

Desde 1985, o crescimento de espécies de *Bacillus*, em leite cru, foi reportado em países europeus (IDF 357/2000), mas antes disso, Hileman (1940); Thomas et al (1950) e Jayne-Williams & Franklin (1960) estudaram a natureza da contaminação de leite por organismos formadores de esporos, principalmente *Bacillus* spp, bem como, os pontos críticos (ar, solo, água, animais, currais, ração, equipamentos de ordenha, bolsas de transporte e linhas de processo) de toda produção. Como resultado encontraram respectivamente linhagens mesofílicas e termofílicas de *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. megaterium*, nunca em concentrações superiores a 10^5 UFC/ml, necessárias para produção de toxinas, no caso de *B. cereus*.

Já Grinsted (1955) e Ridgway (1958) verificaram a contaminação de leite cru e concluíram que *Bacillus* como *B. licheniformis* e *B. subtilis* constituíam as espécies aeróbias e mesófilas freqüentemente encontradas.

Tratando-se de um *Bacillus* patogênico, *Te-Giffel et al (1995)* investigaram as possíveis fontes de contaminação do leite cru por *Bacillus cereus* na Irlanda, durante um ano, em seis diferentes propriedades rurais. Para tanto, analisaram amostras do ar, solo, grama, camas de animais, alimentos, água de beber e fezes dos animais presentes.

Bacillus cereus foi isolado de todas as amostras e 43% das cepas foram capazes de crescer a 7°C (a partir de esporos provenientes das fezes, solo, água de beber e camas de animais), demonstrando a possível contaminação por linhagens psicrótróficas até então desconsideradas.

Em 1962, *Martin et al* reportaram a presença de *B. cereus* em 37% das amostras de leite cru coletadas em fazendas de Ohio, EUA. Já *Ahmed et al (1983)* identificaram *B. cereus* em 3,75% das amostras de leite cru obtidas em lojas de varejo em Madison, EUA. Em Minas Gerais, no Brasil, *Picinin et al (2000)* reportaram a concentração média de 10^5 UFC/ml para contagem total de organismos mesófilos e psicrótróficos em leite cru resfriado a partir de ordenha manual e mecânica.

6.4 Ocorrência de contaminação microbiana em leite pasteurizado

Dentro da cadeia de produção do leite pasteurizado, dez (10) espécies de *Bacillus* foram isoladas de feno, incluindo *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, e *B. subtilis*, no entanto a incidência é baixa devido à competição por substrato, bem como ao efeito das altas temperaturas no ambiente (*Woolford, 1984*).

Durante o verão europeu esporos de *B. cereus* são comumente encontrados no produto final, sendo que a principal fonte de contaminação vem da sujeira do úbere da vaca (Christiansson *et al.*, 1996). Ahmed *et al* (1983) também identificaram *B. cereus*, por isolamento em meio KG (Kim & Goepfert) com gema de ovo, em 8.3% das amostras de leite pasteurizado, obtidas nas mesmas lojas de varejo em Madison, E.U.A. Ternstrom *et al* (1993) reportaram 77% de embalagens contaminadas de leite pasteurizado, estocado a 5 e a 7°C, com *B. polymyxa* (5 e 7°C) e com *B. cereus* (7°C), ambos fermentando o leite. Como sugestões indicaram temperaturas de estocagem inferiores a 5°C e análises microbiológicas nos pontos críticos da linha de processo a fim de identificar a possibilidade de uma contaminação cruzada.

É conhecido que *B. cereus* pode sobreviver a processos de pasteurização, pois sua resistência térmica é de 5,5 min a 100°C (Mossel *et al*, 1995). Sob este enfoque, Notermans *et al* (1998) reportaram a ocorrência de 10^4 - 10^5 UFC de *B. cereus*/ml de leite pasteurizado em 5% da amostras analisadas.

6.5 Ocorrência de contaminação microbiana em leite longa vida

Grinsted (1955) e Ridgway (1958) indicaram que *B. subtilis* predomina na contaminação de leite esterilizado. Mostert *et al* (1979) analisaram a contaminação por *Bacillus* em 169 amostras leite UHT incubadas a 30°C por 14 dias ou a 55°C por 7 dias e, mediante identificação por temperatura de crescimento, hidrólise do amido, decomposição da caseína e crescimento em 7% de NaCl e em Agar Anaeróbio, atestaram que 48,3% dos isolados eram *B. cereus*, e 10,3% *B. licheniformis* entre cepas mesofílicas e psicrotólicas.

É muito rara a sobrevivência de *B. cereus* a temperaturas de 145-150°C. Existe apenas um relato na literatura de *Franklin (1970)* que cita o isolamento de uma cepa ultra-resistente de *B. cereus* sobrevivendo em creme de leite processado a 140°C por 2 s. Este fato foi considerado surpreendente já que *B. cereus* genericamente apresenta baixa resistência térmica, fato que o exclui do grupo dos microrganismos com ultra resistência térmica. Em 1981, *Westhoff & Dougherty* relataram a ocorrência de 16 cepas de *Bacillus* isoladas de nove embalagens de leite UHT, sendo que 14 delas eram mesofílicas (temperatura ótima entre 37 e 45°C) e 2 psicrotróficas (temperatura ótima 10°C). As cepas foram identificadas como *B. subtilis* e *B. cereus*, no entanto a maioria delas apresentou um ou mais traços bioquímicos e fisiológicos atípicos.

No Brasil, a *ABLV (1997)* reportou o isolamento de *B. sporothermodurans*, na concentração média de 10^5 UFC/ml, a partir de amostras de leite UHT de fazendas de São Paulo e do Paraná; no entanto as amostras não apresentavam alterações sensoriais. *De Rezende (1998)* analisou 120 amostras de leite integral UHT produzidas no Brasil, na procura por espécies do grupo *cereus*. Apesar da metodologia e forma de análise dos dados serem inconsistentes e, por isso, devendo ser revisadas, o autor indicou uma positividade em 34,17% do total de amostras analisadas, sugerindo a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas. *Foschino et al (1990)* e *Kessler et al (1994)* reportaram problemas de esterilidade de leite UHT causados pela presença de esporulados ultra-resistentes ao calor, identificados como *B. sporothermodurans*.

Já *Zacarchenco et al (2000)* analisaram 100 embalagens de leite UHT na região de Campinas-SP, Brasil, distribuídas entre nove empresas processadoras. Como resultado, 45% das embalagens estavam com contagens acima do limite de 100 UFC/ml, sendo que 71% delas eram provenientes de processos térmicos com aquecimento indireto. De um total de 300 culturas isoladas, 24 delas foram identificadas como *B. sporothermodurans*.

Guillaume-gentil et al (2002), a partir da incubação (37°C por 5-7 dias) de 2.113 embalagens de leite UHT advindas de supermercados da América do Sul, América Central e América do Norte, identificaram 13 embalagens contaminadas com *B. sporothermodurans*.

7. Caracterização do grupo *cereus*

7.1 Características relevantes ao nível de gênero

Bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes Gram positivos, com 0.5-2.5x 1.2-10µm, arrançados em pares ou cadeias, geralmente móveis pelo flagelo peritriquo e formadores de esporos ovais ou, em alguns casos, esféricos ou cilíndricos; sendo todos muito resistentes a condições adversas (calor, aw, pH, concentração salina, sanitizantes). Os esporos podem estar na posição central, sub terminal ou terminal.

As células vegetativas de *Bacillus* desenvolvem-se sob condições aeróbias ou anaeróbias facultativas, com o metabolismo fermentativo ou respiratório. A maioria das espécies apresenta catalase positiva e redução do nitrato como características comuns.

No entanto, há grande diversidade bioquímica entre os membros do gênero *Bacillus*, proporcionalmente aos diferentes requerimentos nutricionais e condições de crescimento de cada espécie. No entanto, a minoria das espécies de *Bacillus* é patogênica aos invertebrados ou aos vertebrados como o homem e os animais (Sneath, 1986; Holt et al, 1994).

O habitat primário dos *Bacillus* é o solo, onde participam do ciclo biológico de carbono e nitrogênio. Estas bactérias tornam-se inativas em ambientes de solo pobre e, metabolicamente ativas quando expostas a certos substratos e condições disponíveis favoráveis (Clarholm, 1985; Sneath, 1986). Concentrações superiores a 10^5 - 10^6 esporos/g têm sido encontradas no solo; este nível é muito preocupante, pois, a partir deste habitat, os esporos poderiam contaminar todo o ambiente sendo disseminados na natureza por veículos comuns como a água, o esgoto, as fezes de animais e do homem (Sneath, 1986).

7.2 Características relevantes ao nível de espécie

Bacillus cereus constitui-se de um bastonete grande disposto em cadeias curtas e/ou longas, com esporos elipsoidais, na posição central a subterminal sem intumescimento do esporângio. É aeróbio facultativo, com pH de crescimento entre 4,9 - 9,3; mesofílico típico com temperatura máxima entre 48-50°C e temperatura mínima de crescimento entre 4-5°C.

Em meio MYP (Agar Manitol gema de Ovo com Polimixina-DIFCO) suas colônias apresentam zona de precipitado em decorrência da lecitinase positiva, bem como, coloração rosa, pois o manitol não é fermentado. Este meio é seletivo para *B. cereus* já que o mesmo é resistente a Polimixina (FDA, 1998).

Bacillus cereus pode produzir dois tipos de toxinas, aparentemente diferentes, quando contamina alimentos em concentrações maiores do que 10^6 UFC/g (FDA, 1998): o tipo emético (intoxicação) e o diarréico (toxi-infecção) (Kramer & Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993; Granum, 1994).

A toxina diarréica, cuja molécula tem um peso de 38-39,5 Kda, é produzida na fase exponencial e, principalmente, no início da fase estacionária do crescimento. Algumas linhagens de *B. cereus* produzem a toxina quando submetidas a temperaturas de 4°C, outras entre 6 e 21°C. Se o alimento (milho, amido, batata, arroz, pudim...), é ingerido quando a célula vegetativa se lisa no intestino, a toxina é liberada. Neste caso, os sintomas da intoxicação são dores abdominais constantes e diarréia fraca após 4 a 16 horas da ingestão, permanecendo por até 24 horas, mas sem febre (Jay, 1992; FDA, 1998).

A toxina emética apresenta baixo peso molecular (5.000da), sendo estável frente à temperatura e variação de pH. Sua produção ocorre durante a esporulação do microrganismo cujas linhagens apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35-40°C. A síndrome emética é mais grave e mais aguda. A incubação varia de 1 a 6 horas com duração de até 5 horas. O alimento mais implicado é o arroz frito ou insuficientemente aquecido (Jay, 1992; FDA, 1998). Além de toxi-infecções de origem alimentar, este microrganismo pode ser responsável pela degradação de leite e cremes (Rusul & Yaacob, 1995). Mediante o Ministério da Saúde, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na Resolução-RDC nº12 de 2/01/2001 de Padrões Microbiológicos para Leite UHT e derivados, a ausência de patogênicos deve ser verificada durante a estocagem desses produtos.

Bacillus mycoides também chamado de *Bacillus cereus* var *mycoides* apresenta-se com características semelhantes às de *B. cereus*, no entanto não produz toxinas e tem crescimento rizóide (FDA, 1998).

Bacillus thuringiensis é um mesófilo típico aeróbio ou anaeróbio facultativo, entomopatogênico e naturalmente encontrado no solo. Como *Bacillus cereus*, esta espécie pode manter-se em latência, sob condições adversas, mas na forma de endosporos elipsoidais ou cilíndricos em posição central com esporângio intumescido. Durante a fase de esporulação, sintetiza proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula (Peferöen, 1997).

Os cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, chamadas de endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs), com massa variável entre 27 a 140 kDa (Bernhard et al., 1997) e altamente tóxicas e específicas. Por sua alta especificidade é inócua para a maioria dos organismos, com exceção de alguns insetos como larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros sendo, por isso, produzidas industrialmente como inseticida biológico (Monnerat & Bravo, 2000 ; Siegel, 2001).

As endotoxinas constituintes dos cristais são protoxinas solubilizadas e proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores no trato digestivo das larvas suscetíveis, que se associam a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando conseqüente lise osmótica pela formação de poros na sua membrana (Schnepf et al., 1998).

Mediante estas informações, seria possível diferenciar linhagens de *B. thuringiensis* de *B. cereus*. No entanto, nem todas sempre produzem os cristais de toxina e, portanto a diferenciação não seria bioquimicamente possível.

Bacillus anthracis constitui-se de um organismo aeróbio, esporulado e capsulado, imóvel e sem atividade hemolítica. Cresce normalmente nos meios comuns como o NA (Ágar Nutriente), produzindo em 24 h a 37°C colônias irregulares, acinzentadas e com aspecto de vidro fosco.

Sendo pouco exigente *Bacillus anthracis* cresce saprofiticamente em solos ricos em matéria orgânica, com tendência a alcalinidade e, havendo temperatura e umidade favorável, pode produzir grandes quantidades de esporos na superfície do solo. A presença de nutrientes orgânicos propicia não só a viabilidade dos esporos, como também estimulam sua germinação e crescimento pós-vegetativo com proliferação de forma saprófita no meio ambiente.

Este microrganismo produz uma exotoxina protéica formada por três componentes básicos: antígeno protetor (AP); fator letal (FL) e fator edema. Esta é uma toxina complexa com atividades tóxicas e imunizantes diferentes. Os seus fatores podem estar associados ou não, expressando ou não atividade (Twiehauss, 1970).

B. anthracis é patógeno de animais e matará os mesmos, quando inoculado no hospedeiro, em até 72 h. No homem, tal toxina pode se manifestar de três maneiras:

Forma cutânea, caracterizada pela febre alta e reação inflamatória intensa, com área de necrose central. A rápida evolução dessa lesão pode determinar uma septicemia que, caso não seja tratada rapidamente leva o indivíduo ao coma e à morte em horas.

Forma gastrointestinal, que ocorre após ingestão de carne contaminada (crua ou mal cozida). A germinação dos esporos pode originar úlcera de orofaringe levando a linfadenopatia e edema.

Forma inalatória, os esporos inalados atingem os alvéolos onde são fagocitados e transportados via linfática, onde a germinação ocorre em até 60 dias.

A forma vegetativa do *B. anthracis* é pouco resistente, sendo eliminada pela pasteurização e/ou desinfetantes comuns aplicados em plantas industriais e pela ação da putrefação; entretanto, os esporos podem resistir à dessecação por muitos anos, à fervura por 10 min e ainda ao calor seco por 1 h a 120°C; sendo, portanto, sua resistência térmica considerável dentro da família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus*.

7.3 Características diferenciais do grupo *cereus*

Tabela I: Características diferenciais do grupo *cereus* (FDA, 1998)

Características	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/- ^b	+/-	- ^c	-
Redução do nitrato	+	+/-	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+/-	- ^d
Resistência a lisozima	+	+	+	+
Reação com gema de ovo	+	+	+	+
Utilização anaeróbia da glicose	+	+	+	+
Reação VP	+	+	+	+
Produção de ácido por manitol	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	- ^d
Características patogênicas	Produção de enterotoxina	Cristais de endotoxina	Crescimento rizóide	Patogênico

^a+, 90-100% das cepas são positivas. ; ^b+/- 50-50% das cepas são positivas.

^c- 90-100% das cepas são negativas. , ^d- a maior parte das cepas são negativas.

B. cereus é diferenciado de *B. mycoides* pelo crescimento rizóide e de *B. anthracis* pela hemólise do sangue. Como nem todas as linhagens de *B. thuringiensis* produzem cristais de toxina sua correta diferenciação bioquímica de *B. cereus* fica comprometida.

8. Condições de crescimento e recuperação de *B. cereus*

Johnson et al (1982) trabalharam com germinação e resistência térmica de esporos de *B. cereus* associados com as toxinas diarreicas e eméticas e verificaram que esporos com baixos níveis de germinação desenvolvem-se melhor e mais rapidamente em meio MYP quando comparado com o meio TSB (Caldo Trypticase Soja).

Mossel et al (1967) consideraram meio de cultura MYP como o que mais recuperou colônias de *B. cereus* frente a outras quatro formulações testadas; portanto sua eficácia foi comprovada mesmo a baixas concentrações (10 UFC/ml), garantindo a recuperação de possíveis células a partir das amostras. Sob este aspecto van Netten & Kramer (1992) elaboraram uma revisão dos principais meios seletivos para *B. cereus* indicando os meios PEMBA (Agar manitol gema de ovo azul de bromotimol) e MYP como os de maior e mais fácil recuperação do microrganismo em questão. No entanto, Ragasamy et al (1993) verificaram forte tendência de espalhamento das colônias plaqueadas em PEMBA. Para quantificação de células vegetativas de *B. cereus*, a partir de amostras de alimentos, o procedimento descrito no manual FDA (1998) também cita o meio MYP como melhor e mais seletivo. Já Gonzales et al (1995) confirmaram a afirmação de Rajkowski e Mikolajcik (1987) atestando que o meio NA foi reconhecido como o melhor meio de cultura para recuperar esporos injuriados de *B. cereus* quando comparado com TSA (Tryptona Soja Agar), PCA (Ágar Contagem Total) e MA (Ágar Leite).

Mais recentemente, o Meio Chromogenic *Bacillus cereus* Agar (Oxoid, 2005) incorpora o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucopiranosídeo que é clivado pela enzima β -glucosidase, presente em *B. cereus*, resultando na formação de colônias azul/verde a fim de recuperar, caracterizar e distinguir este patógeno de espécies similares, mais especificamente *B. thuringiensis* que é bioquimicamente idêntico a *B. cereus*. Além disso, o meio possui Polimixina B e Trimetoprim. A combinação destes dois antibióticos tem sido mais eficiente do que somente a adição da Polimixina.

9. Aspectos da contaminação de *B. cereus* em leite

9.1 Efeitos da contaminação no produto final

Quando *B. cereus* está presente no leite, em embalagem cartonada, apresenta atividade proteolítica que denota formação de coágulo doce e brando (sem acidificação em “Litmus milk”), com hidrólise da caseína, no produto. Este tipo de deterioração é somente verificado quando a embalagem é aberta e o leite servido (*Cornell University, 1983*)

9.2 Medidas de controle

Para evitar linhagens psicrotóxicas de *B. cereus* que apresentem resistência térmica, *Collins (1981)* sugere manter o número destes organismos em menor concentração possível, selecionar agentes sanitizantes eficazes e suas concentrações para as superfícies em contato com o leite (50-110 ppm de clorados ou 25 ppm de iodosforados), monitorar os procedimentos de limpeza CIP (análise da água de enxágüe e remoção de biofilmes estacionários) e promover um rápido e eficiente resfriamento do leite cru, a temperaturas iguais ou inferiores a 4,4°C.

Segundo *Doyle (1988)*, esporos de *B. cereus* em alimentos seriam destruídos pelo processamento de esterilização em autoclave (sob pressão), aplicação de tratamento térmico equivalente ou irradiação. No entanto, alguns destes processos poderiam inviabilizar a comercialização dos produtos por alterações sensoriais; nestes casos, processos complementares seriam incluídos.

A presença de *B. cereus*, em quantidades de 10^2 UFC/ml não constitui problemas de saúde pública já que a ingestão desta população microbiana não causará qualquer enfermidade no consumidor. No entanto, a prevenção do problema requer o controle da população inicial na matéria prima, das condições higiênico-sanitárias do processamento, da possibilidade de germinação dos esporos, bem como, da prevenção do crescimento das células vegetativas nos alimentos cozidos/aquecidos e prontos para o consumo e, finalmente, das condições de estocagem.

Os alimentos convenientemente cozidos, consumidos quentes imediatamente após a cocção são inócuos. A maioria dos procedimentos de cocção, incluindo cozimento com e sem pressão e fritura, geralmente destroem as células vegetativas dos microrganismos e, provavelmente, os esporos. Mas cocção a temperaturas de 100°C ou inferiores pode induzir e permitir a sobrevivência de alguns esporos após ativação e germinação.

As condições que favorecem o crescimento de *B. cereus*, nos alimentos a base de leite, incluem um procedimento que ative os esporos, por temperatura, pH, atividade de água e/ou outros fatores, induzindo a germinação e crescimento pós-germinativo, que ocorrerá se houver um esfriamento inadequado e/ou lento, bem como, estocagem de grandes volumes entre 10 e 50°C . Assim, para evitar a germinação de *B. cereus* seria interessante manter o produto em condições de temperatura abaixo de 10°C , em combinação com pH e atividade de água. É importante acrescentar que a toxina emética não é destruída pelo efeito térmico da cocção (ICMSF, 1996).

10. Identificação de *Bacillus cereus* em leite fluido

O FDA (1998) sugere a série bioquímica diferencial (motilidade, crescimento rizóide, atividade hemolítica, produção de cristais de toxina) para distinguir membros do grupo *cereus*, pois só a série confirmatória não o faz.

O sistema API (*bioMérieux, 1999*) pode ser utilizado para identificação rápida e precisa de espécies de *Bacillus* já que permite o estudo do metabolismo de certos carboidratos; porém seus resultados não estão totalmente elucidados devido a variabilidade metabólica de determinadas linhagens verificada ao longo do tempo. O kit API 50 CHB contém 50 micro tubos contendo zonas anaeróbias para o estudo da fermentação e zonas aeróbias para o estudo da oxidação ou assimilação. O primeiro tubo não contém qualquer substrato sendo utilizado como controle negativo. Os outros 49 tubos contém uma quantidade definida de substrato desidratado. Após preenchimento dos tubos com a suspensão vegetativa de interesse, ajustada na escala 2 de McFarland, e incubação, a leitura é realizada num banco de dados, pois o sistema API é baseado num estudo de 600 cepas, selecionando os 80 testes com maior reprodutibilidade e valor discriminatório. Porcentagens de similaridade superiores a 80 convergem à identificação positiva mediante o padrão. No entanto, a identificação de *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* não está totalmente esclarecida e diferenciada segundo Logan (1984).

O panorama de aplicação de uma técnica de identificação utilizando espectrofotômetros, não obstante, tem apresentado mudanças, desde meados dos anos 80.

Além da substituição gradual dos equipamentos inicialmente empregados, denominados espectrofotômetros dispersivos, por espectrofotômetros com transformada de Fourier (FTIR), começam a desenvolverem-se aplicações na região do infravermelho próximo (NIR).

A técnica de espectroscopia no infravermelho (IV) próximo apresenta crescimento nas linhas de produção de fábricas (*Revista Química, 2004*). A espectrofotometria é o processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético.

A porção do espectro percebida pelo olho humano (região visível) está compreendida entre comprimentos de onda de 380 nm e 780 nm e, acima desse limite, até cerca de 50.000 nm (entre regiões do visível e das microondas), a radiação é chamada infravermelha (IV). A região do infravermelho entre 2,5 mm e 15,0 mm (2.500 nm a 15.000 nm) concentra o maior interesse dos químicos, embora as regiões do infravermelho próximo (0,7 mm a 2,5 mm) e do infravermelho distante (14,3 mm a 50 mm) venham angariando maior atenção, pelos pesquisadores, na última década (*Revista Química, 2004*).

O objetivo da espectroscopia de absorção no IV é a determinação dos grupos funcionais de um material. Cada grupo absorve em frequência característica de radiação na região do IV. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de IV, caracteriza grupos funcionais de um padrão ou de um material.

Mesmo moléculas mais simples podem produzir espectros extremamente complexos. O analista utiliza este fato vantajosamente, comparando o espectro de um composto desconhecido com o de uma amostra conhecida. Determinado o espectrograma da amostra desconhecida, a correlação pico a pico constitui boa prova de identidade, visto ser pouco provável a coincidência de espectros de dois compostos diferentes.

Embora o espectro no IV seja característico da molécula como um todo; certos grupos de átomos originam bandas mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de grupos funcionais que permite a obtenção de informações úteis para a identificação de estruturas, através de simples exame do espectro e consulta a tabelas.

Os espectros de IV, em conjunto com outros dados espectrais, são úteis para a determinação das estruturas de moléculas (*Revista Química, 2004*).

Segundo *Lewis & McElhaney (1998)*, a Espectrofotometria Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica baseada em um poderoso e sensível espectrofotômetro, contudo relativamente barato, que pode estudar a estrutura e a organização de fosfolipídeos em membranas celulares. Esta técnica denota a informação sobre todas as regiões da molécula do fosfolipídeo simultaneamente. Nesta revisão eles estudaram a estrutura e a organização dos fosfolipídeos em géis e fases cristalinas com alta resolução estrutural e conformacional sobre moléculas do fosfolipídeo em agregados.

A radiação infravermelha no FTIR é produzida por uma fonte aquecida eletricamente, usualmente um globo cuja temperatura alcança de 1.000°C a 1.800 °C.

O global é um pequeno bastão de carbetto de silício com máximo de radiação na região de 5500 cm^{-1} a 5000 cm^{-1} (1,8 – 2,0 mm), reduzindo-se por um fator de, aproximadamente, 600 na medida em que se aproxima da região de 600 cm^{-1} (16,7 mm).

Os elementos chave para se operar um FTIR são a estabilidade da fonte, a resposta do detector e o alinhamento do interferômetro. Flutuações em qualquer um dos casos levam a medidas de transmitância imprecisas, enquanto que desvios no alinhamento podem reduzir o rendimento a níveis em que realinhamentos se tornam necessários. O grau de convergência tolerado depende da resolução requerida. Alta resolução requer baixa convergência, para evitar variações na diferença de caminho para diferentes partes do feixe que inviabilizariam um resultado significativo. Ao se relacionar dois espectros, é importante que velocidade, filtros, abertura e funções de apodização sejam os mesmos para ambos. Os valores de ganho e o número de *scans* coletados podem ser diferentes, dependendo da relação convergência e resolução. Se os espectros (microrganismo padrão e microrganismo estudado) convergem com resolução aceitável, a identificação do microrganismo é confirmada.

Em 1998, *Schraft & Griffiths* utilizaram a transformada de Fourier para avaliar a identificação de *B. cereus* dentre *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, 5 *Bacillus* spp. e 5 gêneros diferentes de *Bacillus* a partir de Brain Heart Infusion (BHI) e Trypticase Soy Agar (TSA). No resultado as cepas de *B. cereus* produziram picos característicos de absorbância entre 1738 e 1740 cm^{-1} . Nenhum outro isolado apresentou faixa semelhante.

Em conclusão afirmaram que membros do grupo *B. cereus* apresentaram picos com diferentes formas e tamanhos entre 1.800 e 1.500 cm^{-1} , sugerindo que o método pode ser aplicado na rápida identificação de espécies inter relacionadas.

No mesmo ano, *Beattie et al (1998)* utilizaram a Transformada de Fourier em conjunção com análise de variação canônica para discriminar cepas de *Bacillus* spp. que incluíam *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*. Após análise dos resultados, estes autores afirmaram que o método discriminou as espécies com 95% de confiança.

A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de sequência de DNA: a reação de polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction). Esta técnica se baseia na capacidade da enzima polimerase replicar sequências de DNA sob certas condições laboratoriais a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (primers específicos) que flanqueiam a sequência genética dos microrganismos de interesse. Através de variações alternadas e cíclicas de temperatura, que permitem a desnaturação do DNA (exemplo: 92°C, abertura da fita dupla de DNA), anelamento (exemplo: 54°C, pareamento do primers) e extensão (exemplo: 72°C, cópia da fita dupla original pela incorporação de nucleotídeos nas fitas complementares), determinada sequência de DNA é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel de eletroforese na forma de uma banda. O desenvolvimento desta técnica e suas inúmeras aplicações (verificadas na revisão de *Mullis et al, 1994*), habilitaram o americano Kary Mullis ao recebimento do Prêmio Nobel.

Francis et al (1998) propuseram um procedimento de análise de PCR com primers específicos para identificar bactérias do grupo *cereus*, bem como discriminá-las entre psicrotróficas e mesofílicas, a fim de prever a vida de prateleira de alimentos a base de leite, pasteurizados e refrigerados, e reduzir a incidência de intoxicações e toxi-infecções por linhagens psicrotróficas do grupo *cereus*.

Já *Yamada et al (1999)* padronizaram um método utilizando a amplificação dos genes *gyrB* que pudessem identificar e distinguir membros do grupo *cereus*, bem como, detectar a presença dos mesmos com a sensibilidade de 0,24 UFC/g. Como resultado, não distinguiram perfeitamente *B. cereus* de *B. thuringiensis*; no entanto o nível de sensibilidade foi satisfatório. De qualquer maneira, adicionaram o ensaio de produção de toxina. É importante ressaltar as duas limitações do método:

- Resultados falso-positivo que podem ser obtidos por DNA contaminado e falso-negativo por substâncias inibidoras, presentes nos alimentos.
- Baixa sensibilidade de detecção por pequeno volume de amostra (10-100µl).

Para algumas análises, a reação de PCR específica apresenta um grande fator limitante: o seu uso em larga escala (vários locais) requer o conhecimento dos nucleotídeos que compõem as duas extremidades da sequência de DNA que se deseja amplificar. Com o conhecimento descrito é que o par de primers que flanqueia uma região alvo no DNA poderia ser sintetizado e utilizado na amplificação desta sequência através da reação da polimerase em cadeia.

No início da década de 90, *Williams et al. (1990)* apresentaram uma variação da técnica de PCR que foi denominada de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Esta variação foi desenhada para contornar o problema do conhecimento prévio da sequência de DNA que se deseja amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos onde nenhum conhecimento de sequência de DNA existia (praticamente a maioria esmagadora dos organismos).

A modificação baseia-se na utilização de apenas um primer (decâmero) na reação de PCR, alterando também as condições específicas de amplificação da reação, além do desenho do próprio primer. Esta variação possibilita que ocorra amplificação, ao acaso, de segmentos de DNA no genoma.

A amplificação é função da probabilidade de, após a desnaturação da fita dupla de DNA, existir no genoma uma sequência complementar ao primer em uma das fitas e, a uma distância que possa ser percorrida pela polimerase, uma outra sequência complementar ao primer na fita oposta. Portanto, a reação de RAPD ocorre devido ao anelamento do primer único em pontos próximos do genoma, delimitando precisamente a região que deverá ser amplificada (*Williams et al., 1990*).

Svensson et al (1998) analisaram a propagação de *B. cereus* nos pontos críticos da linha de produção de leite pasteurizado e encontraram padrões de comportamento muito próximos entre os isolados identificados pela metodologia de RAPD-PCR, afirmando que este contaminante poderia aderir-se, germinar e propagar-se nos pontos de solda das tubulações de aço inoxidável da planta de produção analisada.

Zacarchenco et al (2000) identificaram *B. sporothermodurans*, por RAPD a partir de 100 amostras de leite UHT, onde 55% delas estavam contaminadas por mesófilos esporulados. *Guillaume-gentil et al (2002)* também identificaram *B. sporothermodurans* em leite UHT, mas por metodologia PCR.

Parte 3: A resistência térmica de *B. cereus* e a esterilidade comercial

11. Resistência térmica de *Bacillus cereus*

A determinação da resistência térmica de células bacterianas é normalmente obtida pela sua taxa de morte durante o aquecimento. O procedimento é realizado através da exposição das respectivas células a ação de tempos programados de aquecimento, sob temperaturas fixas, com subsequente contagem dos organismos sobreviventes.

Em 40% das bactérias, a taxa de morte é logarítmica na maior porção da curva. Isto é interpretado como uma reação de destruição de primeira ordem; ou seja, a morte é causada pela inativação de um único sítio ou molécula crítica por célula. Na prática as curvas de morte térmica podem apresentar, além da porção logarítmica, ombros e/ou caudas (Thomlins & Ordal, 1976).

Os parâmetros utilizados para descrever a resistência térmica de células bacterianas são obtidos mediante regressão dos dados de porção logarítmica da curva de sobrevivência e da curva TDT ou curva Fantasma.

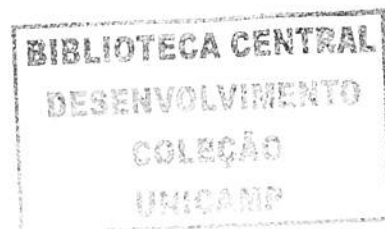
Para um valor constante de D , o tempo para uma dada probabilidade de inativação é diretamente proporcional ao número inicial de microrganismos presentes. Enquanto o valor D é susceptível a variações das condições do ensaio, o valor z é razoavelmente mais constante para um determinado microrganismo numa faixa de condições de teste (Tomlins e Ordal, 1976).

Os principais métodos utilizados, em regime estático, para avaliar os parâmetros D (min) e z (°C) de esporos com alta resistência térmica são classificados como: tubo TDT selado ou não, lata TDT, método de tanque, método de frasco, termoresistômetro e tubo capilar (*Stumbo, 1965*). No entanto um dos principais problemas nestes métodos está relacionado com a dificuldade de avaliar o atraso no tempo de aquecimento e esfriamento, bem como de trabalhar em altas temperaturas com curtos tempos de exposição. Caso do tempo de atraso térmico do tubo TDT que acaba sendo maior do que os tempos programados

A resistência térmica microbiana é afetada por fatores como a temperatura de esporulação (*Beaman & Gerhardt, 1986*), o pH e a composição do meio de esporulação (*Mazas et al, 1995*) e o meio de aquecimento (*Sala et al, 1994*).

Parry & Gilbert (1980) reportaram valores $D_{95^{\circ}\text{C}}$ entre 2,5 e 36,2 min, em tampão fosfato, para cepas de *B. cereus* isoladas de diversos alimentos que provocaram intoxicação emética nos consumidores. Neste caso, ampla faixa de variação no valor D foi verificada atestando como a resistência térmica do microrganismo pode variar em função do alimento que contamina. Sob este mesmo enfoque, *Johnson et al (1982)* encontraram valores $D_{85^{\circ}\text{C}}$ entre 32,1 e 106 min com z variando entre 6,8 e 13,9°C.

Burton (1988) compilou os parâmetros cinéticos de resistência térmica dos principais organismos esporulados. Dentre eles reportou os valores $D_{121^{\circ}\text{C}}$ de 3,8min e z de 35,9°C para *B. cereus* em leite fluído sem especificar a metodologia aplicada ou o sistema de processamento.



Mazas et al (1995) trabalharam com resistência térmica de esporos de *B. cereus* em resistômetro e concluíram que o meio de esporulação influencia os valores D, mas não o valor z. Assim, para cada linhagem foi verificado um melhor meio de esporulação demonstrando a variabilidade e especificidade no bioquimismo de cada uma.

Gonzales et al (1995) avaliaram a resistência térmica de esporos de *B. cereus* e observaram que uma das linhagens apresentou uma subpopulação (2%) com resistência térmica superior àquela observada para a maioria da população, bem como de outras linhagens.

Este fenômeno de “tailing” (cauda) já foi observado por outros pesquisadores como *Rajkowski & Mikolajcik (1987)*, que encontraram uma diferença de 10 vezes no valor D para a primeira curva linear e a segunda curva com cauda. Neste sentido, essa fração mais resistente poderia ser a responsável pela presença de *B. cereus* em produtos processados pelo calor em temperaturas de esterilização ou ultrapasteurização.

A partir de toda literatura consultada percebeu-se a falta de dados de resistência térmica de *B. cereus* em sistemas contínuos. A maioria dos parâmetros encontrados é conseqüente de testes em banho termostático. Este foi um dos motivos que impulsionaram esta pesquisa.

12. A resistência térmica em sistemas estáticos e contínuos

David e Merson (1990) acrescentaram que a extrapolação de dados de resistência térmica, obtidos a baixas temperaturas, estaria limitada a temperaturas de esterilização. A partir de um reator computadorizado, os autores observaram que como a curva de morte de *Bacillus stearothermophilus* foi não linear acima de 145°C, seria necessário descrever dois valores *z* diferentes; um representando a faixa de 115 a 145°C e outro para 145 a 160°C, e, portanto, a aplicação do método estaria restrita a este intervalo.

Os procedimentos de imersão tradicionais, que determinam a cinética de inativação térmica, simulam condições de processos em bateladas; eles não consideram que os efeitos de pressão e de tensão de cisalhamento ocasionam um stress nos microrganismos submetidos a processos térmicos contínuos em trocadores tubulares ou a placas (*Burton, 1977; Swartzel, 1984*). Sob este aspecto, várias pesquisas foram desenvolvidas a fim de estudar a cinética de morte de microrganismos que contaminam alimentos processados em sistemas contínuos.

Wang et al (1964) injetaram uma suspensão de esporos em um substrato fluído com aquecimento em tubo de retenção não isotérmico, determinando os sobreviventes após rápido resfriamento do substrato. *Edwards et al (1965)* e *Busta (1967)* utilizaram uma planta piloto de esterilização contínua para estudar os parâmetros cinéticos de esporos *B. subtilis* e de *B. stearothermophilus*, respectivamente.

Já *Stroup et al (1969)* desenvolveram um trocador de calor de duas fases para estudar a morte microbiana em sistemas contínuos, determinando os tempos de residência em função da temperatura. *Burton (1977)* utilizou infusão em batelada e sistemas de injeção de vapor para estudar as taxas de inativação de esporos de *B. stearothermophilus* em água e em leite.

Em todos estes sistemas contínuos, o tempo de redução decimal foi determinado a partir da contagem inicial e final dos microrganismos alvo, representando a destruição térmica total deles em processos isotérmicos e não isotérmicos. A determinação da resistência térmica em sistemas isotérmicos é mais apropriada; no entanto uma correção deve ser aplicada para porções não isotérmicas do sistema.

Swartzel (1984) afirmou que em sistemas contínuos a temperatura do produto dentro do tubo de retenção vai decrescendo ao longo de seu comprimento, devido a perda de calor do sistema. Assim, a aplicação do método do ponto equivalente (EPM) seria útil na determinação das reações cinéticas ocorridas em fluídos escoando em sistemas contínuos não isotérmicos, pois permitiria a geração dos dados de destruição térmica considerando as condições de velocidade, número de Reynolds, tensão de cisalhamento e outras variáveis relevantes durante o processo. *White (1991)* afirmou que o tipo de escoamento poderia afetar a velocidade, a pressão e a temperatura de processo. Dentre a discussão das variáveis, o escoamento turbulento ($Re \approx 4000$) seria preferencial ao laminar no sentido de causar uma homogeneização intensa do fluído devido às rápidas flutuações sobrepostas, bem como um maior atrito entre estas e a parede da tubulação com coeficiente de transferência de calor mais elevado do que aquele obtido no escoamento laminar.

No entanto, até 1993, o referido método só tinha sido aplicado com sucesso quando considerava sistemas químicos (Sadeghi & Swartzel, 1990; Miles, 1993). Em 1995, Wescott et al utilizaram o método do Ponto Equivalente-EPM para validar os dados cinéticos de *B. cereus* T e de *B. stearothermophilus* ATCC12980, em tampão fosfato, obtidos a partir de sistemas contínuos, comparando-os com aqueles dados obtidos em regime estático. Para *B. cereus*, os autores encontraram que o valor z nos dois sistemas não foi significativamente diferente, pois no sistema contínuo obtiveram $z = 8,5^{\circ}\text{C}$ e em estático $z=8,2^{\circ}\text{C}$; no entanto, o sistema contínuo foi mais letal do que o sistema estático.

Stabel et al (1997) compararam a efetividade do tratamento de pasteurização de leite cru frente a *M. paratuberculosis*, utilizando o método de tubo TDT e um pasteurizador de escala laboratorial. Os respectivos estudos comprovaram que em sistema contínuo a redução decimal da população microbiana é maior do que aquela obtida em regime estático; acrescentando que o escoamento turbulento, durante a pasteurização, seria essencial para completa morte dos contaminantes já que, em ambiente estático, apresentariam maior tendência à aglomeração com conseqüente proteção frente à penetração térmica e aumento aparente no parâmetro cinético de resistência térmica.

Sob este último enfoque, Singh (1995) citou que a qualidade dos produtos assepticamente processados sob escoamento turbulento é potencializada devido à relativa uniformidade na distribuição do tempo de residência e a transferência de calor mais rápida.

Huemer *et al* (1998) avaliaram a resistência térmica de *B. sporothermodurans* e concluíram que métodos estáticos de análise (tubos) fornecem resultados confiáveis até 125°C. Acima deste valor, os valores D obtidos em regime estático são maiores do que os observados em regime contínuo (unidade de esterilização contínua). Acrescentam, ainda, que isto poderia ser causado pelo tempo de subida do aquecimento, e, portanto, medidas de resistência térmica acima de 125°C deveriam ser obtidas a partir de análises em sistemas contínuos.

A título de ilustração, recentemente Vieira *et al* (2002) apresentaram uma tabela comparativa entre os parâmetros cinéticos de *Alicyclobacillus* obtidos em banho termostático e em exposições de isotermas equivalentes pareadas (método computacional). Obtiveram um valor D, a 95°C, 30% menor via método computacional, bem como, um valor z 6,4% maior com coeficiente de correlação 0,87 e de 0,98, respectivamente.

Os parâmetros cinéticos de destruição térmica em sistemas contínuos podem ser estimados pelo método do Ponto Equivalente, bem como o das Exposições Isotérmicas Equivalentes Pareadas. Ambos requerem o uso de programas computacionais especialmente desenvolvidos para seus cálculos. Os respectivos dados experimentais obtidos nas diversas seções de aquecimento e retenção correspondem apenas ao aquecimento aplicado naquela seção; ou seja, uma vez que a amostra é retirada do sistema, deverá ser resfriada rapidamente até temperatura ambiente.

Tamega Jr. (2005) desenvolveu o programa de computador ALIKINETIC.EXE com interface amigável para determinação de parâmetros cinéticos de destruição térmica em sistemas de processamento de alimentos não-isotérmicos mediante a aplicação de ambos os métodos. Além deste cálculo, o ALIKINETIC também pode estimar a concentração remanescente de um fator alimentício termodegradável com base nos parâmetros cinéticos de inativação térmica estimados e histórico térmico conhecido para comparar, posteriormente, com os dados de inativação térmica experimentais, verificar seu desempenho estatístico e calcular a letalidade integrada do processo.

Para testar o programa computacional ALIKINETIC.EXE, Tamega Jr. (2005) determinou os parâmetros cinéticos “Ea” e “k” de inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM2498 em suco de laranja 11°Brix, em sistema contínuo. Sobreviventes foram coletados nas saídas do pré-aquecedor, aquecedor final, e em quatro pontos ao longo do tubo de retenção, à vazão de 1,0 l/min. Valores de z, obtidos por conversão a partir de Ea, foram: $14,67 \pm 1,99^{\circ}\text{C}$ (Ea de 150,61 a 209,11 kJ/mol) e $15,47 \pm 3,76^{\circ}\text{C}$ (Ea de 133,56 a 233,75 kJ/mol), quando utilizado o método EPM e PEIE, respectivamente, representando quase o dobro do valor reportado para este microrganismo usando tubo TDT; sendo que esta variação foi atribuída, pelo autor, a taxas de aquecimento maiores, existentes em sistemas contínuos.

Erros podem existir na determinação de parâmetros cinéticos em sistema estático e contínuo. Nos tubos TDT, o comprimento e o volume de cada tubo não são necessariamente os mesmos e não há precisão em afirmar que todos os tubos têm a mesma espessura de parede (Perkin et al, 1977).

Outras considerações podem ser atribuídas a diferentes níveis de espaço livre causando variação no ponto de ebulição. Erros no procedimento do operador na medida do tempo da temperatura também podem ocorrer (*Westcott et al, 1995*). É importante ressaltar que erros ocasionados pela posição do tubo dentro do banho termostático podem causar diferenças de até 1 ciclo log na população.

Em sistemas contínuos, a medida de temperatura é a principal fonte de erro devido a posição do termopar que pode estar próximo da parede da tubulação, aumentando a temperatura lida no aquisitor de dados; no entanto, um escoamento turbulento poderia minimizar esta diferença.

Tradicionalmente, os dados de resistência térmica para esporos bacterianos têm sido obtidos após ativação isotérmica seguida de um processo de inativação isotérmica. As condições de ativação de esporos dormentes a esporos germinados devem ser apropriadas (*Blocher & Busta, 1983*) já que a extensão da ativação depende de fatores como linhagem da cultura, tempo e temperatura do tratamento térmico, pH e meio da suspensão (*Stumbo, 1973*). As condições de aquecimento, isotérmicas ou não-isotérmicas, poderiam afetar a porcentagem de esporos germinados após o tratamento. *Etoa & Michiels (1988)* encontraram que a ativação a 100°C por 60 min aumentou a resistência térmica dos esporos testados em 62%.

No entanto, *Etoa & Adegoke (1995)* indicaram que, sob condições não-isotérmicas de aquecimento a taxa de ativação de 1°C/min modificou a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus*.

É importante ressaltar que durante os processamentos térmicos industriais de alimentos os microrganismos são submetidos a condições de ativação e inativação que não são sempre isotérmicas. *Periago (1998)* submeteu esporos de *B. stearothermophilus* a um tratamento não-isotérmico seguido de um período isotérmico e observou que após o tratamento isotérmico os valores D foram ligeiramente menores do que aqueles obtidos após o tratamento não-isotérmico, seguido de períodos isotérmicos.

Fernández et al (2001) estudaram o efeito de ativação térmica isotérmica e não-isotérmica na germinação e na termoresistência de esporos de *B. cereus* e indicaram que a germinação após ativação isotérmica foi menor do que aquela obtida após aquecimento não-isotérmico. Quanto mais rápida foi a taxa de aquecimento, maior o valor z. Além disso, a taxa de ativação não-isotérmica, à taxa de 2°C/min, resultou em maiores valores D ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 4,7\text{min}$) quando comparada com a isotérmica ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 4,04\text{min}$).

13. Métodos para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas contínuos

O principal método utilizado para estimar parâmetros cinéticos em tratamentos térmicos contínuos é o Método do Ponto Equivalente (Equivalent Point Method – EPM), desenvolvido por *Swartzel*, em 1982. Tal método está centrado no conceito de que um processo térmico não isotérmico pode ser representado como um único binômio ($T_e \times t_e$) correspondente que produziria o mesmo efeito. A dedução matemática foi baseada nos estudos de cinéticas química de Arrhenius.

Analisando a cinética, *Swartzel* propôs uma função chamada de G , que é a razão de redução de um constituinte do produto que está se degradando em decorrência do tratamento térmico. Assim, várias curvas de G a diferentes E_a poderiam ser graficadas quando baseadas no mesmo histórico térmico. Segundo o autor estas várias linhas tenderiam a se interceptar em um único ponto, o qual seria o chamado ponto equivalente.

No intuito de obter melhores resultados através do EPM, *Nunes & Swartzel (1990)* avaliaram a interseção linear, regressão linear dos mínimos quadrados, regressão linear dos valores absolutos mínimos, regressão não-linear dos mínimos quadrados e regressão ponderada dos mínimos quadrados enquanto métodos para estimar os valores do ponto equivalente. A principal vantagem atribuída a estes métodos refere-se à alta precisão com valores elevados de energia de ativação, minimizando erros provenientes da ativação de esporos, térmica. Os pesquisadores concluíram que tanto a regressão não-linear dos mínimos quadrados quanto a regressão ponderada dos mínimos quadrados são mais precisas pra predizer o ponto equivalente.

Maesmans et. al. (1995) realizaram uma revisão do método do Ponto Equivalente. Foram observadas limitações de análise das características necessárias pra se estabelecer um conjunto consistente de variáveis para processos assépticos, tais como perfil térmico do meio e do produto. Para processos próximos de uma condição isotérmica, o método apresenta alta precisão; no entanto, quanto menos isotérmico o processo menor a precisão do método.

Os autores acrescentam que em processos indiretos com várias fases de aquecimento, o EPM torna-se muito pouco preciso, contudo seus resultados para um processo com duas etapas de aquecimentos podem servir como referência para o dimensionamento destes sistemas, pois os cálculos provenientes do EPM são conservativos. Já *Kyereme et al.* (1999) publicaram um refinamento do EPM, onde a temperatura de 121,1°C era pré-definida, pois desta forma o tempo equivalente encontrado seria o F_0 do processo, facilitando assim a comparação dos resultados com o EPM original. Esta nova implementação, chamada de Novo Procedimento de Interseção Linear, apresentava erros de -0,18% a 38,78%, para valores de F_0 , em relação ao EPM original. Os pesquisadores ainda observaram que uma interseção perfeita das linhas no gráfico $\ln(t)$ X T não existe.

Em 1997, *Welt et al.* propuseram outro método para a determinação de parâmetros cinéticos em processos térmicos contínuos, denominado Exposições Isotérmicas Equivalentes Pareadas – PEIE. Tal método iterativo, parte de uma energia de ativação inicial arbitrária e um múltiplo desta para calcular a exposição isotérmica equivalente e a constante cinética de redução (k), usada para determinar a energia de ativação da próxima interação. Um resultado convergente estaria associado ao fato da diferença entre as energias de ativação, do passo anterior com seu subsequente, estar na faixa de precisão estabelecida. Segundo os autores a única diferença do EPM é que este não fixa uma temperatura equivalente ou um tempo equivalente padrão. Neste sentido *Welt et al* discordam de *Swartzel*, pois quando dois pares diferentes de energias de ativação foram aplicados, três pontos de intersecções foram encontrados, não havendo convergência para um único ponto equivalente.

Em 2001, *Vieira et al* empregaram o método PEIE para estimar a degradação de ácido ascórbico em néctar de cupuaçu. Os autores assumiram uma energia de ativação arbitrária 60 kJ/mol para a primeira interação e também usaram 120 kJ/mol (o dobro) pra calcular a primeira exposição isotérmica pareada equivalente. O método PEIE repete este procedimento até que a diferença entre a energia de ativação de um passo menos a energia de ativação do anterior seja menor ou igual ao fator de convergência de 0,0001. O ajuste baseado no tempo de residência não apresentou grande significância, porém o índice de correlação (r^2) foi de 0,715. Concluindo, o PEIE conseguiu predizer resultados menores que os reais com mais facilidade e rapidez na determinação dos parâmetros cinéticos.

14. Rotina de Cálculo para o Método do Ponto Equivalente-EPM no programa ALIKINETIC

O cálculo do Ponto Equivalente realizado pelo ALIKINETIC.EXE, desenvolvido em MS Visual Basic 6.0® por *Tamega Jr. (2005)*, pode ser executado em PCS aplicando a metodologia apresentada por *Nunes & Swartzel (1990)* para o método do Ponto Equivalente, utilizando os seguintes dados de entrada: vetor com os valores de Temperatura e vetor com os valores Tempo do produto durante o processamento (como variáveis de precisão simples) podendo ser utilizado tanto para somente um perfil térmico como para vários perfis. A resposta constitui uma matriz (P_e) contendo o Ponto Equivalente do processo ($T_e \times t_e$) representando o perfil térmico.

Se este método estiver sendo empregado com apenas um processo (estimativa de apenas um Ponto Equivalente), a matriz Pe terá apenas dois registros: Pe(0), contendo o valor do tempo equivalente, e Pe(1) contendo a Temperatura (°C) equivalente.

O EPM calcula o valor da relação de redução térmica (G) pela integração da Equação 1 para diversas Energias de Ativação (de 30 a 420 kJ/mol, com incrementos de 10 em 10 kJ/mol – *Kyereme et al, 1999*). A Equação 1 apresenta a integral da Equação de Arrhenius para cinética de primeira ordem com um valor conhecido de Ea, e temperatura variável no tempo, obtida do perfil térmico. Desta forma, são estabelecidas as curvas Ea-G para cada Energia de Ativação. Estes valores são tratados pela sub-rotina EPM.bas mediante um procedimento de regressão linear ponderada, como sugerido por Nunes e Swartzel (1990). É importante ressaltar que nos cálculos internos desta sub-rotina é usado sempre $T_{ref} = 121^{\circ}\text{C}$.

$$G = \int_0^t k_{T_{ref}} \exp \left[\left(\frac{-E_a}{R} \right) \left(\frac{1}{T(t)} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] dt \quad (1)$$

O Método do Ponto Equivalente supõe que o binômio estabelecido ($t_e \times T_e$) seja único e representativo do processo não-isotérmico avaliado e independente da Energia de ativação. Para o cálculo da constante cinética de inativação k_e é aplicada a Equação 2 pelo módulo de cinética do ALIKINETIC.EXE, utilizando como dados de entrada a relação experimental N_0/N alimentada ao programa, e t_e previamente calculado. Em seguida, o $\ln(k_e)$ versus o inverso de T_e (convertida em Kelvin) são ajustados linearmente, e a partir do valor da inclinação estima-se Ea e do intercepto com a ordenada o valor de $\ln(k_0)$.

$$k_e = \frac{\ln\left(\frac{N_0}{N}\right)}{t_e} \quad (2)$$

15. Rotina de Cálculo para o Método das Exposições Isotérmicas Pareadas Equivalentes-PEIE no programa ALIKINETIC

O método PEIE faz uso das mesmas funções do EPM para integração no cálculo os valores de G, porém, requer mais dados de entrada como a Energia de Ativação inicial fixada em 30000 J/mol, o vetor com as relações (N_0/N), a matriz de tempo dos processos e a matriz de temperatura dos processos. Mas, diferentemente do EPM, o PEIE não pode ser aplicado a um único processo na estimativa dos parâmetros cinéticos.

Os procedimentos adotados foram os descritos por *Welt et al. (1997)*, usando os valores de tempo e Temperatura equivalentes apenas como dados para ajustar a Equação de Arrhenius de primeira ordem linearizada. O PEIE também gera as curvas Ea-G, mas de forma pareada, o ponto de interseção de duas linhas Ea-G no gráfico $1/T_e \times \ln(t_e)$ especifica uma EIE (Exposições Isotérmicas Equivalentes). Há duas condições restritivas para se evitar valores negativos de Ea conforme exposto por *Vieira et al (2001)*.

$$\frac{(T_{e1} - T_{e2})}{(k_{e1} - k_{e2})} > 0 \quad (3)$$

e

$$|T_{e1} - T_{e2}| > 3 \quad (4)$$

Assim, no momento da digitação, o primeiro processo deve ser sempre o de maior impacto térmico. Esta condição é primordial para os cálculos do PEIE, satisfazendo condição expressa pela Equação 3. Se os perfis forem importados ao programa, antes de estimar os parâmetros cinéticos, é necessário verificar a ordenação deles em função de uma classificação alfabética, pois é desta forma que o ALIKINETIC.EXE irá importá-los, sendo que deverão ser renomeados, se preciso, para que a ordem seja decrescente em relação ao efeito térmico. Obtidas todas as EIEs, a sub-rotina calcula as constantes de reações isotérmicas equivalentes (k_e) e um novo valor de E_a para cada par de processos.

Quando a diferença entre Energias de Ativação de um passo com o valor desta para um mesmo processo em um passo anterior for ≤ 1 J/mol (critério exemplificado por *Welt et al, 1997*), as iterações do PEIE são finalizadas para encontrar a Energia de Ativação através da convergência requerida pelo método. Se a diferença for maior as iterações continuam. Com os valores dos inversos das temperaturas equivalentes e o logaritmo natural dos valores de k_e obtidas desta última iteração, uma regressão linear de $\ln(k_e)$ versus $1/T_e$ (Gráfico da equação de Arrhenius linearizada) mediante a sub-rotina Linearreg é procedida para obter finalmente os parâmetros cinéticos do fator termodegradável, E_a e k_0 ou k_{Tref} .

No caso de ter sido informado uma T_{ref} qualquer, o gráfico linearizado de Arrhenius será de $\ln(k_e)$ versus $(1/T_e) - (1/T_{ref})$, onde a interseção da reta com o eixo das ordenadas será o valor de $\ln(k_{ref})$.

A sub-rotina do PEIE isoladamente fornece como resultado apenas a Energia de Ativação estimada e um vetor contendo as taxas de reações isotérmicas equivalentes para cada processo.

16. Sub-rotina para geração de perfil de Temperatura (Tempprofile.bas) no programa ALIKINETIC

O programa ALIKINETIC.EXE emprega para a entrada do perfil térmico pelo fornecimento das condições operacionais do processo contínuo do produto e do meio de troca de calor nas entradas e saídas de cada seção, para estimar a temperatura média de massa a equação 5 exponencial de *Deindoerfer & Humphrey (1959)*.

$$T_t = T_{(H,C)} \left[1 + \frac{T_o - T_{(H,C)}}{T_{(H,C)}} e^{-Jt} \right] \quad (5)$$

O ALIKINETIC.EXE permite que sejam gerados perfis de temperaturas por seções, sem que seja essencial empregar todas as seções da unidade de processo contínuo. Para isto basta inserir o valor 0 (zero) na entrada manual de dados no tempo de residência correspondente às seções não empregadas.

Com os valores de tempo de residência (em segundos) estabelecidos conforme o regime de escoamento do fluido não acumulado nas seções usadas, é calculado o valor “J” para cada seção. *Swartzel (1982)* assume que o valor J, que envolve a relação $(U_t A / \omega_p c_p)$, seja a inclinação da Equação 5 linearizada, definido na Equação 6 a seguir:

$$J = - \frac{(\ln|T_t - T_{H,C}| - \ln|T_o - T_{H,C}|)}{t} \quad (6)$$

Desta forma, a sub-rotina Tempprofile.bas tem todas as informações necessárias para gerar o perfil térmico. Toda vez que o vetor tempo atinge o valor de residência não acumulado de uma seção, a sub-rotina muda o valor do expoente J para o valor da seção seguinte, e continua a geração do perfil até se atingir o tempo de residência não acumulado da última seção.

17. A Esterilidade Comercial em Processos Assépticos

17.1 O teste de esterilidade comercial

O teste de esterilidade comercial é realizado por incubação do produto, a 37°C por 7 dias, segundo a *Secretaria de Vigilância Sanitária (1997)*, gerando 3 possíveis resultados:

- O produto não contém organismos viáveis,
- O produto contém organismos viáveis que não se multiplicam,
- O produto contém organismos viáveis que se multiplicam nas condições normais de estocagem.

Para detectar o sucesso ou insucesso do controle microbiológico do produto com absoluta certeza seria necessário inspecionar o lote todo, mas isto é impossível, pois a inspeção é destrutiva. Assim, deve ser elaborado um esquema de amostragem para possibilitar a incubação de um número de amostras representativas do lote e, conseqüentemente, avaliar os resultados.

17.2 A incubação

A fim de recuperar microrganismos contaminantes em testes de esterilidade comercial, o *FDA (1998)* recomenda incubação a 35°C por até 14 dias. Mediante o Ministério da Saúde pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na Resolução-RDC nº12 de 2/01/2001 de Padrões Microbiológicos para Leite UHT e derivados, a temperatura de incubação para embalagens de leite UHT é de 35-37°C por até 7 dias (*Anvisa, 2001*).

O IDF (International Dairy Federation), a temperatura de incubação de 7°C é sugerida e o tempo de 10 dias de incubação é recomendado por *Philips & Griffiths (1990)*, a fim de isolar linhagens psicrotróficas. Geralmente é considerado que a temperatura mais adequada para recuperar esporos tratados termicamente seria inferior àquela aplicada para esporos sem tratamento térmico.

Griffiths & Phillips (1990) estudaram o crescimento de linhagens psicrotróficas de *B. cereus* em leite cru e pasteurizado e observaram o desenvolvimento dos esporos ativados a 6 e 10°C e não a 2°C.

Oslen e Scott, citados por *Gonzales et al (1995)* avaliaram a resistência térmica de esporos de *B. cereus* em termos dos efeitos das condições de recuperação das células após o tratamento térmico. Como resultado os autores encontraram que a temperatura de incubação altera valores D para esporos que sofreram tratamento térmico, sendo que a mesma deve ser 5°C menor do que a ótima para o microrganismo alvo que não sofreu tratamento térmico; no entanto os valores z não se alteraram.

17.3 Métodos alternativos não destrutivos para testes de esterilidade comercial

Estudos com equipamentos médicos de ultra-sonografia têm possibilitado a aplicação do ultra-som em ensaios não destrutivos de detecção da qualidade microbiológica de leite e produtos derivados de leite, envasados em embalagens plásticas ou laminadas (Mattila, 1986). Uma desvantagem observada é que a frequência de 5 MHz, comumente aplicada, é limitada para alimentos em embalagens cartonadas pois o ar presente no espaço livre da embalagem atenua o efeito do ultra-som. No entanto, Mattila *et al* (1989) descobriram posteriormente que frequências de 0,5 a 2 MHz poderiam penetrar efetivamente nas embalagens cartonadas, mas só detectariam a contaminação microbiana se o produto já estivesse altamente deteriorado .

Wirtanen *et al* (1992) estudaram frequências entre 3,75 a 7,5 MHz na detecção de deterioração em produtos de leite envasados em embalagens cartonadas e concluíram que não foi possível detectar a contaminação. Ressaltaram ainda que os equipamentos comerciais utilizados não possuíam probes de baixa frequência já que, para propósitos médicos, altas frequências seriam requeridas, dificultando a aplicação desta tecnologia. Desta forma a metodologia tradicional com incubação em estufas continua sendo praticada.

17.4 A amostragem para ensaios de esterilidade comercial

Para realizar uma amostragem com critério, alguns termos devem ser definidos a fim de padronizar níveis de qualidade, como apresentado por von Bockelmann (1988). A amostragem pode ser elaborada sob duas condições:

- Aleatorizada, onde cada embalagem do lote tem a mesma probabilidade de ser retirada como amostra. Os resultados são expressos em probabilidades. A embalagem está ou não estéril.
- Dirigida, onde existem situações de operações alteradas, ou seja, de maior risco (início e fim de produção, existência de parada a produção...).

A taxa de defectibilidade, em alimentos processados assepticamente deve ser estipulada mediante os seguintes critérios:

- 1:100 demasiada alta,
- 1:1000 realista em muitas situações,
- 1:10000 ambiciosa,
- 1:100000 muito difícil de ser atingida,
- 1:1000000 o limite de funcionamento do equipamento é atingido.

O grau de certeza com que as taxas indicadas devem ser controladas pode atingir:

- 99,9%,
- 99%,
- 95%.

Quanto mais certeza maior o volume de amostras requerido. Assim, segundo *von Bockelmann (1988)*, para obter uma amostragem significativa, com distribuição normal, seria necessário incubar 3.000 amostras de uma amostragem aleatória, por temperatura e por marca, a fim de obter a relação de 1:1000 de *Franklin (1970)* com a probabilidade de 95% de confiança de *Ahvenainen (1988)*, assegurada para linhas assépticas. No entanto, para ensaios com limitações de espaço físico e capacidade de operador, a sugestão descrita por *Ahvenainen (1988)* é indicada para adequar as condições da amostragem.

Definindo os seguintes critérios: considerando uma taxa de defeitos de 0,005 com probabilidade de, em 93% das análises uma embalagem contaminada for encontrada (com expectativa de recuperação de até três embalagens) poderiam ser incubadas 600 amostras por temperatura e por marca.

17.5 Critérios de esterilidade e estabilidade

Para alimentos com pH superior a 4,5 (produtos de baixa acidez e básicos), o processo térmico mínimo recomendado seria aquele suficiente para ocasionar 12 reduções na população do microrganismo patogênico *Clostridium botulinum*. Isto requer um aquecimento a 121°C por 3 minutos, medido no ponto frio do sistema, ou um processo HTST a 131°C por 18 seg. No entanto, dependendo do alvo do processamento o binômio deverá ser incrementado. Para *Bacillus stearothermophilus* seria necessário aplicar 121°C por 4 minutos. Em estudos mais recentes, os parâmetros cinéticos de *Bacillus sporothermodurans* evidenciam a necessidade de tratamentos térmicos superiores (*Lewis & Heppel, 2000*).

von Bockelmann (1988), define a esterilidade comercial (Estados Unidos) como: unidade estéril é aquela que não apresentou microrganismos patogênicos ou não patogênicos sob condições normais de estocagem e selagem. Isto é verificado após estocagem das unidades até o final da vida de prateleira com contagem direta em meio nutriente e determinações microscópicas e físico-químicas. O mesmo autor citou que cada produtor poderia adaptar procedimentos de teste para avaliar seu produto:

- Incubação dos envases a 30°C por 7-14 dias a fim de promover a atividade enzimática e/ou desenvolvimento dos contaminantes
- Determinação da estabilidade das proteínas do leite através de sua precipitação pelo álcool a diferentes concentrações

Como na indústria de leites e derivados a experiência nos últimos 20 anos e a inspeção legal relatam que a probabilidade de contaminação por patógenos no leite UHT é praticamente não existente, a estabilidade das embalagens, ao longo da vida de prateleira, tornou-se um parâmetro importante e, portanto, avaliado em qualquer uma das condições:

- Não floculação ou precipitação após 10min a 100°C,
- Flutuação de pH não deve exceder 0,2 pontos,
- Concentração de ácido lático não deve exceder 1,8g/l,
- Não precipitação após adição de volume similar de etanol 68% (v/v),
- Não precipitação a 100°C com adição de fosfato em concentração específica,

- Não redução da rezarzurina após 4 horas a 37°C.

von Bockelmann (1982), afirma que é preferível aumentar o número de amostras do lote a ser analisado, na tentativa de recuperar uma embalagem suspeita, do que incrementar um método sofisticado e laborioso de detecção de contaminação. Para aumentar o índice de recuperação, a medida de pH parece a condição mais simples, rápida e barata.

O leite fluído recém ordenhado apresenta reação levemente ácida com faixa de pH de 6,5 a 6,7 (*Sarda & Pardo, 1952*). O leite cru brasileiro tem pH entre 6,60 e 6,65 (*Peixoto et al, 1985*). Já o pH do leite integral UHT europeu 6,6-6,8 (*von Bockelmann, 1982*), com pH médio de 6,63 (*Quality Management, 2003*).

Considerando que um dos preceitos para avaliação da estabilidade das unidades, após o ensaio de esterilidade comercial, é que a flutuação do valor do pH inicial não seja superior a 0,2 pontos (*von Bockelmann, 1988*), pode-se afirmar que: se o pH médio de leite UHT for fixado em 6,70 para subtrair os 0,2 pontos, chega-se a um limite mínimo de 6,5, estabelecido para indicar as amostras suspeitas não estéreis com considerável margem de segurança em relação ao leite integral longa vida brasileiro.

17.6 Aspectos do sistema contínuo

Esterilizadores contínuos UHT são utilizados na indústria de alimentos para garantir a segurança microbiológica de produtos líquidos como leite, sucos de frutas, molhos e cremes, superando processos em batelada, pois apresentam maior uniformidade durante o tratamento térmico.

Os diâmetros característicos são menores e a transferência de calor interna é mais alta devido à convecção forçada, ao contrário da condução e da convecção livre. Para uma taxa de aquecimento as diferenças de temperatura, no alimento, são menores e as temperaturas de processo podem ser mais altas sem o risco de mudanças inaceitáveis na cor e sabor do produto final. O processo UHT favorece a inativação microbiana e esporicida em relação à degradação dos fatores de qualidade e, quando está associada com a aplicação de curtos tempos de residência, promove produtos microbiologicamente seguros com satisfatória qualidade sensorial (*Holdsworth, 1992*).

17.7 A validação biológica para processos assépticos

O conceito de esterilização comercial envolve a eliminação ou a minimização de determinada carga de organismos indesejáveis dentro de um ambiente definido que pode ser um alimento formulado. Na esterilização por calor, os alimentos são aquecidos à temperaturas suficientemente altas e por períodos suficientemente longos para destruir a atividade de deterioradores biológicos e de enzimas. Assim, alimentos esterilizados têm maior vida de prateleira. No entanto, tratamentos térmicos severos produzem alterações significativas nas características sensoriais e nutricionais dos alimentos.

O aprimoramento das técnicas de processos tem reduzido o dano irreversível aos nutrientes e componentes organolépticos através de tratamentos mais brandos, em termos do tempo de choque térmico mínimo necessário; afinal, atualmente pode-se prever o tempo requerido para esterilizar determinado alimento, pois o mesmo é influenciado pelo estado físico e pH do alimento, por sua carga contaminante inicial e pela resistência térmica dos

microrganismos provavelmente presentes na matéria-prima, antes do tratamento térmico (*Pacheco, 2001*).

Muitas diferentes técnicas de validação de processos assépticos foram testadas no passado. Basicamente podem ser citadas, desde a inoculação direta de esporos livres de bactérias no produto antes do tratamento térmico, até a inoculação de esporos bacterianos imobilizados em gel de alginato, ao longo do processo térmico (*Ronner, 1990*).

Para validação biológica com esporos livres inoculados no produto, um protocolo de pelo menos **cinco** processos deve ser testado, mediante a teoria de embalagens inoculadas (*NCA, 1968*), sendo que os menos rigorosos devem estar contaminados e os mais rigorosos estéreis. Para tanto, o inóculo deve estar igualmente distribuído no alimento. Após a inoculação, o alimento é processado e após o ciclo de aquecimento/ resfriamento, envasado em cerca de 300 embalagens (*Digeronimo, 1997*). Os recipientes são incubados, por longos períodos que permitam a germinação de esporos injuriados, com observação posterior da presença ou ausência de sobreviventes. Isto pode ser observado por alterações na estrutura física da embalagem (ruptura de solda ou estufamento), bem como, por alterações químicas no produto (acidez, cor, odor, sabor ou textura) e por evidência microbiológica de colônias de microrganismos deteriorantes através de embalagens transparentes. Vale acrescentar que a referida técnica tem por objetivo, observar a presença ou ausência de crescimento microbiano (método de ponto final), fato que determina a validade do processo aplicado (*Pflug, 1980*).

É importante frisar que a taxa de fluxo do processo sempre deve ser constante para que todas as partículas da amostra recebam o mesmo tratamento térmico durante o tempo de residência no tubo de retenção.

17.8 Limitações da validação

Westhoff & Dougherty (1981) determinaram os parâmetros cinéticos de cepas de *B. cereus* isoladas a partir de leite UHT. No entanto, baseados nos valores D e z encontrados, concluíram que os esporos sofreriam 12 reduções decimais quando submetidos ao processo de 138°C por 5 s e, por isso, não poderiam estar, teoricamente, no produto final após o processamento térmico. Como a contaminação foi evidenciada as seguintes hipóteses foram questionadas:

- As curvas de morte térmica, obtidas a baixas temperaturas, não poderiam ser extrapoladas para zona UHT;
- Esporos produzidos “in vitro” não teriam resistência térmica equivalente a dos esporos naturalmente presentes na natureza;
- Esporos injuriados pelo tratamento térmico poderiam se manifestar durante a enumeração no meio de cultura ótimo;
- A contaminação poderia ser proveniente do procedimento aplicado no sistema de envase;

- CIP (Cleaning in Place) impróprio e/ou insuficiente em decorrência da possibilidade de formação de depósitos no final do tubo de retenção conforme verificado na planta de processo utilizada na pesquisa;
- Efeito de proteção ao esporo pela formação de depósitos (pedras de leite).

A sensibilidade de recuperação do método em relação ao esforço de inoculação direta é baixa, pois somente uma pequena proporção do nível de inoculação total é recuperada após o processo de aquecimento. Assim, há necessidade de inoculação altos níveis da população nem sempre obtidos pela esporulação “in vitro” (Marcy *et al*, 1997).

A estas hipóteses soma-se o fato da maioria dos experimentos de determinação de resistência térmica ser realizada em banho termostático e não em trocadores de calor. Isto promove uma transferência de calor mais lenta, bem como não considera a dinâmica do produto no sistema contínuo de processamento asséptico, como verificado por Pacheco (2001) em esporos livres e imobilizados.

17.9 Cálculo do tempo de residência e do inóculo para processos de validação biológica

Segundo Toledo (1991), a distribuição de velocidade das partículas de um fluido, em regime laminar, ao longo de uma tubulação pode ser expressa por:

$$V_{\text{media}} = Q / A_c \quad (7)$$

Para a partícula mais rápida do mesmo fluido, a velocidade é dada por:

$$V_{\max} = 2 (V_{\text{media}}) \quad (8)$$

Já o tempo de residência das partículas do fluido, na porção da retenção, é dado por:

$$t = L / V_{\max} \quad (9)$$

Aplicando os dados característicos do produto (ρ , n , K) de interesse e das dimensões do equipamento de processamento térmico é possível determinar V_{media} , $V_{\max}$ e o tempo de residência da partícula mais rápida do sistema, a fim de aplicar condições equivalentes àquela observadas comercialmente. Este último dado é aplicado na equação 10 da curva de sobreviventes para determinar a concentração da população inicial necessária para obter a probabilidade de contaminação de interesse (N), em termos de garrafas contaminadas para cada 100 garrafas envasadas.

$$\log N - \log N_0 = -t / D1 \quad (10)$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABVL – Associação Brasileira de Leite Longa vida. Comunicação pessoal. 1997.
2. ABVL – Associação Brasileira de Leite Longa vida. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida>>. Acesso em: 16 jul. 2003.
3. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.gov.br. 2001.
4. AHMED, A. A-H. ; MOUSTAFA, M.F.; MARTH, E.H. Incidence of *Bacillus cereus* in Milk and some milk products. **Journal. of Food Protection**, v.46, n. 2, p.126-128.,1983.
5. AHVENAINEN, R. Quality assurance and quality control of aseptic packaging. **Food Reviews International**, v.4, n.1, p.45-76, 1988.
6. BEAMAN, T.C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.1242-1246, 1986.
7. BEATTIE, S.H.; HOLT, C.; HIRST, D.; WILLIAMS, A.G. Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. **FEMS Microbiology Letters**, v.164, p.201-206, 1998.
8. BERHNARD, K. et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect's pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.70, p.59-68, 1997.

9. BIOMÉRIEUX. **Manual de Utilização do API System**, n.99725, versão A, 1999.
10. BLOCHER, J.C.; BUSTA, F.F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, v.37, p.11, 1983.
11. BORTOLETO, E.E. & CHABARIBERY, D. Aspectos estruturais, técnicos e política setorial para o ajuste da cadeia produtiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 36, 1988, Poços de Caldas. **Anais**. São Paulo: SOBER, 1988. v.1, p.479-491.
12. BURTON, H. An introduction to ultra high temperature processing and plant. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.30, p.135, 1977.
13. BURTON, H. **UHT processing of milk and milk products**. London: Elsevier Applied Science, 1988.
14. BUSTA F.F. thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultra high temperatures. **Applied Microbiology**, v.15, p.640-645. 1967.
15. CHRISTIANSSON, A., NILSSON, J.; BERTISSON, J. *Bacillus cereus*-spores in raw milk. Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Paper presented at the Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk. **International Dairy Federation**, Wolf passing, Austria, pp. 4. 1996.

16. CLARHOLM, M. Possible roles of roots, bacteria, protozoa and fungi in supplying nitrogen to plants. In: A.H. Fitter, A.H. Atkinson, D. J. Reid & M. B. Usher (eds) *Ecological Interactions in Soil. Special Publication Series of the British Ecological Society*, vol. 4, p. 355 - 365. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1985.
17. COLLINS, E.B. Heat resistant psychotropic organisms. *Journal of Dairy Science*, v.64, p.157-160, 1981
18. CORNELL UNIVERSITY. **Food Microbiology Lab. Exercises**. 1983.
19. DA SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; DE OLIVEIRA, L.L.; COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite de derivados**. Juiz de fora, Minas Gerais, Brasil, 1997.
20. DAVID, J.R.; MERSON, R.L. Kinetic parameters for inactivation of *Bacillus stearothermophilus* at high temperatures. *Journal of Food Science*, v.55, n.2, p.488-493, 1990.
21. DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.; PERKIN, A. G.; BURTON, H. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra-high temperature. I. Laboratory determination of temperature coefficients. *Journal of Food Technology*, v.12, p. 115-129, 1977.
22. DE REZENDE, N.C.M. **Ocorrência de bactérias do grupo *B. cereus* e de microrganismos indicadores em leite UHT integral**. 1998. 82 p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, 1998.

23. DEINDOERFER, F. H.; HUMPHREY, A. E. Analytical Method for Calculating Heat Sterilization Times. **Applied Microbiology**, v.7, p. 256-264, 1959.
24. DIGERONIMO, M.; GARTHRIGHT, W.; LARKIN, J.W. Statistical design and analysis. **Food Technology**, v. 51, n. 10, p. 52-56, 1997.
25. DIRECTIVE 92/46/EEC. Council of the European Communities of 16 July. Health rules for the production and the trade of raw milk, heat-treated milk, and products based on milk. **Off. Journal of European Communities**, L268, p.1-32, 1992.
26. DOYLE, M. P. *Bacillus cereus*. **Food Technology**. v.42, n.4, p.199-200, 1988.
27. DROBNIEWSKI, F. *Bacillus cereus* and related species. **Journal of Clinical Microbiology** v. 6, p.324-338, 1993.
28. DUNKLEY, W.L.; STEVENSON, K.E. Ultra high temperature processing an aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.10, p.2192-2202, 1987.
29. EDDY, B.P. the use and meaning of the term "psychrophilic". **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, p.189-190, 1960.
30. EDWARDS, J.L. Jr.; BUSTA, F.F.; SPECK, M.L. Thermal inactivation characteristics of *Bacillus subtilis* at ultra high temperatures. **Applied Microbiology**, v.13, p.851-857, 1965.

31. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/pesquisa/seguranca.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2003.
32. ETOA, F.X.; MICHIELS, L. Heat-induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v.6, p.43-45, 1988.
33. ETOA, F.X.; ADEGOKE, G.O. Changes in thermoresistance of some *Bacillus* spores after sublethal heat pretreatment. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.35, n.3, p.285-295, 1995.
34. FAIRCHILD, T.M.; SWARTZEL, K.R.; FOEGEDING, P.M. Inactivation kinetics of *Listeria innocua* in skim milk in a continuous flow processing system. **Journal of Food Science**, v.59, n.5, p.960-963, 1994.
35. FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th edition. Revision A, Chapter 14. 1998.
36. FEDERAL GERMAN LEGISLATION. Verordnung über Hygiene-und Qualitätsanforderungen an das Gewinnen, Behandeln und Inverkehrbringen von Milch (Milchverordnungen) Vom 23-6-1989. BGBl 1 n. 29 von 28-6-1989 S. 1140.
37. FERNANDEZ, A.; OCIO, M.J.; FERNANDEZ, P.S.; MARTINEZ, A. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.257-264, 2001.

38. FINK, A.; KESSLER, H.G. changes in the fat globule membrane produced by heating. **Milchwissenschaft**, 40, 261-264. 1985.
39. FOSCHINO, R.; GAIL, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. **Annali di Microbiologia Ed Enzymologia**, v.40, p.47-59, 1990.
40. FRANCIS et al. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3525, 1998.
41. FRANKLIN, J.G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 33, p.180-191, 1970.
42. GILLIS, W.T.; CARTLEDGE, M.F.; RODRIGUEZ, I.R.; SUAREZ, E.J. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.11, p.2875-2879, 1985.
43. GONZALES, I. *et al.* The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n. 5, p.548-554, 1995.
44. GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.61-66, 1994.
45. GRIFFITHS, M.W. ; PHILIPS, J.D. Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus spp.* Found in raw and pasteurized milks. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.43, p.62-70, 1990.

46. GRINSTED, E.; CLEGG, L.F.L. Spore-forming organisms in commercial sterilized milk. **Journal of Dairy Research**, v.22, p.178, 1955.
47. GUILLAUME-GENTIL, et al. Genetic Heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as Demonstrated by Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n. 9, p.4216-4224, 2002.
48. HAUGE, S. *Bacillus cereus* as a cause of food poisoning. **Nordisk Hyg. Tidskr**, v.31, p.184-206, 1950.
49. HILEMAN, J.L. Thermoduric bacteria in pasteurized milk. A review of the literature. **Journal of Dairy Science**, v.23, p.1143-1160, 1940.
50. HOLDSWORTH, S. D. **Aseptic processing and packaging of food products**. London: Elsevier Applied Science. 1992. 428p.
51. HOLT, J.G. *et all*. **Shorter Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins. 1994.
52. HUEMER, I.; KLIJN, N. ; VOGELSANG, H. ; LANGEVELD, L. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT-milk. **International Dairy Journal**. v.8, p.851-855, 1998.
53. IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Bulletin** 357/2000. 2000.

54. ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
Microorganisms in Food 5 – Characteristics of Microbial Pathogens. Aspen Publishers, 1996.
55. JAY, J.M. **Modern Food Microbiology.** 4. ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 1992.
56. JAYNE-WILLIAMS, D. J.; FRANKLIN, J.G. *Bacillus* spores in milk. **Dairy Science Abstract**, v.22, p.215-221 (parte I), p.269-278 (parte 2), 1960.
57. JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L. and BUSTA, F.F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. **Journal of Food Science**, v.47, p.1268 – 1271, 1982.
58. KESSLER, H.G. **Food Engineering and Dairy Technology.** 1981.
59. KESSLER, H.G.; PFEIFER, J.; DCHWOPPE, C. Untersuchungen über hitze resistente mesophile *Bacillus*-sporen in /UHT milch. **Deutsche Milchwirtschaft**, v.13, p.588-592, 1994.
60. KIM, H.U. & GOEPFEET, J.M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in food. **Applied Microbiology**, v.22, p.581-587, 1971.
61. KLIJN, N. ; HERMAN, L. ; LANGEVELD, L.P.M. ; WAGENDORP, A.A. ; HUEMER, I. A. ; WEERKAMP, A.H. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. **International Dairy Journal**, v.7, p.421-428, 1997.

62. KRAMER, J.M. & GILBERT, R.T. *Bacillus cereus* and other bacillus species. In: M.P. Doyle (editor), **Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel Decker, N. Y., p.21-70. 1989.
63. KYERENE, M.; SWARTZEL, K. R.; FARKAS, B. E. New Line Intersection Procedure for the Equivalent Point Method of Thermal Evaluation. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p.565-570, 1999.
64. LEMBKE, F. Comunicação pessoal. 1998.
65. LEWIS, M.; HEPPELL, N. **Continuous Thermal Processing of Food – Pasteurization and UHT Sterilization**. Aspen Publication. 2000.
66. LEWIS, R.N.A.H.; McELHANEY, R.N. The structure and organization of phospholipids bilayers as revealed by infrared spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, Canadá, n.96, p.9-21, 1998.
67. LEWIS, S.J. & GILMOUR, A. Microflora associated with the internal surfaces of rubber and stainless steel milk transfer pipelines. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.327-333, 1987.
68. LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p.476-484, 1984.

69. MAESMANS, G.; HENDRICKX, M.; DE CORDT, S.; VAN LOEY, A.; AND TOBBACK, P. Theoretical Consideration of the General Validity of the Equivalent Point Method in Thermal Process Evaluation. **Journal of Food Engineering**, v.24, p. 225-248, 1995.
70. MAFF. Recommendations for steam cleaning. **CIRCULAR 4/72**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK. 1972.
71. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 370, de 4 de Setembro de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Normas e Diretivas do Mercosul**. 1997.
72. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Instrução Normativa nº51, de 18 de Setembro de 2002. **Diário Oficial da União** (República Federativa do Brasil), 29/09/2002, seção 1. 2002.
73. MARCY, J.E.; NAGY, S. Symposium on nutritional, sensory and chemical changes associated with aseptic packaging of foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.13, p.40-43, 2000.
74. MARCY, M.; GARTHRIGHT, W.; LARKIN, J.W. Design and Analysis. **Food Technology**, v.51, n.10, p. 52-56, 1997.
75. MARTIN, J. H.; STAHLY, D. P.; HARPER, W.J.; GOULD, I.A. Spore-forming microorganisms in selected milk supplies. In: XVI International Dairy Congress, 1962. **Anais**. 1962, C(VIII:1), p.259-304.

76. MARTINS, P. C. Aspectos econômicos da coordenação da cadeia produtiva do leite e seus derivados. In: AGROSOFT 97, 1997, Belo Horizonte. **Anais**. Minas Gerais: 1997.
77. MARTINS, P. C. & YAMAGUCHI, L.C.T. Globalização, política de estabilização e os reflexos no agronegócio de leite brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 36, Poços de Caldas, 1998. **Anais**. Poços de Caldas: SOBER, v.1, p.441-52. 1998.
78. MATTILA, T. Ultrasound echography – a non destructive method for quality control of packed UHT milk. In: Proceedings of Symposium on Mastitis Control and Hygienic Production of Milk. Espoo, Finland: **Orion Farmaceutica**, p.293-297, 1986.
79. MATTILA, T.; AHVENAINEN, R.; WIRTANEN, R.; MANNINEN, M. Ultrasound imaging – a non destructive method for quality control of packed UHT milk. In: Proceedings of International Seminar on Modern Microbiological Methods for Dairy Products. Santander, Spain: **International Dairy Federation**, p.113-115. 1989.
80. MAZAS, M.; GONZALES, I.; LOPEZ, M.; GONZALES, J.; SARMIENTO, R.M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v.30, p.609-620, 1995.
81. MEADOWS, P.S. The attachment of bacteria to solid surfaces. **Archive für Mikrobiologie**, v.75, p.374-381, 1971.

82. MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFTHS, M.W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n.12, p.969-979, 1991.
83. MEHTA, R.S. Milk processed at ultra high temperatures – a review. **Journal of Food Protection**, v.43, n.3, p.212-225, 1980.
84. MEIER, J.; RADEMACHER, B.; WALENTA, W.; KESSLER, H.G. Heat-resistant spores under UHT treatment. In: **Bulletin of the IDF - Heat treatments & alternative methods**, p.17-25, 1995
85. MIKOLAJCIK, E.M.; SIMON, N.T. Heat resistant psychotropic bacteria in raw milk and their growth at 7°C. **Journal of Food Protection**, v.41, p.93-95, 1978.
86. MILES, J.J. **Kinetic data generated under ultra-high temperature continuous processing conditions**. 1993. Ph.D. dissertation, North Carolina State Univ. Raleigh. 1993.
87. MILES, J.J.; SWARTZEL, K.R. Evaluation of Continuous Thermal Process Using Thermocouple Data and Calibrating Reactions. **Journal of Food Process Engineering**, v.18, p. 99-113, 1995.
88. MINDURA, T.M.; WOOD, R.; LEONARD, A.R. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus*. **Public Health Reports**, v.85, p.45-48, 1970.
89. MOGENS, J. Disponível em: <<http://www.kursus.kvl.dk/shares/milk/>>. Acesso em: 05 out. 2003.

90. MONNERAT, R.G. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed): **Controle biológico**. p. 163-2000. Embrapa Meio Ambiente. 2000.
91. MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E.; "Enumeration of *Bacillus cereus* in foods" **Applied Microbiology**, 15:650-653, 1967.
92. MOSSEL, D. A.; CORRY, J.E.L.; STRUJK, C.B.; BAIRD, R.M. **Essentials of the Microbiology of Foods**. 1995.
93. MOSTERT, J.F.; LÜCK, H.; HUSMANN, R. A. Isolation, identification and practical properties of *Bacillus species* from UHT and sterilized milk. **South African Journal of Dairy Technology**, v. 11, n.3, p.125-132, 1979.
94. MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods of Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987.
95. NACIONAL CANNERS ASSOCIATION. **Laboratory Manual of Food Canners and Processors**, v.1, 1968.
96. NELSON, F.E. The microbiology of market milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**, New York, v.1, 1981.
97. NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; BEUMER, R.; GIFFEL, M.; ZWIETERING, M. A risk assessment study of *B. cereus* in pasteurized milk. In: XXV International Congress of Dairy Products. 1998.

98. NUNES, R.V., SWARTZEL, K. R. Modeling Thermal Processes Using the Equivalent Point Method. **Journal of Food Engineering**, v.11, p.103-117, 1990.
99. PACHECO, C.P. **Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT**. 2001. 154p. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 2001.
100. PARRY, J.M. ; GILBERT, R.J. Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. **Journal of Hygiene-Cambridge**, p.84: 77, 1980.
101. PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.
102. PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. Caracterização e implementação de uma política para o leite. **Fundação Cargill**, 116p. 1985.
103. PERIAGO, P.M. **Modelos predictivos de inactivación de *B. stearothermophilus* y evaluation de nuevas metodologias para la obtención de datos cinéticos**. 1998. Ph.D. thesis. Universidad de Murcia, Spain. 1998.
104. PERKIN, A.G.; BURTON, H.; UNDERWOOD, H.M.; DAVIES, F.L. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra-high temperatures. II. Effect of heating period on experimental results. **Journal of Food Technology**, v.12, p.131-148, 1977.

105. PETRUS, R.R.; FARIA, J. A. F. Sistemas de esterilização de embalagens. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**. São Caetano do Sul, v.10, n.70, p.36-38, 1999.
106. PETTERSON, B. ; LAMBKE, F. ; HAMMER, P. ; STACKEBRANDT, E. ; PRIEST, F.G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Microbiology**, v.46, p.759-764, 1996.
107. PFLUG, I.J. ; JONES, A. T. ; BLANCHET, R. Performance of bacterial spores in measure the Fo-value delivered to cans of food heated in a sterile retort. **Journal of Food Science**, v.45, n.4, p. 940-945, 1980.
108. PHILIPS, J.D. & GRIFFITHS, M.W. The relation between temperature and growth of bacteria in dairy products. **Food Microbiology**, v. 4, p.173-185, 1990.
109. PICININ et al. Qualidade microbiológica e pesquisa de inibidores em leite cru resfriado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2000.
110. QUALITY MANAGEMENT. Quality in Chemistry Scheme. Disponível em: <<http://www.qualitymanagement.co.uk>>. Acesso em 15 out. 2003.
111. QUEIRÓZ, M.I. & ROSA, L.S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do leite cru a partir da aplicação de princípios do APPCC. In: V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. 2003.

112. RAJKOWSKI, K.T.; MIKOLAJCIK, E.M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.50, p.199-205, 1987.
113. RANGASAMY, P.N.; IYER, M. and ROGINSKI H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, 1993.
114. REVISTAQUÍMICA. Disponível em:
<http://www.quimica.com.br/revista/qd413/analise_instrumental1.htm>. Acesso em 13 jan. 2004.
115. REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. 1st ed. Lancaster: Technomic Publishing Company INC. Cap 13. 1989. 269p.
116. RIDGWAY, J.D. The incidence and thermal resistance of mesophilic spores found in milk and related environments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.21, p.118, 1958.
117. RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em: http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo8.pdf. Acesso em: nov. 2001. 1952.
118. RONNER, U. A new biological indicator for aseptic sterilization. **Food Technology International Europe**, p.43-46, 1990.
119. RUSUL, G. & YAACOB, N.H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, n.2, p.131-139, 1995.

120. SADEGHI, F.; SWARTZEL, K.R. Generating kinetic data for use in design and evaluation of high temperature food processing systems. **Journal of Food Science**, v.55, p.851-853, 1990.
121. SALA, F.J.; IBERZ, P.; PALOP, A.; RASO, J.; CONDÓN, S. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus subtilis* at different pH values. **Journal of Food Protection**, v.58, p.239-243, 1994.
122. SARDA, J.M.; PARDO, J.S.S. **Higiene Veterinária**. 1952.
123. SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, Durham, 1998.
124. SCHRAFT, S.F.L.H.; GRIFFITHS, M.W. Identification of *Bacillus cereus* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.921-923, 1998.
125. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria 451, de 19 de Setembro de 1997. Padrões Microbiológicos em Alimentos. **Diário Oficial** (República Federativa do Brasil). 1997.
126. SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.77, p.13-21, 2001.

127. SINGH, R.K. Modeling of residence time distribution and process evaluation for liquid foods under turbulent flow. 1995. Disponível em: <<http://ebe.www.ecn.purdue.edu/ABE/Research/research95>>. Acesso: ago. 2003.
128. SNEATH, P.H.A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In P.H.A. Sneath, N. S. Mair, M.E. Sharp and J.G. Holt (eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, v.2, p.1141-1199, 1986.
129. SPEERS, J.G.S. ; GILMOR, A. ; FRASER, T.W. ; McCALL, R.D. Scanning electron-microscopy of dairy equipment surfaces contaminated by two milk-borne microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 57, p.139-145, 1984.
130. STABEL, J.R.; STEADHAM, E.M.; BOLIN, C.A. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.12, p.4975-4977, 1997.
131. STATUTORY INSTRUMENTS. **Food milk and dairies, the dairy products (hygiene) regulations**. No. 1086. London: HMSO. 1995.
132. STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. 2nd ed. 1996
133. STINSON, W.M.; FORWALTER, J. Selection guide: Cleaning and sanitizing compounds. **Food Processing**, v. 39, n. 2, p.34-38, 1978.
134. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2nd ed., N. Y. Academic Press.1973. P

135. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. N. Y. Academic Press, 1965. 235p.
136. STROUP, W.H. ; DICKERSON, R.W. Jr. ; READ, R.B. Jr. Two-phase slug flow heat exchanger for microbial thermal inactivation. **Applied Microbiology**, v.18, p.889-892, 1969.
137. SVENSSON, B.; CHRISTIANSSON, A.; ENEROTH, A.; BRENDEHAUGT, S. Propagation of *B. cereus* in the dairy processing line. In: XXV International Congress of Dairy Products. 1998.
138. SWARTZEL, K. R. Arrhenius Kinetics as Applied to Product Constituent Losses in Ultra High Temperature Processing. **Journal of Food Science**, v. 47, p.1886-1891, 1982.
139. SWARTZEL, K.R. A continuous flow procedure for reaction kinetic data generation. **Journal of Food Science**, v.49, p.803-806, 1984.
140. TAMEGA Jr. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos**. 2005. 196p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.
141. Te-GIFFEL, M.C. ; BEUMER, R.R. ; SLAGHUIS, B.A. ; ROMBOUTS, F.M. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. **Neth. Milk. Dairy Journal**, v.49, n.213, p.125-138, 1995.

142. TERNSTROM, A.; LINDBERG, AM.; MOLIN, G. "Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine-milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*" **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, n.1, p.25-34, 1993.
143. TETRA PAK. Disponível em: <http://www.bebaleite.com.br>. Acesso em 12 set. 2001.
144. TETRA PAK. Disponível em <http://www.bebaleite.com.br>. Acesso em out. 2003.
145. TETRA PAK. Comunicação pessoal. 2004
146. THOMAS, S.D.; EGDELL, J.W.; CLEGG, L.F.L.; CUTHBERT, W.A. Thermoduric organisms in milk. Part I. A review of the literature. **Proc. Soc. Appl. Bacteriol.**, v.37, p.27-64, 1950.
147. THOMLINS, R.I.; ORDAL, Z.J. Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria. In: Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes. **Society for Applied Bacteriology Symposium Series**. Skinner, F.A. & Hugo, W.B, (eds), London: Academic Press, n.5, p.153-190, 1976.
148. TOLEDO, R.T. **Fundamentals of food process engineering**. 2nd ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
149. TWIEHAUSS, M. J. Anthrax (splenic fever, charbon, Milzbrand). [*Bacillus anthracis*, cattle, infectious diseases], In Gibbons, W.J. (Ed). **Bovine Medicine and Surgery**, p. 149-155, 1970.

150. van-NETTEN, P. ; KRAMER,J.M. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, n.2, p.:85-99, 1992.
151. VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, C. L. M. Kinetic Parameters Estimation for Ascorbic Acid Degradation in Fruit Nectar Using the Partial Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) Method under Non-Isothermal Continuous Heating Conditions. **Biotechnology Progress**, v.17, p.175-181, 2001.
152. VIEIRA, M.C. et al. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.71-81, 2002.
153. von BOCKELMANN, B. **Aseptic packaging processing**. Tetra Pak International. 1982.
154. WANG, D.I.C.; SCHARER, J.; HUMPHERY, A.E. Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. **Applied Microbiology**, v.12, p. 451-454, 1964.
155. WELT, B. A., TEIXEIRA, A. A., BALABAN, M. O., SMERAGE, G.H., AND SAGE, D.S. Iterative Method for Kinetic Parameter Estimation from Dynamic Thermal Treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p.8-14, 1997.

156. WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p.572-580, 1981.
157. WESCOTT, G.G. Comparison of thermal inactivation kinetics for batch and continuous flow processing. 1993. **M.S. thesis**, North Carolina State Univ., Raleigh. 1993.
158. WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, v.60, n.3, p.446-450, 1995.
159. WHITE, F.M. **Heat and Mass Transfer**. Addison-Wesley Publishing Company. 1991.
160. WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
161. WIRTANEN, G.; AHVENAINEN, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. Non-destructive detection of spoilage of aseptically-packed milk products: effect of frequency and imaging parameters on the sensitivity of ultrasound imaging. **Lebensm Wissu-Technology**, v. 25, p.126-132, 1992.
162. WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Decker Inc. 1984.

163. YAMADA, S. ; OHASHI, E. ; AGATA, N. ; VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1483-149, 1999.
164. ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F.; DESTRO, M.T. ; ANDRIGUETO, C. Ocorrência de *B. sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência E Tecnologia Alimentar**, v.20, n.3, p.363-368, 2000.

Parte 4: Estruturação dos resultados em artigos científicos

Os resultados experimentais foram analisados e estruturados em três artigos científicos como descrito abaixo:

Capítulo 2: MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

Ensaio de Esterilidade Comercial em Leite integral UHT produzido no Brasil

Padronização da metodologia PCR e do primer para *Bacillus cereus*

Série bioquímica confirmatória e diferencial para *B. cereus*

Ensaio genético de PCR para isolados suspeitos

Identificação de *Bacillus* por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier

Capítulo 3: *Bacillus cereus* KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS

Produção e contagem de suspensão de esporos de *Bacillus cereus* 0486

Determinação dos parâmetros cinéticos de *Bacillus cereus* 0486 em tubo TDT

Determinação dos parâmetros cinéticos de *Bacillus cereus* 0486 em planta piloto de esterilização contínua *Microthermics*, existente na FEA/UNICAMP, pelo método do Ponto Equivalente e pelo método das Exposições Isotérmicas Equivalentes Pareadas

Capítulo 4: *Bacillus cereus* INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY

Ensaio com embalagens inoculadas para avaliar parâmetros cinéticos e taxa de defeitos

CAPÍTULO 2

MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Scientia Agrícola”

1
2
3
4
5
6 **MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK**
7
8
9

10 **Cristiana de Paula Pacheco Sanchez*; Pilar Rodriguez de Massaguer**
11
12
13

14 **Laboratório de Termobacteriologia**
15 **Departamento de Ciência de Alimentos**
16 **Faculdade de Engenharia de Alimentos**
17 **Universidade Estadual de Campinas**
18 **CNPq**
19
20
21

22 *** Corresponding Author: pacheco@fea.unicamp.br**

MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

ABSTRACT

Commercial sterility tests of 6,500 UHT milk packages was studied after 10 days incubation at 37 C and 7 C (in order to germinate all possible spores and/or to recuperate injured vegetative cells) followed by pH measurement. Samples (1,300 packages each) from five Brazilian UHT plants based on direct steam injection processors of whole UHT milk in carton packages were investigated for the presence of *Bacillus cereus* through phenotypic and genetic (PCR) tests. The PCR methodology and primers were implemented for *B. cereus* identification. pH values were significantly different for the samples analyzed, reflecting the variability of the raw material and region of production, severity of the thermal process and handling package conditions. After storage of samples, only four suspected packages with pH measurement below the lower limit of 6.5 were verified and analyzed for the presence of *B. cereus*. *B. cereus* was detected in no sample analyzed indicating that, the five Brazilian UHT milk processors did not present pathogenic microorganisms in respective samples showing that the UHT milk is in accordance with the current standard. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and PCR tests were efficient and must be adopted to confirm the biochemical series for *B. cereus*.

Key words: UHT milk, Bacillus cereus, PCR, Commercial sterility.

MICROBIAL SAFETY OF BRAZILIAN UHT MILK

RESUMO

A esterilidade comercial de 6.500 embalagens de leite UHT foi estudada, após incubação das amostras a 37°C e 7°C por 10 dias (para germinar todos os possíveis esporos e/ou recuperar células vegetativas injuriadas), seguida de medida de pH. 1.300 amostras de cada uma de 5 plantas Brasileiras de processo UHT, baseado em injeção direta de vapor, para leite integral envasado em embalagens cartonadas foram testadas e investigadas em relação à presença de *Bacillus cereus*, por testes fenotípicos e genéticos (PCR) . A metodologia PCR e os primers foram implementados para a identificação de *B. cereus*. Os valores de pH foram significativamente diferentes para as amostras analisadas, refletindo a variabilidade da matéria-prima e a região de produção, a severidade do processo térmico e as condições de manuseio do produto final. Após a estocagem das amostras, somente quatro embalagens suspeitas, com medida de pH abaixo de 6.5, foram verificadas e analisadas na procura por *B. cereus*. Não foi detectado *B. cereus* em nenhuma embalagem analisada, indicando que o leite integral UHT Brasileiro, das cinco plantas processadoras, não apresenta o microrganismo patogênico. Somente microrganismos deteriorantes foram isolados, sem contagem, indicando que dentro do espaço amostral, o leite UHT analisado está em concordância com a corrente legislação, sem representar riscos e problemas de saúde aos consumidores. A Transformada de Fourier por Infra Vermelho (FTIR) e a Reação em cadeia da polimerase (PCR) foram considerados eficientes e devem ser adotados para confirmar a série bioquímica de *B. cereus*.

Palavras chave: Leite UHT, Bacillus cereus, PCR, Esterilidade Comercial.

INTRODUCTION

Milk is a product of great importance due to its nutritional value. The attributes of milk quality may be summarized in three components: nutritional value, hygienic quality and maintenance of the sensorial properties. The causes of milk quality loss are mainly related to health and handling of the flocks in the farms that supply the dairy plants (Tetra Pak, 2003).

Milk is heat treated to provide absence of pathogenic bacteria and to maintain its quality. For this purpose, it may be pasteurized or submitted to UHT process. In the pasteurization process, the milk is submitted at 72-75C for 15-20 s (BRASIL, 2002) promoting the destruction of pathogens, but thermoduric bacteria such as *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* and spores may survive, contaminating the product and modifying properties after a few days at room temperature or about 1 week under refrigeration.

In the UHT process, milk is submitted for 2-4 s at 130-150C, in the continuous flow system with immediate refrigeration and aseptically pack in hermetic packages (BRASIL, 1997) denoting a satisfactory product, with sensorial and nutritional properties similar to those of pasteurized milk (Franklin, 1970). The UHT milk has become a preferential product of the Brazilian consumers and its production and consumption has increased during the last decade from 187 million liters to 4,200 million liters (ABLV, 2003).

The sporicidal efficiency required for a UHT treatment is mainly related to the number of heat resistant spores present in the raw milk, their heat resistance and their acceptable numbers in the final product.

86 As far as the milk market is concerned, spoilage of 1 contaminated unit in 1,000
87 processed is commercially acceptable, although it should be added that the industrial
88 quantitative determination of the spore forming bacteria presence in raw milk will guide the
89 severity of the applied thermal process and also indicate the percentage of defective
90 packages in any lot, in order to evaluate the quality of the applied process (Franklin, 1970).
91 Cerf (1988) affirms that the criteria for defective packages have dropped down to 5:10,000
92 units.

93 A simple method to determine the proportion of defective units in a lot of UHT milk
94 is to measure the pH and evaluate the gas formation, smell, color, coagulation and phase
95 separation of the product, after commercial sterility test; and then, to isolate the
96 deteriorative microorganisms are carried out. These procedures are fast and cheap (von
97 Bockelmann, 1982).

98 von Bockelmann (1982) affirms that it does not seem reasonable to use highly
99 accurate and expensive methods for the detection a defective unit with low probability of
100 recuperation. It seems more reasonable to increase the probability of including a defective
101 unit in the sample lot even if this is done at the expense of discovering this defective unit.
102 The last alternative offers a chance, whereas the first does not. In other words, this means
103 that simple evaluation methods are recommended instead of sophisticated ones. It is
104 believed that it is preferable to check a large number of samples with relatively crude
105 methods rather than to check a limit number of samples with sophisticated methods.
106 Therefore, in the case of non-acid food, von Bockelmann (1982) recommended a sensoric
107 evaluation combined with a pH determination, which may be easily performed with the aid
108 of a potentiometer or by using a suitable indicator.

Cerf (1988) reinforced the need of a large sample size to evaluate the UHT milk commercial sterility test, taking into account the sensitivity of the technique to indicate defects.

Brazilian raw milk presents pH between 6.60 and 6.65 (Sarda & Pardo, 1952; Peixoto et al, 1985) and pH between 6.6 and 6.8 for UHT milk (von Bockelmann, 1982) with an average of 6.63 (Quality Management, 2003). Considering that one of the rules for evaluating UHT milk stability, during its shelf life, is: the fluctuations in pH values should be lower than 0.2 pH units (von Bockelmann, 1988); it can be affirmed that: assuming UHT milk pH average as 6.70, a minimum limit of 6.5 may be established as a simple criterion to identify non sterile samples with considerable safety margin.

Bacillus spp. are the greatest responsible for the spoilage of perishable food such as milk and its derivatives (Meer et al, 1991). The occurrence of 1.0E+04 and 1.0E+05 CFU of *B. cereus*/mL in pasteurized milk have already been reported in 5% of the analyzed samples (Notermans et al, 1998). *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. subtilis* and *B. brevis* have been reported as cause of diseases, when contaminated foods are consumed (Kramer & Gilbert, 1989).

B. cereus may cause two types symptoms when contaminated foods are consumed: by emetic and/or diarrheal toxin (Drobniewski, 1993; Granum, 1994). More recently, Chut et al (2001) reported fatal cases of neonatal meningitis due to *B. cereus* infection. Moreover, according to the Brazilian Resolution RDC 12 for Microbiological UHT Milk Standards, the absence of pathogenic bacteria must be verified after incubation of the hermetic packages at 35-37 C for 7 days (Anvisa, 2001).

It is known that *B. cereus* may survive the pasteurization process. Its thermal resistance at 100 C is about 5.5 min (Mossel et al, 1967), but the survival is very rare at 145 C. Literature brings only one report that quotes an extremely resistant isolate surviving at 135 C for 4h when 1.0E+05 to 1.0E+06 was inoculated (Franklin, 1970)

Mossel et al (1967) considered MYP (Mannitol egg Yolk agar - Difco), with polymyxin 0.1%, as the best media to recover survivors; its effectiveness was verified even at low bacterial concentrations (10 CFU/ml).

van Netten & Kramer (1992) elaborated a review of the selective culture media for *B. cereus* and indicated both PEMBA (Polymyxin B-Egg yolk Mannitol Bromotimol blue Agar - Difco) and MYP as the best and simplest media to recover this microorganism. However, Ragasamy et al (1993) verified strong trend of colonies spreading in PEMBA.

More recently, a Chromogenic *Bacillus cereus* Agar media (Oxoid, 2005) intent to substitute MYP media because it incorporates the chromogenic 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucopyranoside substrate, which is cleaved by the enzyme β -glycosidase present in *B. cereus* resulting in the formation of blue/green colonies in the attempt to recuperate, to characterize and to distinguish this pathogen between similar *Bacillus* species, more specifically *B. thuringiensis* that is biochemically identical to *B. cereus*. This media has the combination of Polimixin B and Trimethoprim and it has shown to be more effective than the use of Polimixin alone.

In 1998, 120 samples of Brazilian UHT milk were analyzed in a survey for members of the cereus group (*B. cereus*, *B. cereus* var *mycoides*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*) indicating that 34.17% of the total analyzed samples were positive, suggesting the need of sanitary conditions improvements for the process of this product (De Rezende, 1998).

Reviewing the procedure proposed by the last mentioned author, it was possible to observe a low number of contaminated samples analyzed and in the experimental methods that could lead to erroneous results. Considering the pathogenicity of this microorganism, a research in the Brazilian market became relevant in order to establish the real incidence of this pathogenic microorganism in whole UHT milk.

A phenotypic series are not fully reliable, the identification of *B. cereus*, applying PCR (Polymerize Chain Reaction) technique has been recommended as an excellent tool for tracing recontamination sites in dairy processing lines (Williams et al, 1990; Svensson et al, 1998). Another method, the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) may be used to record the infrared spectrum of whole cells, such as bacteria in a film, or even, in conjunction with an infrared microscope, the spectrum of a single cell (Dong et al, 1988).

FTIR spectroscopy was introduced as a method for the classification and identification of bacteria (Naumann et al, 1991). The objective of the absorption spectroscopy is the rapid characterization of the structural features of biological molecules and complex material such as bacteria, with the advantage that some coincidence of spectra in two different composites is improbable (Lin et al, 1998; Chemical Magazine, 2004).

Beattie et al (1998) concluded that FTIR is a rapid and accurate method for the differentiation of species in the genus *Bacillus*, including closely related species of the *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* which are very importance for the food and dairy industries.

The main objective of this study was to investigate the presence or absence of *Bacillus cereus* through microbiological survey in 6,500 carton packed whole processed UHT milk samples (pH 6.6-6.8).

MATERIAL AND METHODS

Commercial sterility test for *B. cereus*. An initial survey was conducted to establish the commercial sterility of 500 hermetic packages of whole UHT milk (1-2 months of shelf life) from five Brazilian UHT milk industries. Sampling comprised 100 packages of each brand (A, B, C, D and E) where half were incubated 10 days at 37C and the others 10 days at 7C in order to isolate vegetative cells of mesophilic and psychrotrophic *B. cereus* strains. After incubation period, the packages were checked visually for defects and aseptically opening under laminar flow. After this procedure, gas formation, smell, color, milk coagulation and phase separation were recorded as pH measurement, in a pH meter model mPA-210 (MS Tecnozon). For each sample with pH less than 6.5 and/or positive to gas formation, smell, color, coagulation and phase separation, 50ml were added to 450ml Butterfield's phosphate-buffered (pH 7.2) and blended for 2 min at 18,000-20,000 rpm, following the FDA (1998) procedure for *B. cereus* enumeration.

According to the FDA method, typical *B. cereus* colonies on Mannitol Egg Yolk Agar (MYP-Difco) supplemented with Polimixin B sulfate 0.1% (Sigma), are surrounded by a precipitated zone which indicates lecithinase activity and a pink color is observed because mannitol is not fermented. Furthermore, 3mm loopful of milk were transferred to DTA (Dextrose Tryptone Agar - Difco) and BHI (Brain Heart Infusion - Difco) searching for flat sour sporeformers and *B. sporothermodurans*, respectively, in order to recuperate all possible contaminants with 48h incubation at 37C. All typical and atypical colonies on MYP were isolated, codified, transferred to NA (Nutrient Agar - Difco) slants and incubated at 30C or 7C for 24h for biochemical tests of *B. cereus*. For DTA and BHI isolates, incubation was at 37C for 48h.

The second survey evaluated the commercial sterility of 1,200 milk samples of each brand (A, B, C, D and E). Six hundred packages were incubated at 37C and 7C, respectively, to detect non sterile units among, in 93% of the cases, with 95% of confidence (Ahvenainen, 1988).

Confirmatory test for *B. cereus*. All isolates from NA, with 24h culture, were examined by Gram and spores stain for morphologic characterization and catalase/benzidine test. Other confirmatory tests with the same culture, after resuspension in phosphate-buffered dilution water (pH 7.2), were carried out: anaerobic growth in phenol red glucose broth, reduction of nitrate to nitrite; modified VP (Voges-Proskauer) test for production of acetyl methyl carbinol; decomposition of tyrosine and resistance to lysozyme (FDA, 1998).

The isolates that presented negative catalase were tested for growth on Man, Rogosa and Sharpe (MRS- Oxoid) and skim-milk broth.

Differential test for *B. cereus*. The following tests were applied to differentiate typical strains of *B. cereus* from other members of the cereus group: Motility test; Rhizoid Growth on NA; Test for Hemolytic Activity; Test for protein toxin crystal production (FDA, 1998).

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). All colonies obtained were transferred, in duplicate, to plates on the same culture media and sent to Stuttgart, Germany, GmbH Center, (Lembke, 2004) for complete identification.

Genetic test for *B. cereus*. PCR test was applied for genotypic confirmation of *B. cereus*. The procedure was carried out at the UNICAMP Genetic Laboratory. Specific primers Invitrogen Brazil for *B. cereus* were used (Yamada et al, 1999). The reaction procedure was based on the recommendations of above mentioned authors, but some modifications were included (Rosato, 2003). Thus, the final reaction (25µl) consisted of: 3µl of the isolated cells in NB (Nutrient Broth - DIFCO) incubated at 32°C for 18 h; 4µl of primer; 2.5µl of reaction buffer PCR 10X - Tris-HCl, 200mM; MgCl₂, 2nM; KCl, 500mM; pH 8.4; 2.5µl of deoxynucleoside triphosphates (Invitrogen Brazil); 0.2µl of Taq DNA Polymerase (Invitrogen Brazil) and 13µl of sterile distilled water.

A PTC-100 Peltier-Effect Cycling (M.J. Research, Inc.) was programmed with the following cycles in order to amplify the DNA: 1 cycle for 3 min at 94C; 30 cycles, each consisting of 1 min at 94C, 1.5 min at 58C and 2.5 min at 72C, with a final extension step for 7 min at 72C (Yamada et al 1999; Rosato, 2003).



Two typical strains of *B. cereus* ATCC 11778 and ATCC 14579 and one strain of *B. thuringiensis* ATCC 10972, available at the UNICAMP Termobacteriology Laboratory, were tested after the standardization of the method. After the amplification of the DNA, the PCR fragments were analyzed by submarine gel electrophoresis (Power Pac 3000, Bio-Rad) and visualized under UV illumination (Electronic UV Transluminator, Ultra-Lum). Suitable molecular size markers (100bp) were included to guide the size of the amplification band (Rosato, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Commercial sterility test for *B. cereus* in Brazilian milk

Table I presents the results from the initial survey and commercial sterility tests.

Table 1. Results from the first commercial sterility tests

	<i>BRANDS</i>									
	<i>A</i>		<i>B</i>		<i>C</i>		<i>D</i>		<i>E</i>	
	37C	7C	37C	7C	37C	7C	37C	7C	37C	7C
Number of whole milk samples incubated	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Samples without visual physical alteration*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Samples without pH alteration	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Samples without sensorial alteration**	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Reason of defect	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Gas formation; **Color, smell, phase separation

No positive packages were detected in the initial survey that reproduced the rate found by De Rezende (1998). In addition, occurrence of *B. cereus* or any other microorganisms were not verified in 500 samples.

The sampling criterion was modified to increase the number of samples in order to detect low defective rates. According to von Bockelmann (1988), it would be necessary to incubate 3,000 samples, for each incubation temperature and brand, in order to discriminate 1:1,000 defective packages mentioned by Franklin (1970) with a probability confidence of 95% assured for aseptic lines (Ahvenainen, 1988). Thus, assuming a reason of defects of 0.005, 600 samples were incubated, for each temperature and brand, with the probability confidence of 93%, in order to have the expectation of recovery up to 3 defective packages and find, at least, 1 non sterile package.

For the second commercial sterility test, the reason of defects was calculated as the number of defective experimental samples per total number of analyzed samples in each brand.

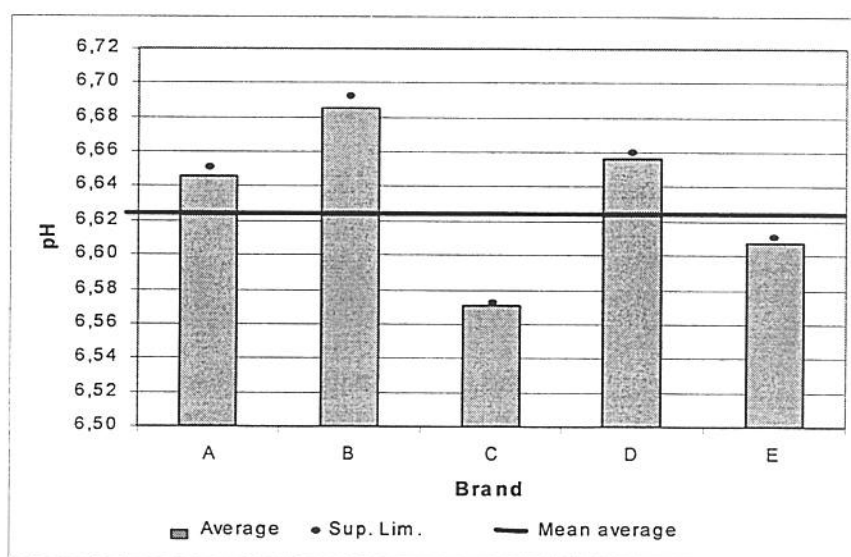
Table 2 shows the reason of defects after incubation at 37C.

Table 2. Results from the second commercial sterility test after incubation at 37C

	BRANDS				
	A	B	C	D	E
Number of whole milk samples incubated	600	600	600	600	600
Samples without physical alteration*	599	600	599	599	600
Samples without pH alteration	599	600	599	599	600
Samples without sensorial alteration**	599	600	599	599	600
Reason of defect	0.00167	0	0.00167	0.00167	0

* Gas formation; **Color, smell and phase separation

Brands A, C and D showed one package with pH below the limit of 6.50 where positive result for viable bacterial cell were verified, gas formation, change in color for sample from brand D and change in smell for sample from brand A and C. Graph 1 present the averages and the superior limit of the confidence interval (95%) and Table 3 denotes the respective pH measurements.



Graph 1. Average and pH superior limit for UHT milk samples incubated at 37 C

Table 3. pH values for UHT milk samples incubated at 37 C.

	A	B	C	D	E
Average	6.646	6.687	6.570	6.656	6.607
Standard Deviation	0.067	0.060	0.029	0.052	0.050
CI* of average	6.641-6.651	6.683-6.692	6.568-6.573	6.652-6.660	6.603-6.611
Minimum pH value	6.13	6.54	6.04	5.62	6.54
Maximum pH value	6.77	6.79	6.62	6.73	6.73
Amplitude of the pH distribution	0.64	0.25	0.58	1.11	0.19
CI*	0.005	0.005	0.002	0.004	0.004

*Confidence Interval

The lowest pH measurement, after 10 days incubation at 37C, occurred in brands: A (6.13), C (6.04) and D (5.62) samples and the highest in brand B sample (6.79).

The largest pH variability (standard deviation) was observed in samples from brand A followed, in decreasing order, by samples from brands B, D, E and C.

The large amplitude of pH distribution was observed in brand D (1.11 pH units). The largest pH average value occurred in brand B (6.68) and the lowest in brand C (6.57).

Brand E presented the greatest homogeneity in the lot, since its pH amplitude distribution was the lowest (0.19).

Table 4 shows the reason of defects after incubation at 7C.

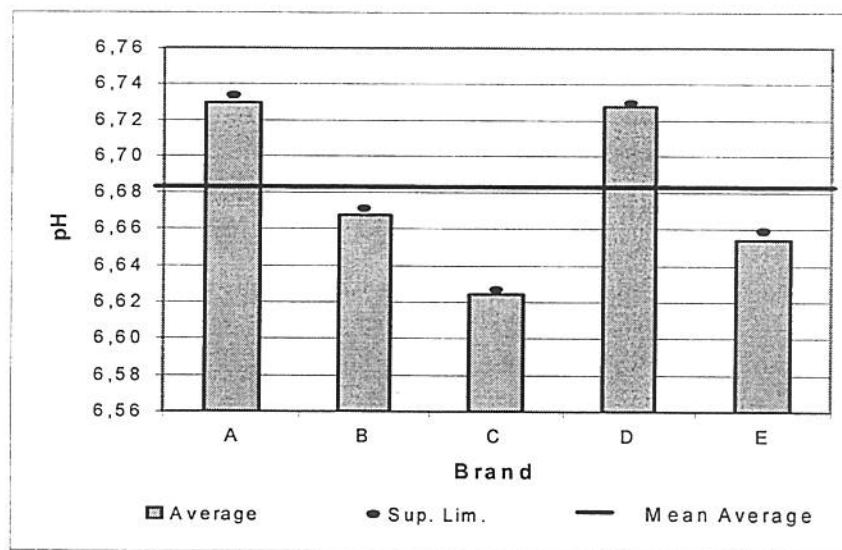
Table 4. Results from the second commercial sterility test after incubation at 7C

	BRANDS				
	A	B	C	D	E
Number of whole milk samples incubated	600	600	600	600	600
Samples without physical alteration*	600	600	600	600	599
Samples without pH alteration	600	600	600	600	599
Samples without sensorial alteration**	600	600	600	600	599
Reason of defect	0	0	0	0	0.00167

* Gas formation; **Color, smell and phase separation

For incubation at 7C, samples from brand E presented one defective package with pH value measured below the limit of 6.50.

Graph 2 presents the averages and the superior limit of the confidence interval (95%) and Table 5 denotes the respective pH measurements.



Graph 2. Mean and superior limit of pH for UHT milk samples incubated at 7°C

Table 5. pH values for UHT milk samples incubated at 7°C.

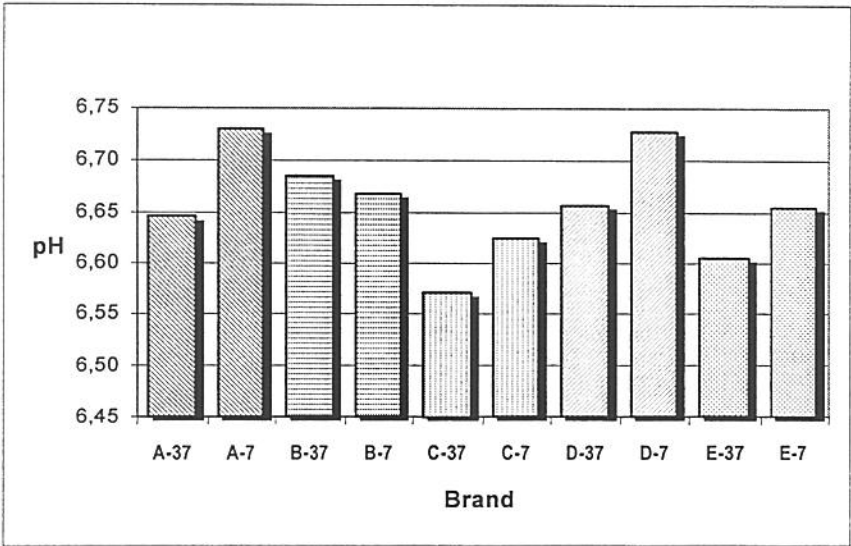
	A	B	C	D	E
Average	6.730	6.667	6.625	6.728	6.655
Standard Deviation	0.048	0.047	0.025	0.022	0.055
CI* of average	6.726-6.733	6.664-6.671	6.622-6.627	6.726-6.729	6.650-6.659
Minimum pH value	6.62	6.57	6.54	6.65	5.98
Maximum pH value	6.87	6.76	6.68	6.80	6.83
Amplitude of the distribution	0.25	0.19	0.14	0.15	0.85
CI*	0.004	0.004	0.002	0.002	0.004

*Confidence Interval

The highest pH measurement was 6.87 in the brand A. The largest variability occurred in the brand E followed in decreasing order by brands, A, B, C and D. At 7°C, the highest average pH value was 6.73 for brand A and the lowest, 6.63, for brand C. Brand C and D presented greater homogeneity in the lot, since the respective pH amplitude distribution was 0.14 and 0.15 and the standard deviation 0.022 and 0.025, respectively.

Effects of temperature (37C and 7C) in the pH distribution

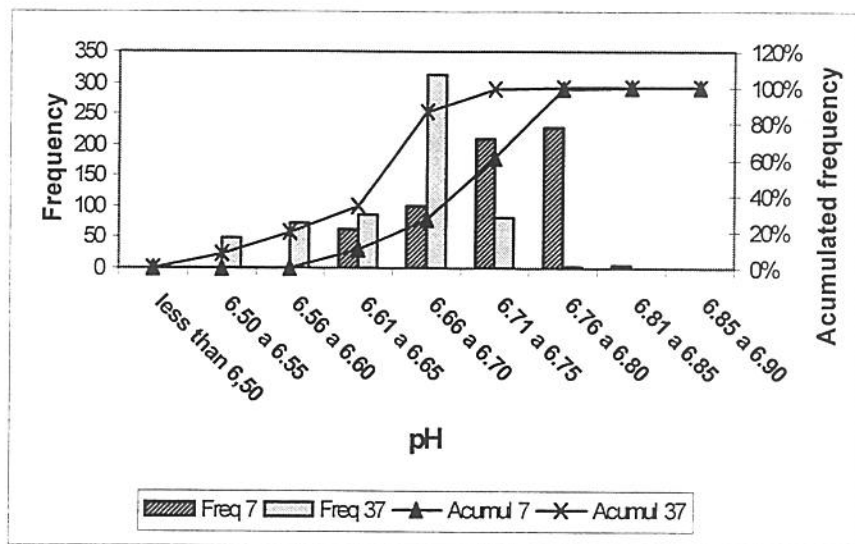
Comparing both incubation temperatures, it was observed that, except for brand B, the average pH value was higher after incubation at 7C; indicating a possibility of larger mesophilic bacterial activity at 37C than at 7C. But this fact alone is not the only reason for low pH values, once at 37C protein denaturation have began to occur along 10 days incubation. This fact could lead to an oxidation reaction that would lower the pH of the product slightly at that temperature (Fox, 1992). Graph 3 presents the comparison between pH measurements at 7C and 37C



Graph 3. Comparison between pH measurements after incubation at 7C and 37C

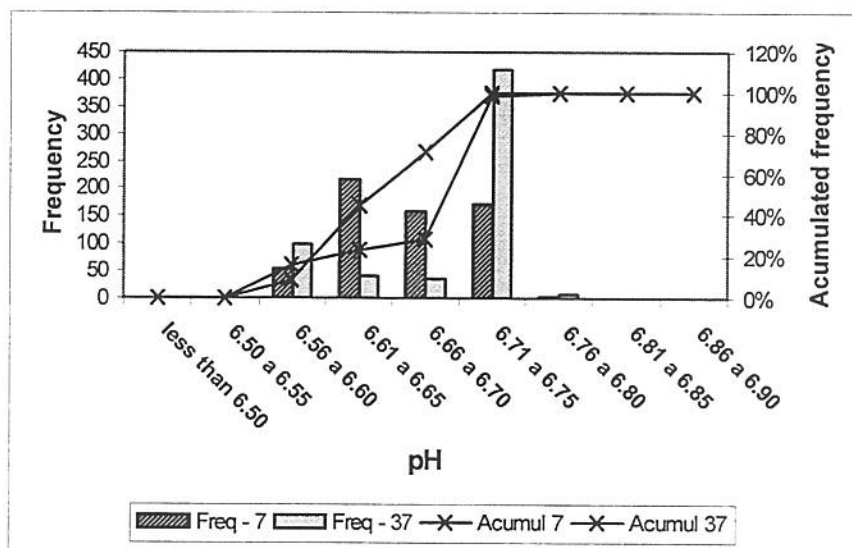
For brand A, the difference between the measurement at 7C and 37C was 0.083 and for brand D, C, E and B it was 0.071, 0.054, 0.047 and 0.020, respectively.

Graphs 4, 5, 6, 7 and 8 present simple frequency distributions (in columns) and the accumulated frequency (in lines) with amplitude intervals of 0.5, at both temperatures, by brand.



Graph 4. pH frequency distribution for samples from brand A

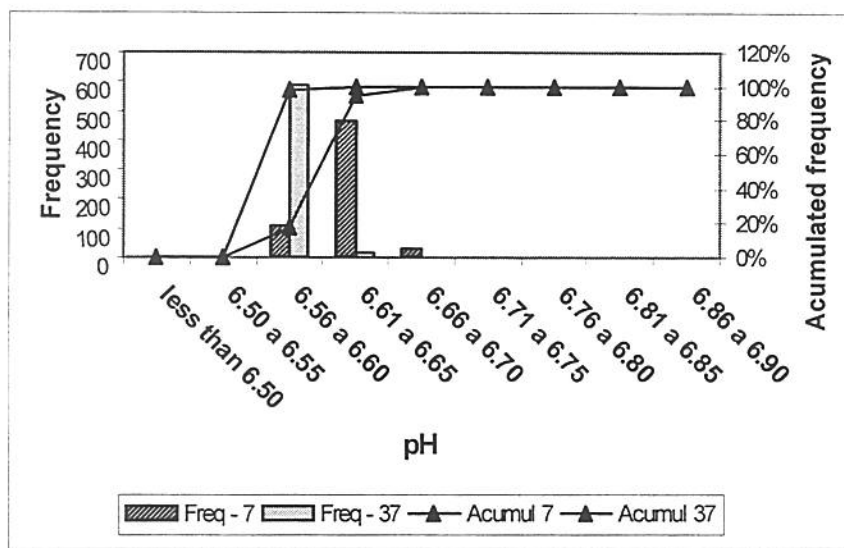
Brand A presented 0.167% of the samples with pH below 6.50. Only this brand presented 48 measurements between 6.50 and 6.55.



Graph 5. pH frequency distribution for samples from brand B

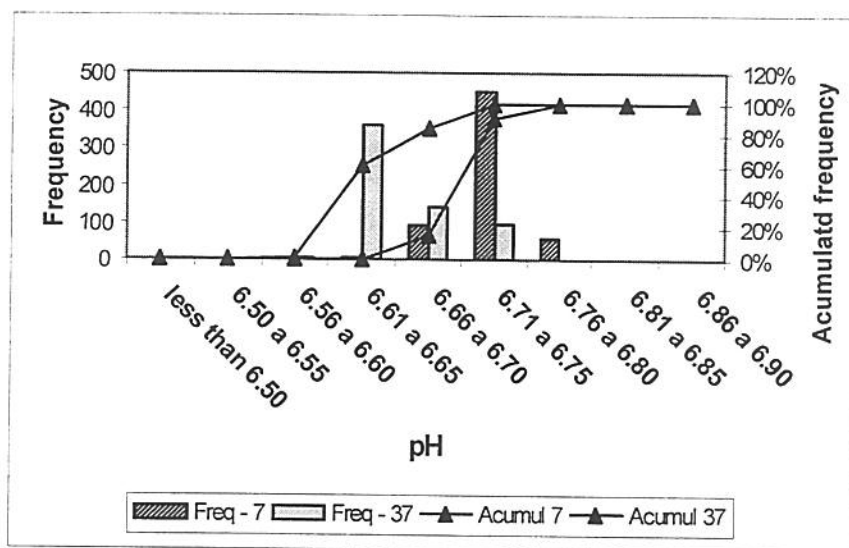
Most part (69.67%) of the pH values for samples from brand B after incubation at 37C were concentrated between 6.71 the 6.75.

No measurements below 6.50 had occurred for both temperatures. Thus, brand B showed a very good stability all packages showed pH measurements above 6.5.



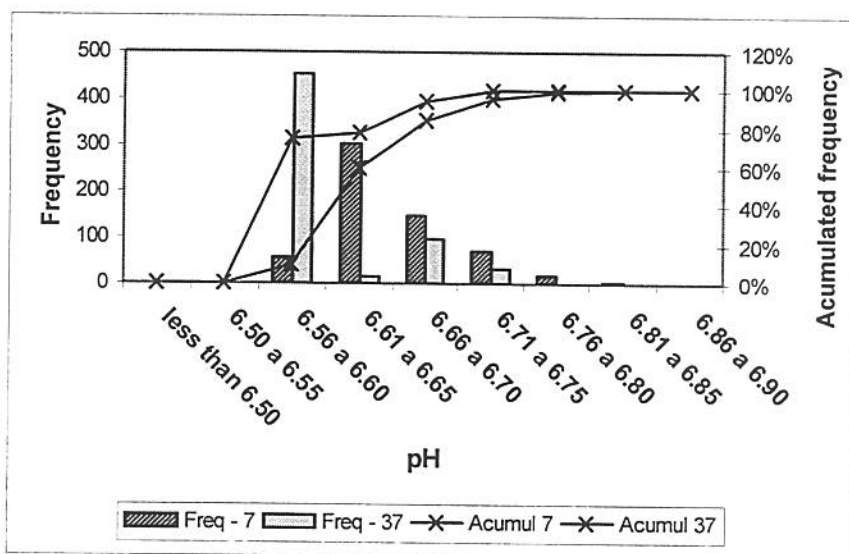
Graph 6. pH frequency distribution for samples from brand C

Milk pH measurements (97%) from samples from brand C, after incubation at 37C, were between 6.56 and 6.60), concentrating a large number of samples close to the mean value. At this temperature one measurement occurred below the limit (6.04). This brand showed the most homogeneous milk samples.



Graph 7. pH frequency distribution for samples from brand D

Milk pH measurements (75%) from brand D, after incubation at 7 C, were between 6.71 and 6.75). At 37 C occurred 0.167% of measurements below 6.50.



Graph 8. pH frequency distribution for samples from brand E

Approximately 76% of the pH measurements from samples from brand E after incubation at 37C, were found between 6.56 and 6.60. For this brand, only one package presented a pH measurement of 5.98, at 7 C, indicating the presence of psicrotrophic activity.

In all cases, when pH measurements are analyzed, the physico-chemical changes in UHT treated milk during storage must be considered. Akhtar et al (2003) studied the changes in pH, acidity and viscosity of UHT milk after 0, 30, 60 and 90 days of storage at room temperature. They indicated an increase in acidity and viscosity with a decrease in pH. After 60 days, the decrease in pH value was 0.12, with a 6.62 measurement. This value is still greater than 6.5 adopted in this research, even though, the temperature was higher (37 C); but choosing this lower limit the challenge is great and the safety margin is increased.

The decrease in pH of milk samples, during storage, may be due to a number of reasons. It is well known that pH involves the negative logarithm of hydrogen ion concentration, which means if acidity increases pH will decrease. Storage time and temperature have great effect on pH values of the stored samples as reported by Kocak and Zadow (1985).Reddy at al (1991) studied the effect of storage temperature on UHT whole milk stored at room temperature (20-22 C), 37 C and at 4-6 C for six months. During storage pH, heat and alcohol stability and reflectance of all samples decreased. The greatest decrease rate was observed in samples stored at 37 C followed by those stored at room temperature. Rise in temperature favored the growth of bacteria resulting in the production of lactic acid and eventually lowering the pH value of the milk samples.

The milk pH is more dependent on temperature than on inorganic buffer solutions; therefore, the pH of the refrigerated milk will not be equal to that of the same milk at room temperature. This effect is probably due to changes in the solubility of calcium phosphate as reported by Sherbon (1981). The International Dairy Federation (1981) stated the reason for this drop in pH as a result of interaction between lactose and milk protein.

Characterization of non-sterile milk samples

Under random sampling, pH was a variable normally distributed. Deviations from normal distribution may occur probably due to lot, conditions of the raw material and thermal process binomium, which had not been randomized correctly in the distribution of packages as a function of temperature. Table 6 presents the characterization of non-sterile samples, the subculture media on which growth was observed and the isolates codes for the second commercial sterility test.

Table 6. Characterization of non-sterile samples of UHT whole milk

	BRAND A	BRAND C	BRAND D	BRAND E
Number of non-sterile samples	1/600	1/600	1/600	1/600
pH value	6.13	6.04	5.62	5.98
Incubation Temperature	37C	37C	37C	7C
Contamination %	0.167	0.167	0.167	0.167
Gas formation	Flipper	flipper	flipper	flipper
Color	White	White	yellow	white
Smell	UHT typical smell	UHT typical smell	UHT typical smell	UHT typical smell
Phase separation	-	-	+	-
Growth on BHI	+	+	+	-
Isolated Code in BHI	D0412A D0412B D0412C	D0076	D0335A D0335D	-
Growth on DTA	-	-	-	+
Isolated Code in DTA	-	-	-	D0428

Even without typical characterization on MYP, all seven isolates were submitted to confirmatory and differential tests for cereus group (Table 7) as well as identification by FTIR (Table 8) and PCR (Figure 1) only for *Bacillus* strains.

Identification of the isolates from non-sterile milk samples

Table 7 showed the comparison of phenotypic characteristics of each isolate with *B. cereus* profile. Isolate D0412B, a non sporeforming Gram positive rod presented good performance in MRS and Skim-milk Broth and the benzidine test, as negative, confirmed *Lactobacillus* sp.

460 Table 7. Confirmatory and differential tests for isolates from non sterile UHT whole milk samples compared with B.

461 cereus ATCC 11778

Tests		<i>B.cereus</i> ATCC 11778							
Gram	Rods +	Curved rods +	Rods +	D0412B	D0412C	D0076	D0335A	D0335D	D0428
Spores in Na or Sporulating Agar	Central	No spores	No spores	No spores	Sub terminal	Terminal	Central	Central	Central
Catalase	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Benzidine	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Anaerobic growth in phenol red glucose broth	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Reduction of nitrate to nitrite	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Voges-Proskauer (production of acetyl methyl carbinol)	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Decomposition of the tyrosine	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistance to lysozyme	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Motility test	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhizoid growth on NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test for hemolytic activity	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Protein toxin crystal production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONCLUSION	<i>B.cereus</i>	<i>Coryneform</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>

Table 8. FTIR identification for isolates from non sterile UHT whole milk samples

ISOLATE CODE	IDENTIFICATION
D0412A	<i>Coryneform bacteria</i>
D0412B	<i>Lactobacillus</i> sp.
D0412C	<i>Bacillus oleronius</i>
D0076	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
D0335A	<i>Bacillus subtilis</i>
D0335D	<i>Bacillus licheniformis</i>
D0428	<i>Bacillus licheniformis</i>

Our results are distinct from those obtained by De Rezende (1998). This author found 34.17% of samples contaminated by *Bacillus* from cereus group while no isolate of the respective group was verified in our study. It is important to emphasize that only 120 whole milk packages were analyzed in De Rezende study. Packages were opened for analysis, closed with adhesive ribbon and incubated again under refrigeration for 48h in order to be analyzed again. In this way, packages were not hermetic anymore during refrigeration incubation and were exposed to possible cross contamination inside the refrigerator, increasing the reason of defects. This procedure could promote the enrichment of the contamination and the counts had obviously exceeded the original value.

On the other hand, De Rezende study did not describe both the psychrotrophic biochemical characterization of the positive isolates or the confirmatory tests for the cereus group (decomposition of the tyrosine and resistance of lysozyme). Results of the motility test, rhizoid growth and hemolytic activity test were not presented as well. Therefore no clear differentiation could be determined. De Rezende (1998) examined the results in the same sample before and after the refrigeration and the final reason of defects of 34.17% represented the accumulative results of both tests.

The non-sterile sample from brand D presented the lowest pH value when comparing with the other non sterile samples. This sample presented fermentation and proteolysis of the milk denoting the hydrolysis of the casein that causes sudden pH decline as a result of secondary acid metabolisms. Gordon et al (1973) mentioned that *Bacillus licheniformis* causes decomposition of casein and four strains tested presented resistance of lysozyme. In addition, Sneath (1986) affirmed that fifty percent of *Bacillus licheniformis* strains might ferment lactose causing and justifying this kind of spoilage.

The non sterile sample from brand C presented an intermediated pH value (6.04) because *B. sporothermodurans* did not produce acid from sugars (Hammer, 2000).

The seven isolates, showed in Table 8, are contaminants of dairy plants and environment. Gilmour & Rowe (1985) provided a reference dossier containing organisms associated with milk and milk products. They included Coryneform group of bacteria, *Lactobacillaceae* and *Bacillaceae* members founded in this approach. All these contaminants had been reported.

The presence of *Lactobacillus* sp. and *Coryneform* bacteria can be explained by cross contamination with milk products, like yogurt and/or cheese, in the same plant process and/or improper storage conditions in the distribution centers because the samples present mixed flora and both microorganisms did not present thermal resistance in the UHT region. Ridgway (1958) indicated that *B. subtilis* predominates in the sterilized milk contamination. After commercial sterility test in 169 UHT milk samples, Mostert et al (1979) identified 10.3% of *B. licheniformis* strains. Finally, in Brazil, Zacarchenco et al (2000) founded 45% of non sterile packages and identified 24 *B. sporothermodurans* strains in 300 isolates.

In 2001, the identification of 100 selected isolates was obtained by a combination of fatty acid methyl esters analysis, amplified ribosomal DNA restriction analysis and 16S rDNA sequencing. Ninety-seven isolates could be identified to the species level or assigned to a phylogenetic species group. Most isolates obtained after a heat treatment of 10 min at 80 C were identified as members of the *B. subtilis* group (32 isolates), *B. pumilus* (25 isolates), *B. clausii* (eight isolates) and *B. licheniformis* (eight isolates). The isolates with very heat-resistant spores, obtained after a heat treatment of 30 min at 100C, were identified as members of the *B. subtilis* group (five isolates), *B. sporothermodurans* (three isolates), *B. amyloliquefaciens* (one isolate), *B. oleronius* (one isolate) and *B. pallidus* (one isolate). *Bacillus cereus* was present in each feed concentrate sample and was isolated using a selective mannitol egg yolk polymyxin agar medium (Vaerewijck et al, 2001). The survival and germination of spores after a heat treatment of 30min at 100C is of particular importance because these spores may be considered as very heat-resistant compared with the spores obtained after a conventional treatment of 10min at 80C. The 11 isolates produced very heat-resistant spores. The heat resistance of *B. subtilis* spores was shown by Condon et al. (1992), who found $D_{108\text{ C}}$ values between 0.7 and 3.5 min when spores were suspended in buffer. *Bacillus oleronius* is a species isolated for the first time from the hindgut of the termite *Reticulitermes santonensis* (Kuhnigk et al, 1995). This observation indicates the possibility that feed concentrates may harbour species which might be derived from tropical ingredients and which are transferred to raw milk through feeding and faecal contamination of the udder.

Bacillus oleronius is the closest phylogenetic neighbour of *B. sporothermodurans* (De Silva et al, 1998). The latter species is the only species presently known to produce

highly heat-resistant spores, surviving UHT and industrial sterilization processes. So far, it has only been frequently isolated from UHT and sterilized milk and milk products which did not conform to the sterility criteria for these products (Pettersson et al, 1996).

Chopra et al (1980) and Amhed et al (1983) had reported *Bacillus cereus* incidence in pasteurized milk and milk products. Both authors justify the low incidence of the microorganism ($<1/\text{ml}$ de yoghurt and $3.0\text{E}+01$ CFU/ml of milk) due to the severity of the applied thermal treatment. Such explanation is compatible with the results obtained in this research, since the applied thermal treatment in the milk samples was around $140\text{C}/2\text{-}4$ s.

In this context, Gillis et al (1985) evaluated the effect of the raw milk quality on the UHT milk, processed at 149 C for 3 s. They concluded that there were no survivors even with inoculation levels of $1\text{E}+06$ UFC/ml of mesophilic and psychrotropic bacteria. Rangasamy et al (1993) found *B. cereus* in samples of raw and pasteurized milk, in contrast, UHT milk was considered free of this microorganism.

Although literature did not recuperate thermal resistant *Bacillus*, except for *B. sporothermodurans*, after UHT milk process Mazas et al (1995) quoted that the heat resistance of bacterial spores is genetically determined but is also influenced by environmental conditions during sporulation; so milk processing may be considered as a variable in spore contamination.

In 2002, PCR method was used as a screening method for strains with very heat resistant endospores, isolated at the dairy farm level after heat treatment for 30 min at 100C . Seventeen strains isolated at the dairy farm were identified as *B. sporothermodurans* (Scheldeman et al, 2002).

Figure 1 shows the standardization of primer and the reaction (in duplicate) of two typical strains of *B. cereus* (ATCC 11778 and ATCC 14579) and one typical strain of *B. thuringiensis* (ATCC 10972). A fragment of approximately 350bp was amplified by PCR in both *B. cereus* strains as expected and no fragment was detected in the *B. thuringiensis* strain showing the specificity of the primer used. Another PCR reaction with the five strains isolated in this work was also carried out and no fragment was obtained, confirming earlier analysis that these isolates are not *B. cereus*. Figure 2 presents the PCR reactions for the *Bacillus* isolates against *B. cereus* ATCC 11778.

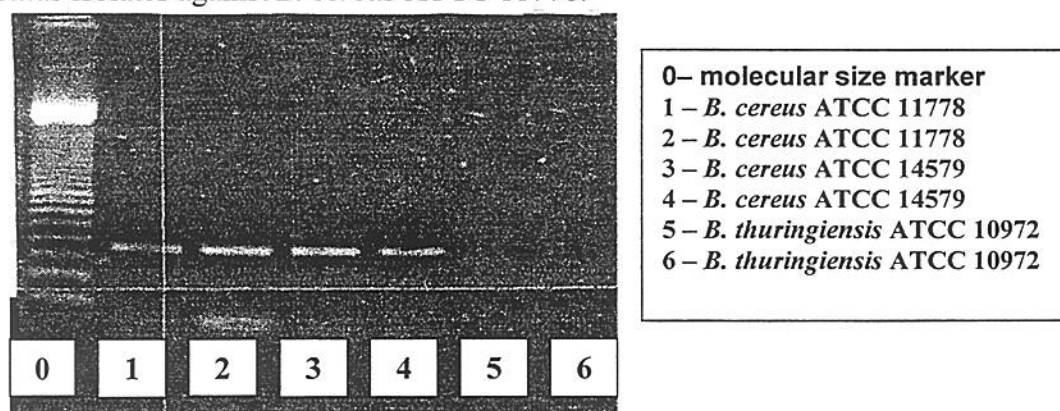


Figure 1. Validation of *B. cereus* primer

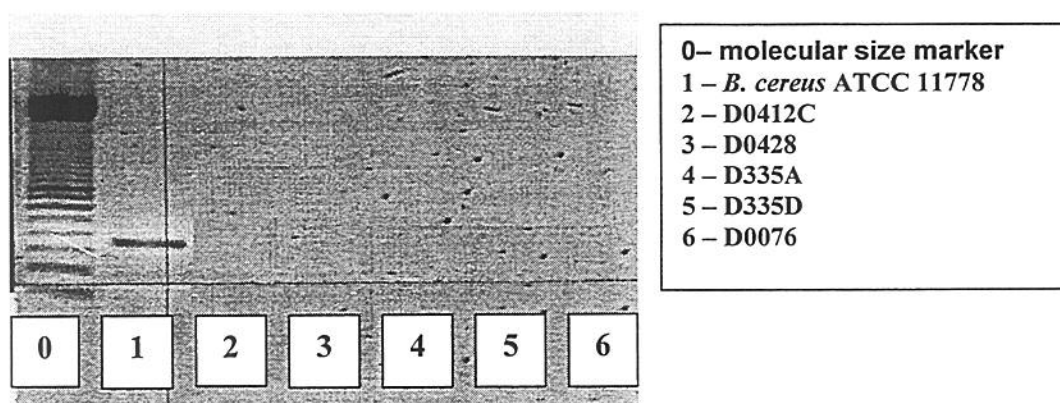


Figure 2. Identification of typical cultures by PCR against *B. cereus*

None of the five *Bacilli* isolates had the electrophoretic profile of *Bacillus cereus*.

CONCLUSIONS

⇒ pH measurement showed a good performance as an index to search non-sterile samples since its profile followed the normal distribution. This fact generates a practical procedure that may be adapted to quality control laboratories located inside dairy industries.

⇒ Brand B showed the best performance because all samples were sterile after incubation at 37 C and 7 C; however the pH distribution of brand C showed the most homogeneous milk samples.

⇒ The different pH values for the samples of each dairy company demonstrate the raw material variability, severity of the thermal process and packages handling conditions.

⇒ No positive samples contaminated by *B. cereus* from all packs of UHT milk analyzed were verified. Suspected samples from brands A, C, D and E did not presented *B. cereus* contamination in a lot of 600 analyzed samples (0% of defects for temperature of incubation and brand, for *B. cereus*).

⇒ Only after abusive storage temperature deteriorative sporeforming bacteria were found. Thus, within the experimental sampling space analyzed, Brazilian UHT milk does not present this pathogenic microorganism and, therefore, is in accordance with the current law.

585 ⇒ The aerobic contaminants found in this research are common in commercial dairy
586 plants and its thermal resistance, in the literature, is low considering the thermal
587 process applied for milk. Its incidence could be attributed to bad conditions in
588 handling and storage procedures. Only *B. sporothermodurans* presents kinetic
589 parameters that justify its survival in processed Brazilian UHT milk.

590 ⇒ The modifications in the PCR methodology for genetic identification of *B. cereus*
591 were successfully implemented in the standardization of this procedure. The
592 phenotypic series for *B. cereus* must be complemented by the identification with
593 PCR and/or FITR.

594

595

596

ACKNOWLEDGEMENTS

597 The authors acknowledge the financial support from CNPq (the Brazilian Research
598 council) and Dr. Yoko Rosato for the orientation in PCR procedures.

599

600

REFERENCES

601 1. AHMED, A. A-H. ; MOUSTAFA, M.F.; MARTH, E.H. Incidence of *Bacillus cereus* in
602 Milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, v.46, n.2, p.126-128. 1983.

603 2. AKHTAR, S.; ZAHOOR, T.; HASHMI, A.M. Physico-chemical changes in UHT
604 treated and whole milk powder during storage at ambient temperature. **Journal of**
605 **Research (Science)**, v.14, n. 1, p. 97-101. 2003.

606 3. ABVL – Associação Brasileira de Leite Longa vida.
607 <<http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida>>. 2003.

608 4. AHVENAINEN, R. Quality assurance and quality control of aseptic packaging. **Food**
609 **Reviews International**, v.4, n.1, p.45-76. 1988.

610 5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.gov.br. 2001

611 6. BEATTIE, S.H.; HOLT, C.; HIRST, D.; WILLIAMS, A.G. Discrimination among
612 *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus
613 *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. **FEMS Microbiology Letters**,
614 v.164, p.201-206. 1998.

615 7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Portaria nº de 4 de
616 Setembro de 1997. www.agridata.mg.gov.br. 1997.

- 617 8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução normativa nº
618 51 de 18 de Setembro de 2002. www.agridata.mg.gov.br. 2002.
- 619 9. CERF, O. Statistical control of UHT milk. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of**
620 **Food**. Lancaster, Pennsylvania. 1988. Chap 6, p.245-257. 1988.
- 621 10. CHOPRA, P.; SINGH, A. and KALRA M.S. "Occurrence of *Bacillus cereus* in Milk
622 and Milk Products" **Indian Journal Dairy Science**, v.33, n.2., p.248-252.1980.
- 623 11. CHUT, W.P.; QUE, T.L.; LEE, W.K.; WONG, S.N. Meningoencephalitis caused by
624 *Bacillus cereus* in a neonate. **Hong Kong Medical Journal**, v.7, p.89-92. 2001.
- 625 12. CONDON, S.; BAYARTE, M.; SALA, F.J. Influence of the sporulation temperature
626 upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p.
627 251-256. 1992.
- 628 13. DE REZENDE, N.C.M. **Ocorrência de bactérias do grupo *B. cereus* e de**
629 **microrganismos indicadores em leite UHT integral**. Tese (Mestre em Medicina
630 Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual
631 Paulista - Jaboticabal. 1998.
- 632 14. De SILVA, S.; PETTERSSON, B.; AQUINO DE MURO, M.; PRIEST, F.G. A DNA
633 probe for the detection and identification of *Bacillus sporothermodurans* using the
634 16S–23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of
635 *Bacillus* which form highly heat resistant spores. **Systematic and Applied**
636 **Microbiology**, v. 21, p. 398 407. 1998.

- 637 15. DONG, A.; MESSERSCHMIDT, R.G.; REFFNER, J.A.; CAUGHEY, W.S. Infrared
638 spectroscopy of a single cell – the human erythrocyte. **Biochemical and Biophysical**
639 **Research Communications**, v.156, p.752-756. 1988.
- 640 16. DROBNIEWSKI, F. *Bacillus cereus* and related species. **Journal of Clinical**
641 **Microbiology**, v.6, p.324-338. 1993.
- 642 17. FDA. FOOD DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th
643 edition. Revision A. Chapter 14. 1998.
- 644 18. FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry**. v.1. 1992.
- 645 19. FRANKLIN, J.G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing. **Journal**
646 **of Applied Bacteriology**, v.33, p.180-191. 1970.
- 647 20. GILLIS, W.T.; CARTLEDGE, M.F.; RODRIGUEZ, I.R.; SUAREZ, E.J. Effect of raw
648 milk quality on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**,
649 Champaign, v.68, n.11, p.2875-2879. 1985.
- 650 21. GILMOUR, A.; ROWE, M.T. Microorganisms associated with milk. In: ROBINSON,
651 R.K. **Dairy Microbiology**. London and New York. v. 1, cap 2, p.35-76. 1985.
- 652 22. GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; HOR-NAY PANG, C. **The genus *Bacillus***.
653 Washington, D.C. 1973.
- 654 23. GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76,
655 p.61-66. 1994.

- 656 24. HAMMER, P. Raw Materials: Quality and Pricing. In: IDF – Bulletin of the
657 International Dairy Federation. *Bacillus sporothermodurans* – A *Bacillus* forming
658 highly heat-resistant spores. Chap. 2, p.5-8. 357/2000.
- 659 25. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. New monograph on UHT milk.
660 133/1981.
- 661 26. KOCAK, H.R.; ZADOW, J.G. Age gelatin of UHT whole milk as influenced by storage
662 temperature. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 40, n. 1, p. 14-21. 1985.
- 663 27. KRAMER, J.M.; GILBERT, R.T. *Bacillus cereus* and other bacillus species. In: Doyle,
664 M.P. (editor), *Food borne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker, N. Y., p.21-70. 1989.
- 665 28. KUHNIGK, T.; BORST, E.M.; BREUNIG, A.; KÖNIG, H.; COLLINS, M.D.;
666 HUTSON, R.A.; KÄMPFER, P. *Bacillus oleronius* sp. nov, a member of the hindgut
667 flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). *Canadian Journal of*
668 *Microbiology*, v. 41, p. 699–706. 1995.
- 669 29. MAZAS, M.; GONZÁLES, I.; LÓPES, M.; GONZÁLES, J.; SARMIENTO, R.M.
670 Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores.
671 *International Journal of Food Science and Technology*, v. 30, n. 1, p. 71-78. 1995.
- 672 30. MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M.W. Psychotropic
673 *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. *Journal of Food Protection*, v.54, n.12,
674 p.969-979. 1991.

- 675 31. MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E.; Enumeration of *Bacillus*
676 *cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n 3, p.650-653. 1967.
- 677 32. MOSTERT, J.F.; LÜCK, H.; HUSMANN, R.A.; Isolation, identification and practical
678 properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South African Journal of**
679 **Dairy Technology**, v.11, n.3, p.125-132. 1979.
- 680 33. NAUMANN, D.; HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; GIESBRECHT, P. The
681 characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).
682 In: **Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis** (NELSON, W.I.; Ed), p.
683 43-96.1991.
- 684 34. NOTERMANS, S.; DUFRENE, J.; BEUMER, R.; GIFFEL, M.; ZWIETERING, M. A
685 risk assessment study of *B. cereus* in pasteurized milk. **XXV International Congress**
686 **of Dairy Products**. 1998
- 687 35. PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA V.P. **Caracterização e implementação de**
688 **uma política para o leite**. Fundação Cargill, 116p. 1985.
- 689 36. PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E.; PRIEST,
690 F.G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant
691 endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v 46, p.759-764.
692 1996.
- 693 37. QUALITY MANAGEMENT. Quality in Chemistry Scheme.
694 www.qualitymanagement.co.uk. 2003.

- 695 38. RANGASAMY, P.N.; IYER, M. and ROGINSKI H. "Isolation and characterization of
696 *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria" **The Australian**
697 **Journal of Dairy Technology**, v.48.1993.
- 698 39. REDDY, K.K.; NGYYEN, M.H.; KAILASAPATHY, K. ZADOW, J.G. The effect of
699 some treatments and storage temperature on UHT whole milk. **Australian Journal of**
700 **Dairy Technology**, v.46, n. 2, p. 57-63. 1985.
- 701 40. RIDGWAY, J.D. the incidence and thermal resistance of mesophilic spores found in
702 milk and related environments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.12, p.118-121.
703 1958.
- 704 41. RHODEHAMEL, J.; STANLEY, M.H. *Bacillus cereus*. In: FDA - Food and Drug
705 Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 1998, chapter 14, p. 14.01-14.08.
- 706 42. SARDA, J.M.; PARDO, J.S.S. **Higiene Veterinária**. 1952.
- 707 43. SCHELDEMAN, P; HERMAN, L.; GORIS, J.; De VOS, P.; HEYNDRICKX M.
708 Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy
709 sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n.5, p. 983-991. 2002.
- 710 44. SHERBON, J.W. **Physical properties of milk - Fundamentals of Dairy chemistry**.
711 3rd edition, New York. 1981.
- 712 45. SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, N.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of**
713 **Systematic Bacteriology**. 1986.

- 714 46. SVENSSON, B.; CHRISTIANSSON, A.; ENEROTH, A.; BRENDEHAUGT, S.
715 Propagation of *B. cereus* in the dairy processing line. **XXV International Congress of**
716 **Dairy Products**. 1998.
- 717 47. VAEREWIJK, M.J.M.; DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHELDEMAN, P.; HOSTE, B.;
718 HEYNDRIK, M. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-
719 forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Bacteriology**,
720 v. 91, n. 6, p. 1074-1084. 2001.
- 721 48. van-NETTEN, P. ; KRAMER, J.M. "Media for the detection and enumeration of
722 *Bacillus cereus* in foods: a review" **International Journal of Food Microbiology**.
723 v.17, n.2, p.85-99. 1992.
- 724 49. von BOCKELMANN, B. **Aseptic packaging processing**. Tetra Pak International.
725 1982.
- 726 50. von BOCKELMANN, B. Quality control of aseptically packaged food products. In:
727 REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. 1988.
- 728 51. WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V.
729 DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
730 **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535.1990.
- 731 52. YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. Cloning and
732 nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*

- 733 and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. **Applied and**
734 **Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1483-1490. 1999.
- 735 53. ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F.; DESTRO, M.T.; ANDRIGUETO, C.
736 Ocorrência de *B. sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do
737 tratamento térmico. **Ciência E Tecnologia Alimentar**, v.20, n.3, p.363-368. 2000.

CAPÍTULO 3

***Bacillus cereus* KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS**

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Journal of Food Process Engineering”

***Bacillus cereus* KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS MILK PROCESS**

CRISTIANA DE PAULA PACHECO-SANCHEZ and PILAR RODRIGUEZ DE
MASSAGUER

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos
CP 6121, CEP 13083-862
Campinas, SP - Brazil

¹Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering,
Department of Food Science, CP 6121, CEP 13083-862. Campinas, São Paulo, Brasil.

Phone/Fax: 55-19-32894966. E-mail: pacheco@fea.unicamp.br.

ABSTRACT

Thermal resistance of *Bacillus cereus* 0486 were determined in continuous system, by Equivalent Point Method (EPM) and Paired Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) in whole Brazilian milk (pH 6.7) using ALIKINETIC.EXE program and compared to results obtained using TDT method. Temperatures applied in all cases ranged from 115C-123C. Data for kinetics parameters in static system were obtained in a thermostatically controlled oil bath. In continuous system, data were determined in an UHT-HTST Lab 25-DH *Microthermics* pilot unit, using 4 sample ports located between the final heater outlet and the hold tube outlet. In continuous system, both methods showed good agreement but EPM method presented better correlation coefficient (0.73) when compared to PEIE (0.66) method and kinetic parameters for *B. cereus* 0486, at 121C, were $E_a = 151,107.677 \text{ J/mol}$; $k = 0.1657069 \text{ s}^{-1}$ and $D_{121C} = 13.90 \text{ s}$. EPM value for D at 121C was 45.69% lower than D value found using TDT tubes experiments, evidencing a higher lethal effect of continuous process on this organism destruction in whole milk.

RESUMO

40 A resistência térmica de *Bacillus cereus* 0486 foi determinada, em sistema contínuo,
41 pelo método do Ponto Equivalente-EPM e pelo método das Exposições Isotérmicas
42 Equivalentes-PEIE em leite integral UHT Brasileiro (pH 6.7) utilizando o programa
43 ALIKINETIC.EXE e comparando os resultados com o dados obtidos pelo método TDT. As
44 temperaturas aplicadas, em todos os casos, estiveram entre 115C-123C. Os dados de
45 parâmetros cinéticos em sistema estático foram obtidos a partir de um banho de óleo
46 termostático controlado. Em sistema contínuo os parâmetros foram determinados em planta
47 piloto *Microthermics* UHT-HTST Lab 25-DH, utilizando 4 portas assépticas de
48 amostragem localizadas entre a saída do aquecedor final e a saída do tubo de retenção. No
49 sistema contínuo ambos os métodos apresentaram boa concordância, mas o método EPM
50 obteve melhor coeficiente de correlação (0.73) que o PEIE (0.66). Os parâmetros cinéticos
51 para *B. cereus* 0486, obtidos em sistema contínuo, foram $E_a = 151,107.677 \text{ J/mol}$; $k =$
52 0.1657069 s^{-1} and $D_{121C} = 13.90 \text{ s}$. O valor D, a 121C, obtido pelo método EPM foi 45.69%
53 menor do que aquele encontrado pelo método TDT, evidenciando o efeito letal do
54 processamento contínuo na destruição deste microrganismo em leite integral.

INTRODUCTION

The investigation of *Bacillus cereus* contamination in UHT processed whole Brazilian milk and has led to a need of detecting when the spoilage could occur. The three main causes of contamination in processing milk plants are the insufficient sterilization temperature against the biological target, inefficiency during the equipment sterilization and process to overcome a large initial population and/or fail in the aseptic procedure in the plant (Mehta, 1980). The appearance of this pathogen in milk packages has arisen questions related to quality procedures used in Brazilian UHT milk production that increased 64.4% in the last ten years (ABLV, 2003).

B. cereus produces enzymes, similar to those of Gram negative bacteria, which activity results in the development of strange odors and other defects of sensorial quality in milk products (Meer et al, 1991). It also produces two apparently different types of toxins, when concentration of $1\text{E}+06$ UFC/g is verified (FDA, 1998): the emetic type (poisoning) and the diarrheic (toxic infection) (Drobniewski, 1993; Granum, 1994).

In some cases, sub lethal heat treatments can induce dormancy instead of activating dormant spores (Gould, 1970). Gonzales et al (1995) tested different media to recovery injured *B. cereus* spores submitted to thermoresistometer (Condón *et al*, 1989) and reported that higher counts of heat-injured spores were obtained on Plate Count Agar (PCA) and Nutrient Agar (NA). Wescott *et al* (1995) suggested that plates must be held up for four days in order to verify that injured spores were recovered within 24 h.

Prior sub lethal heating is also reported to induce increase thermoresistance in spores (Alderton et al, 1964; Alok, 1984). Etoa & Adegoke (1995) studied the change in thermoresistance of *Bacillus* spores after sub lethal heat treatments and indicated that slowly preheated spores might have time for gaining more increased resistance to heat in the destructive heating process.

Busta (1967) studied the thermal inactivation characteristics of *B. stearothermophilus* spores and putrefactive anaerobe (PA 3679) spores, both suspended in skim milk after thermal treatment (110-137.8C) in UHT pilot plant. The decimal reduction time curves were linear in all cases, but the z values observed (8.89C to 11.1C) differed considerably from those reported in batch system.

Burton *et al* (1977) compared thermal death rates of *B. stearothermophilus* spores suspended in water and milk using a laboratory batch infusion UHT sterilizer system (with a continuous steam injection UHT sterilizer) and a capillary tube system. A greater divergence occurred in thermal death rates determined by both systems at lower temperatures.

The authors concluded that the difference found in temperature coefficients was due to failure to characterize the UHT systems with respect to time and temperature or to some fundamental difference between spore destruction by capillary tube and pilot plant systems. They also suggested that any estimates of sterilizing effects at UHT temperatures should be treated without extrapolation at low temperatures.

Some researches conducted in continuous flow systems (Stroup *et al*, 1969; Farber *et al*, 1988; Lovett *et al*, 1990) determined decimal reduction from initial and final colony counts and represented the total thermal destruction resulting from non-isothermal and isothermal functions of the process. They stated that thermal inactivation rates determined under constant temperature are more useful and appropriate because to correct non-isothermal portions of the system the dilution effect of the steam condensate must be considered to determine thermal inactivation rates.

More recently, Fairchild *et al* (1994) determined the thermal inactivation of *Listeria innocua* in raw skin milk under continuous flow conditions and by capillary tube method.

A laboratory scale pasteurizer (LSP) was used to generate kinetic data monitoring inactivation by sampling at various locations along the hold tubes. The data suggested that the thermal destruction mechanism may be different between both processes.

Wescott *et al* (1995) evaluated the thermal inactivation kinetics of *B. cereus* T in capillary tubes and in continuous flow system using phosphate buffer between 99 and 107°C. Large differences in D-values were found among three strains (0.28-4.57min) but z values were not significantly different in any of the cases ($7.64^{\circ}\text{C} \pm 0.25$). The continuous flow system was more lethal than the batch system, because the D value at 99°C obtained with EPM method was 86.66% lower than in batch system. This fact suggests that the use of batch has generated data to predict or to design continuous flow process may not be accurate. Thermal inactivation kinetic parameters determined by traditional immersion procedures that simulate the batch process conditions do not account for the physical stress such as pressure and shear forces exerted on microorganism during continuous flow processes (Swartzel, 1984).

Huemer et al (1998) studied the thermal death kinetics of *B. sporothermodurans*, isolated from UHT milk and affirmed that measurements at temperature higher than 125C can not be carried out with the tube method, but should be performed with a UHT sterilizer because, experimentally, the authors observed that at temperatures above 125C the measurements obtained with the tube method presented a deviation compared to the calculated values based on the model. They affirmed that this might be caused by the heating-up time, but real-time monitoring of the temperature did not support this hypothesis.

Approaches commonly used to determine thermal kinetic parameters may be either isothermal or non-isothermal (Lenz and Lund, 1980).

The isothermal approach is used more frequently due to the conceptual simplicity; however, the approach has been criticized for unavoidable thermal lags, inconveniently small sample sizes and a limited temperature range from which to select sufficiently different isothermal conditions (Welt et al, 1993).

The isothermal approach may be preferable when the objective is the reaction determination (Constantinou, 1994). The non-isothermal approaches are attractive because they are specifically designed to accommodate thermal transients. This eliminated much of the experimental tedium associated with the isothermal approach and allows the determination of the kinetic parameters from realistic processing conditions (Welt et al, 1997).

In Brazil, the ALIKINETIC program was developed to calculate de kinetic parameters such as reaction rate constant (k_T), pre-exponential factor (k_0) and activation energy (E_a) of food components thermal inactivation submitted to non-isothermal continuous systems that may be adjusted to Arrhenius equation. The model used for program development assumes first order reactions (Tamega Jr, 2005) by Equivalent Point Method – EPM (Nunes and Swartzel, 1990) and Paired Equivalent Isothermal Exposures – PEIE (Welt, 1997).

Kinetic parameters calculated by ALIKINETIC program are based in Arrhenius model (E_a , k_0 or k_{ref}), but these data can be converted in D and z values from Bigelow model. Equation 1 presents the relation that converts k value into D value. The z value may be obtained through the equation 2, proposed by Ramaswamy et al (1989).

$$D_T = \frac{\ln(10)}{k_T} \quad (1)$$

$$z = \frac{\ln(10) \times R \times T_{\min} \times T_{\max}}{E_a} \quad (2)$$

As proposed by Swartzel (1984), the EPM represented an easy-to-use non-isothermal method for kinetic parameter estimation. The method is based on the presumption that an equivalent isothermal process may be obtained for any continuous thermal process. This concept is not new, as process designed to provide a specified sterilizing value (number of log cycles in which the concentration of the target organism is reduced) are based on achieving a specific F_0 value (Teixeira, 1992).

159 A second method, referred to as Paired Equivalent Isothermal Exposures (PEIE),
160 was developed for estimating kinetic parameters from continuous thermal process using the
161 true nature of an equivalent isothermal exposure (EIE). A PEIE method allows the
162 estimation of thermal kinetic parameters of a reactant that has been subjected to, at least,
163 two continuous thermal exposures (Welt *et al*, 1997).

164 In 2005, inactivation kinetic parameters, E_a and k , of *Alicyclobacillus*
165 *acidoterrestris* DSM2498 spores in 11Brix orange juice, in a continuous pilot plant
166 *Microthermics*®, were estimated by EPM and PEIE methods by ALIKINETIC.EXE.
167 Survivals were collected at the pre-heater exits, final heater, and after 4.02, 11.92, 33.44
168 and 35.9 s of holding, at flow rate of 1.0 L/min. z values, obtained by conversion of E_a ,
169 were : $14.67 \pm 1.99^\circ\text{C}$ (E_a from 150.61 to 209.11 kJ/mol) and $15.47 \pm 3.76^\circ\text{C}$ (E_a from
170 133.56 to 233.75 kJ/mol) for EPM and PEIE respectively – representing almost the double
171 of the reported value for this microorganism using TDT tubes; such variation was attributed
172 to higher heating rates, present in a continuous system. PEIE was less inaccurate, although
173 both methods showed in average tendency to overestimate the process (Tamega Jr., 2005).

174 Before that, in 2001, Pacheco also concluded that significant difference was found
175 when kinetics parameters for *Neosartorya fischeri* in tomato pulp were determined in TDT
176 tubes and applied in continuous thermal process.

177 The objective of this study was to determine, for *B. cereus*, the “D” and “ z ” values
178 in isothermal TDT tube method and “ k ” and “ E_a ” values in continuous systems and to
179 compare these values to supply the Brazilian dairy plants with accurate kinetic parameters
180 to design their thermal processes during the production of UHT milk to consumers.

181

MATERIAL AND METHODS

Bacillus cereus spore suspension and heating media

A strain 0486 of *Bacillus cereus* isolated from 2003 whole milk production at Thermobacteriology Laboratory – UNICAMP/Brazil was sporulated according to Pflug (1990). Glass bottles (220mL) containing 70mL of Nutrient Agar (NA – Difco, Interlab, São Paulo, Brazil) plus 5 ppm MnSO₄ were inoculated and incubated for 9 days at 30C, to promote a large spore crop. The Pflug (1990) procedure was also applied to the collection and washing of the spores. The final suspension was stored at 4C in water.

Spore concentration was determined after preparation of the suspension. The bacterial spores were treated for 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 min at 80C (Pflug, 1990) to obtain the best activation. After each heat shock in pasteurized (72-76C/20-30s) whole milk, plus 0.03% sodium citrate, the suspension was pour plated in duplicate in the appropriate subculturing medium, NA (Difco, Interlab, São Paulo, Brazil), and incubated for 2 days at 30C.

Brazilian pasteurized (72-76C/20-30s) milk was obtained from a Brazilian dairy plant. Milk pH was checked using a pH meter model mPA-210 (MS TecnoPON).

Aerobic plate counts, Mesophilic aerobic sporeformers and *B. cereus* spores enumeration was performed on the pasteurized milk according to Morton (2001), Stevenson and Segner (2001) and Rhodehamel and Harmon (1998), respectively.

204 **Kinetic parameters in TDT system**

205 The analytical method of direct survivor enumeration was used for *B. cereus* heat
206 resistance using the sealed TDT method (Stumbo, 1973).

207 Inoculated blend (0.2ml of spore suspension and 1.8ml of pasteurized whole milk
208 plus 0.03% sodium citrate) were distributed in sterile TDT tubes with 10-mm length, 6-mm
209 inner diameter and 0.2-mm glass thickness, which were subsequently sealed in the flame of
210 a blast burner. Four temperatures were tested (115C, 118C, 121C and 123C) with 5
211 programmed time intervals for each temperature. Two TDT-tubes were heated, at each
212 time, after the thermal lag period, in a thermostatically controlled oil bath ($\pm 0.2C$,
213 Polystat® Cole Parmer, Poli Science, Niles, IL). A thermocouple omega, type TT-T-36,
214 was inserted into the center of two TDT tubes in order to monitor temperature with a data
215 logger DORIC 245 (Beckman Industrial, San Diego, CA) at 30 s frequency. After fast
216 cooling, the tubes were aseptically opened and the survivors were enumerated in NA
217 (Difco, Interlab, São Paulo, Brazil) medium.

218 Survivor curves were constructed for each heating time in order to determine **D**
219 (**1/K**) and **z** values with 95% of confidence interval through linear regression. In TDT
220 system, the inoculum for tests at 115C, 118C, 121C and 123C were $4.9E+07$ - $6.10E+07$
221 spores/mL of milk.

222

223 **Kinetic parameters in continuous flow system**

224 Inactivation kinetics for *B. cereus* in a continuous flow environmental were
225 generated on MicroThermics UHT-HTST Lab-25-DH laboratory scale aseptic unit

(MicroThermics, Raleigh, NC), especially designed for heat resistance and validation studies with four aseptic sample ports (figure 1).

FIGURE 1

The system was configured so that inoculated blend could be pumped from a 50 L reservoir at 2 L/min through heating, holding and cooling sections.

To assure the distribution of bacteria throughout the hold tube and to facilitate the comparison of inactivation kinetics between continuous flow and batch methods, a turbulent flow was applied ($Re \geq 6,600$).

Heating was accomplished in a spiral tube heat exchanger (11.58 m) with the heating medium flowing counter-current in relation to the product flow. The hold tube length was the same in all processes at 115C, 118C and 121C. Higher temperatures were not applied since no survivors were found and the short time was difficult to measure.

Pasteurized milk was directly inoculated with *B. cereus* spore suspension, in MicroThermics 11049 laminar flow cabinet (Microthermics Raleigh, NC).

The inoculum level at 115C, 118C and 121C was $1.1E+05$ to $9E+06$ spores/mL of milk. Sample ports were located at the final heater outlet in order to measure the effect of heaters on the number of decimal reductions and at three equidistant points along the hold tube as shown in figure 1. Hold tube lengths and mean residence times to the sample ports for each temperature evaluated were based on the conditions presented in table 1. Residence times were calculated using the mean velocity because in turbulent flow the maximum velocity tends to be equal to the mean velocity. Samples were immediately cooled as soon as they exited the hold tube by an additional tubular cooler. Cooling water flowed counter-current in relation to the product line.

TABLE 1

After equipment sterilization, the product temperature and the flow rate were firstly stabilized using uninoculated pasteurized whole milk plus 0.03% sodium citrate and then the inoculated milk was introduced.

While the product was continuously pumped from the intake reservoir trough system, the temperature was monitored with omega T thermocouple, every 8 s, at six points (pre heater outlet, final heater outlet, sample port 1, sample port 2, sample port 3 and hold tube outlet) via a Fluke Hydra data logger, model 2625A.

The product line pressure was maintained at 5 kg/cm², with a spring-loaded pinch-style back pressure valve after all heaters and cooler, to control product back pressure and to prevent flashing (boiling) of the product during processing.

Three test runs, in duplicate, were conducted on separate days at each temperature. Samples were taken one at time from each sample port and the computer time was registered so that the temperature could be precisely abstracted from the time temperature data file. Samples were sequentially taken from hold tube outlet to port 1.

After processing, samples were aseptically recovered in order to count the survivors (N_f) by pour plate in duplicate in the appropriate subculturing medium, NA, and incubated for 4 days at 30C. *B. cereus* colonies were confirmed by streaking into selective MYP-Mannitol egg Yolk agar (Difco, Interlab, São Paulo, Brazil) medium plus polymyxin 0.1%.

Survivors, temperature and residence time data were given as input to ALIKINETIC to generate, by EPM and PEIE methods, the kinetic parameters (E_a , k and D values) and correlation coefficient (R^2).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacillus cereus spore suspension

Bacillus cereus spore suspension count was 5.0E+09 spores/mL of sterilized milk. The best cell recuperation, after each heat activation time at 80C, in pasteurized whole milk was presented in Figure 2.

FIGURE 2

From figure 2 it is possible to observe that *B. cereus* heat activation time showed three peaks, at 80C, indicating the presence of sub-population with different level of dormancy.

Johnson et al (1982) isolated three *B. cereus* strains showing sub-populations. Gonzales et al (1995) studied the effect of recovery media and incubation temperature on the apparent heat resistance of three strains of *B. cereus* spores. They reported that *B. cereus* 7004 showed sub-population (tailing) with greater heat resistance than the majority of the population.

The tailing phenomenon has been previously observed by several researches (Johnson et al, 1982; Rajkowski and Mikolajcik, 1987). In this study the best activation was 80C for 10 min.

Characterization of the heating media

The pasteurized milk showed pH of 6.92. The aerobic colony count was 6E+05 CFU/mL of pasteurized milk; the mesophilic aerobic sporeforming count was 5E+02

spores/mL of pasteurized milk and the enumeration for *B. cereus* was 3E+02 spores/mL of pasteurized milk. This contamination was considered in the calculation of the *B. cereus* inoculation level.

Time-temperature profiles and inactivation kinetics of *B. cereus*

Figure 3 shows the time-temperature profiles for TDT tube system and continuous flow system with mean temperature for each heating and retention sections for the determination of thermal resistance.

FIGURE 3

Simple calculation of the activation rate during pre heating (figure 3) shows that TDT tubes presented 0.85C/min while for continuous system activation rate was 5.45C/min. Therefore, the increase on the activation rate during the continuous process was 6.43 times higher than in TDT system, increasing the number of germinated spores causing a subsequent decrease in resistance (D values). In relation to the continuous system, the pre heating phase should be more carefully analyzed since its effect on activation seems to be relevant.

Fernandez et al (2001) studied the effect of isothermal and non-isothermal heat activation on germination and thermoresistance of *B. cereus* spores and indicated that the type of heat treatment activation seems to affect the final number of recuperated spores because the germination after isothermal activation was lower than after non-isothermal activation.

For Fernandez et al (2001), the non-isothermal inactivation at rate of 2C/min resulted in larger D values ($D_{90C} = 4.7\text{min}$) and z value of 8.3C in relation to the isothermal activation ($D_{90C} = 4.04\text{min}$). They observed that at the highest heating rate, the percentage of germinated spores increased in the case of treatments up to 85C.

The activation rate, for non-isothermal conditions also affected the z values which increased with faster heating rates (Fernandez et al, 2001). Analyzing Fernandez et al (2001) data seems to be a linear relationship between activation rate and z value, under non-isothermal conditions.

Most of food thermal processes have been established using parameters obtained from thermal activation and subsequent isothermal inactivation treatments. However, this is not the situation in commercial industries. The food temperature increases at a rate that depends on the type of food, so the spores are subjected to a non-isothermal activation conditions before the inactivation treatment.

In 1999, Fernández affirmed that non-isothermal treatment is a good choice for kinetic estimation, since the methodology offers advantages over the traditional one in terms of time reduction and labour and an increase in the number of data that can be obtained from a single experiment, being closer to what happens in a real thermal process. Periago et al (1998) also produced good results when estimate the kinetic parameters of *B. cereus* under non-isothermal conditions.

Etoa & Adegoke (1995) showed an apparent increase in thermal resistance for *B. cereus* as a function of the pre heating treatment speed. The spores heated at the lowest rate displayed higher resistance than those pre heated at rapid rate indicating that slowly preheated spores might have time for gaining more increased resistance to heat in the

destructive heating process. Tsuchido et al (1982) had reported a similar observation while studying *B. subtilis* spores. In this research, similar results were found.

B. cereus 0486 did not show extraordinary high thermal resistance, for isothermal and non-isothermal treatments, if compared with the strain reported by Franklin (1970) which survived 2s after UHT processing of cream at 140C.

Mike (1988) also found that the long exposition of the spores, at a sub-lethal treatment, may help to straighten their dormancy and/or their resistance instead of activating them as conventionally expected.

According to Craven & Blankenship (1987), cited by Etoa & Adegoke (1995), submitting *C. perfringens* spores at 72C for 20min could induce molecular changes of the spore macromolecules or changes in the internal structure of the intact spore. Consequently, one may infer that the heat-induced resistance observed with some *Bacillus* spores strains might be due to their internal structural modifications.

Results presented in Figure 4 and Table 2 confirm these hypothesis since the D values calculated from TDT tubes, for 121C are higher, but no simple relationship between rates and D values was found; so there must be other factors that determine the differences between TDT and continuous kinetic parameters. Possible explanations may be the contribution due to physical forces in the continuous flow system (stress, pressure and shear tension) which is not observed in batch system (Swartzel, 1984).

Fairchild *et al* (1994) compared batch and continuous flow thermal inactivation system using *Listeria innocua* in raw milk and reported different z values between treatments, suggesting that there might be significant differences in mechanisms of thermal destruction in both systems.

Similar conclusions were reported by Pacheco (2001) for *Neosartorya fischeri* in tomato pulp and by Tamega Jr (2005) for *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. Both authors applied thermal process in MicroThermics UHT-HTST Lab-25-DH laboratory scale aseptic unit (MicroThermics, Raleigh, NC).

FIGURE 4

TABLE 2

The comparison between kinetic parameters obtained in static and continuous systems indicated that the continuous system was more lethal than the batch system.

Westcott et al (1994) determined the activation energy of 313,000 J/mol, for *B. cereus* T, heated in phosphate buffer solution for temperature range of 99-107C. This value was 2.07 times higher than 151,107.67 J/mol obtained for *B. cereus* 0486, in continuous system, when analyzed by EPM method for temperature range of 115-121C. This difference may be attributed to denaturation of milk components occurring at this temperature range which are not observed at lower temperatures.

White & Sweetsur (1977) had characterized the kinetics of the heat aggregation of the caseinate micelles in milk. The authors had observed that the heat induced aggregation reaction subsequent to the beginning of visible aggregation in milk at temperatures range from 110 to 140C appeared to be second order, with activation energy of about 128.500 J/mol. This activation energy value for caseinate micelles is similar to the activation energy value obtained, in this research, for *B. cereus*. Perhaps it could be supposed that, since *B. cereus* presents a hydrophobic nature, this microorganism could be protected by casein, requiring approximately the same level of activation energy to be inactivated. More researches are needed in order to elucidate the mechanism of protection.

383 *Holdsworth (1992)* compiled kinetic data for inactivation of *Bacillus* against
384 disinfectants such as hydrogen peroxide and peracetic acid reporting, for *B. cereus* a E_a of
385 76.600 J/mol for its inactivation by hydrogen peroxide at room temperature. It is possible
386 that the temperature coefficient value could be dependent of the physico-chemical reaction
387 on the cell membrane at different temperature range.

388 Generically, we agree with Burton et al (1977), Fairchild *et al* (1994) and Fernandez
389 et al (2001) affirming that batch data to predict or to design continuous flow thermal processes
390 may not generate correct estimation. Proper estimation must use kinetic parameters
391 determined in continuous heating system.

392

393

CONCLUSIONS

394

⇒ Extrapolation of batch kinetic data to estimate UHT processes may not be accurate and may result in over processing affecting the sensorial quality of milk.

396

397

⇒ At 121C, the D value for *B. cereus* calculated through the TDT method was 2.2 times higher than D value obtained by EPM method in continuous system.

399

400

⇒ Kinetics parameters obtained from continuous systems would yield the most accurate results to orient commercial thermal processes in UHT region, especially when turbulent flow is applied in order to minimize possible errors in temperature measurements.

403

404

⇒ The EPM method for analysis of biological system for milk was better than PEIE method to determine continuous process kinetic data.

406

407

⇒ The increased thermal resistance observed after non-isothermal activation indicates that it is necessary to consider the activation rate in pre heating stage as an important factor before carrying out the inactivation treatment

408

409

410

NOMENCLATURE

411	CFU	Colony Forming Units	
412	D_T	Time required reducing the initial microbial count, nutrients or quality factors	
413		by a factor of 90%, in determined temperature	min
414	E_a	Activation energy	J/mol
415	F₀	Integrated sterilization value based on <i>C. Botulinum</i> (T _{ref} =121C and Z=10C)	min
416	k_t	Reaction rate constant	min ⁻¹
417	k₀	Pre-exponential factor	min ⁻¹
418	N_f	Final population	CFU/mL
419	R²	Coefficient of correlation	
420	R	Universal gas constant (8.314)	J/mol.K
421	T_{min}	Minimal Temperature	C
422	T_{max}	Maximum Temperature	C
423	z	Temperature interval to cause a 10 times variation in the D value	C
424			

REFERENCES

1. ABVL – Associação Brasileira de Leite Longa vida. www.ablv.org.br. 2003.
2. ALDERTON, G.; THOMPSON, P. A.; SHELL, A. 1964. Heat adaptation and ion exchange in *Bacillus megaterium* spores. *Science*, *143*, 141-143.
3. ALOCK, S. 1984. Elevation of heat resistance of *Clostridium sporogenes* following heat shock. *Food Microbiology*, *1*, 39-47.
4. BURTON, H.; PERKIN, A.G.; DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M. 1977. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* at ultra high temperatures. III. Relationship between data from capillary tube experiments and from UHT sterilizers. *Journal of Food Technology*, *12*, 149-161.
5. BUSTA, F. F. 1967. Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. *Applied Microbiology*, *15*(3), 640-645.
6. CONDÓN, S.; LÓPEZ, P.; ORIA, R.; SALA, F.J. 1989. Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer. *Journal of Food Science*, *54*, 451-457.
7. CONSTANTINOU, C.P.; 1994. The study of decomposition reactions through the exchange of thermal of thermal energy. *J. Chem. Kinet.*, *26*, 1151-1166.
8. DROBNIEWSKI, F. *Bacillus cereus* and related species. 1993. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*. *6*, 324-338.

- 443 9. ETOA, F.X.; ADEGOKE, G.O. 1995. Changes in thermoresistance of some *Bacillus*
444 spores after sublethal heat pretreatment. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de*
445 *Alimentos*, 35(3), 285-295.
- 446 10. FAIRCHILD, T.M.; SWARTZEL, K.R.; FOEGEDING, P.M. 1994. Inactivation
447 kinetics of *Listeria innocua* in skim milk in a continuous flow processing system.
448 *Journal of Food Science*, 59(5), 960-963.
- 449 11. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; SPEIRS, J.L.; D'AOUST, J.-Y.; EMMONS, D.B.;
450 McKELLER, R. 1988. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and
451 naturally contaminated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 277-
452 286.
- 453 12. FERNANDEZ, A.; OCIO, M.J.; FERNANDEZ, P.S.; RODRIGO, M.; MARTINEZ, A.
454 1999. Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic
455 parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food*
456 *Microbiology*, 16, 607-613.
- 457 13. FERNANDEZ, A.; OCIO, M.J.; FERNANDEZ, P.S.; MARTINEZ, A. 2001. Effect of
458 heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance
459 parameters of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 63,
460 257-264.
- 461 14. GONZALES, I.; LOPEZ, M.; MAZAS, M.; GONZALEZ, J.; BERNARDO, A. 1995.
462 The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus*
463 spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 548-554.
- 464 15. GOULD, G.W. 1970. Germination and the problem of dormancy. *Journal of Applied*
465 *Bacteriology*, 33, 34-39.

- 466 16. GRANUM, P. E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Bacteriology.
467 76, 61-66.
- 468 17. JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. 1982. Germination and heat
469 resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic
470 foodborne illnesses. Journal of Food Science, 47, 1258-1271.
- 471 18. LENZ, M.K.; LUND, D.B. 1980. Experimental procedures for determining destruction
472 kinetics of food components. Food Technology, 34(2), 51-55.
- 473 19. LOVETT, J.; WESLEY, L.V.; VANDERMAATEN, M.J.; BRADSHAW, J.G.;
474 FRANCIS, D.W.; CRAWFORD, R.G.; DONNELLY, C.W.; MESSER, J.W. 1990.
475 High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. Journal
476 of Food Protection, 53, 734-738.
- 477 20. MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M.W. 1991. Psychrotrophic
478 *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. J. of Food Protection, 54(12), 969-979.
- 479 21. MEHTA, R.S. 1980. Milk processed at ultra-high-temperature: a review. Journal of
480 Food Protection, 43(3), 212-225.
- 481 22. MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: WANDERZANT, C.; SPLISTTOESSER,
482 D.F. (Ed). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4
483 ed. Washington: APHA, 2001, 63-67.
- 484 23. NUNES, R.V.; SWARTZEL, K.R. 1990. Modeling thermal Processes Using the
485 Equivalent Point Method. Journal of Food Engineering, 11, 103-117.

- 486 24. PACHECO, C.P. *Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em*
487 *unidade UHT*. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). 2001. 154 p. Faculdade
488 de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas - Campinas. 2001.
- 489 25. PERIAGO, P.M. Modelos predictivos de inactivación de *B. stearothermophilus* y
490 evaluation de nuevas metodologias para la obtención de datos cinéticos. 1998. Ph.D.
491 thesis. Universidad de Murcia, Spain. 1998.
- 492 26. PFLUG, I.J. 1990. *Microbiology and engineering of sterilization processes*. 7th ed.
493 Environmental Sterilization Laboratory. Minneapolis.
- 494 27. RAJKOWSKI, K.T.; MIKOLAJCIK, E.M. 1987. Characteristics of selected strains of
495 *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection, 50, 199-205.
- 496 28. RAMASWAMY, H.S.; van de VOORT, .F.R; GHAZALA, S. 1989. An analysis of
497 TDT and Arrhenius methods for handling process and kinetic data. Journal of Food
498 Science, 54(5), 1322-1326.
- 499 29. RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: U.S. Food Drug
500 Administration (Ed). *Bacteriological Analytical Manual*. 8 ed. Gaithersburg: AOAC,
501 1998. 14.01-14.08p.
- 502 30. STEVENSON, K.E.; SEGNER, W.P. Mesophilic Aerobic Sporoformers. In:
503 WANDERZANT, C.; SPLISTTOESSER, D.F. (Ed). *Compendium of Methods for the*
504 *Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. Washington: APHA, 2001, 223-227.
- 505 31. STROUP, W.H.; DICKERSON, R.W. Jr.; READ, R.B. Jr. 1969. Two-phase slug flow
506 heat exchanger for microbial thermal inactivation. Applied Microbiology, 18, 889-892.
- 507 32. STUMBO, C.R. 1973. *T. in Food Processing*. 2nd ed., N. Y. Academic Press.

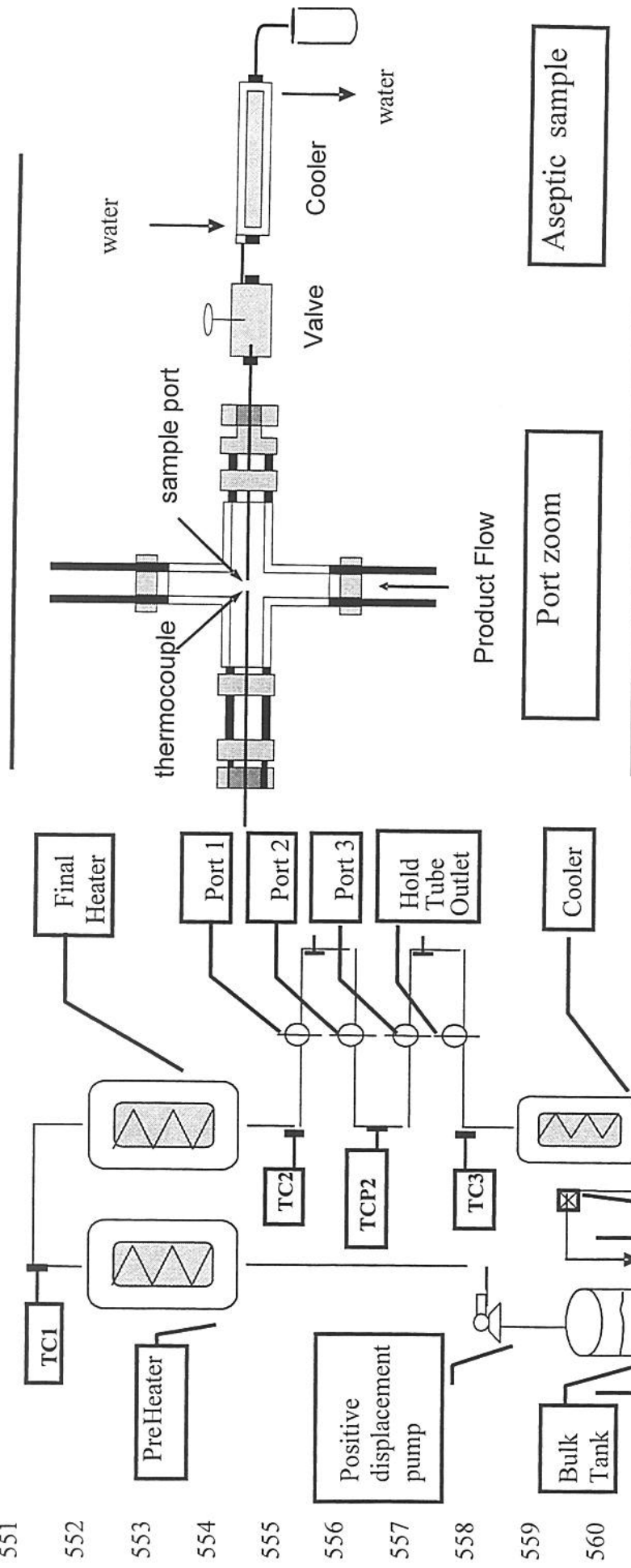
- 508 33. SWARTZEL, K.R. 1984. A continuous flow procedure for reaction kinetic data
509 generation. *Journal of food Science*, 49, 803-806.
- 510 34. TAMEGA Jr. *Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de*
511 *processamento térmicos contínuos de alimentos*. 2205. 196p. Dissertação (Mestre em
512 Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade
513 Estadual de Campinas - Campinas. 2005.
- 514 35. TEIXEIRA, A.A. 1992. Thermal process calculations. In: *Handbook of Food*
515 *Engineering* (D.R. Heldman and D.B. Lund, eds). Ch. 11, Marcel-Dekker Inc., New
516 York.
- 517 36. TSUCHIDO, T.; HAYASHI, M.; SHIBASAKI, I. 1982. Alteration of thermal
518 resistance of microorganisms in an isothermal heating process. *J. Antibact. Antifung.*
519 *Agents*, 10, 105-109.
- 520 37. WELL, B.A.; TEIXEIRA, A.A.; BALABAN, M.O.; SMERAGE, G.H.; SAGE, D.A.
521 1997. Iterative method for kinetic parameter estimation from continuous thermal
522 treatments. *Journal of Food Science*, 62(1), 8-14.
- 523 38. WELT, B.A.; STEET, J.A.; TONG, C.H.; ROSSEN, J.L.; LUND, D.B. 1993.
524 Utilization of microwaves in the study of reaction kinetics in liquid and semi-solid
525 media. *Biotechnology Progress*, 9, 481-487.
- 526 39. WELT, B.A.; TEIXEIRA, A.A.; BALABAN, M.O.; SMERAGE, G.H. SAGE, D.S.
527 1997. Iterative Method for Kinetic Parameter Estimation from Continuous thermal
528 Treatments. *Journal of Food Science*, 62(1), 8-14.

529 40. WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. 1995. *Bacillus cereus* and
530 *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems.
531 Journal of Food Science, 60(3), 446-450.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq and *MicroThermics*® .

MicroThermics Lab 25-DH with sample ports



562

Figure 1.

563

SCHEMATIC OF LABORATORY SCALE STERILIZER WITH ASEPTIC SAMPLE

564

PORTS

565

566

567

568

569

570

571

572
573
574
575

576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587

TABLE 1
MEAN RESIDENCE TIME (RT) AND HOLD TUBE* (HT) LENGTH TO EACH
SAMPLE PORT FOR ALL RUN TESTS.

Sample Port	HT(m)	RT (sec)
1	10.87	30.54
2	16.32	45.85
3	21.74	61.08
4	22.31	62.68

* Hold tube inside diameter = 1.092 cm; flow rate = 2.0 L/min; mean velocity = 0.36 m/s

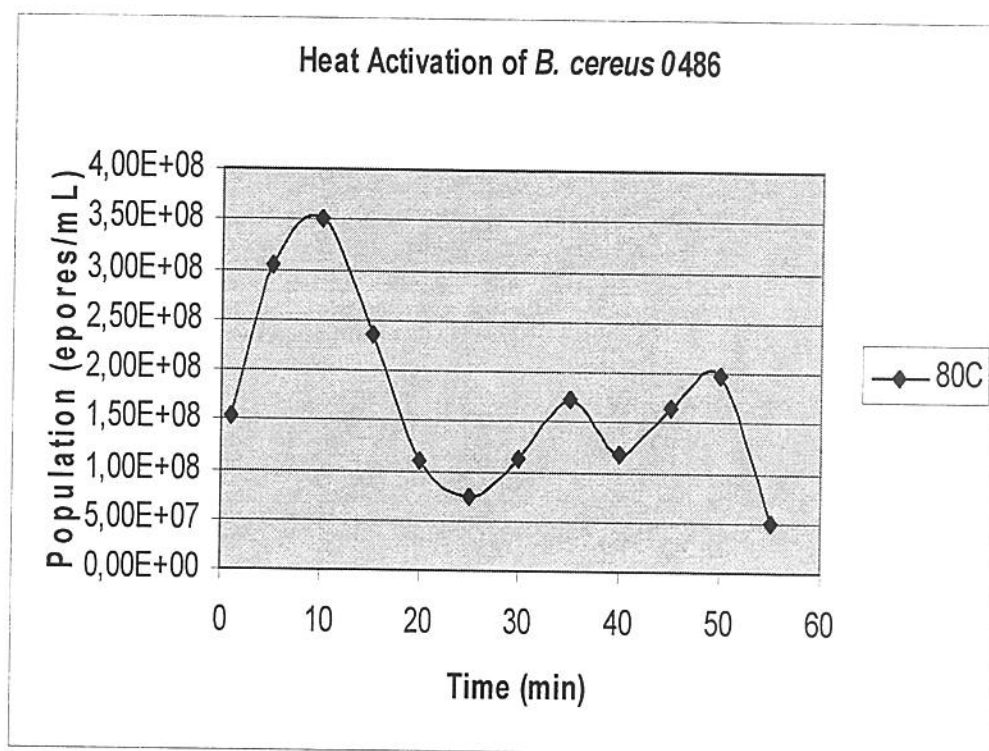
588

589

590

591

592



593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

FIGURE 2.

603

TIME-TEMPERATURE CURVE ILUSTRATING THE HEAT ACTIVATION OF B.

604

cereus 0486

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

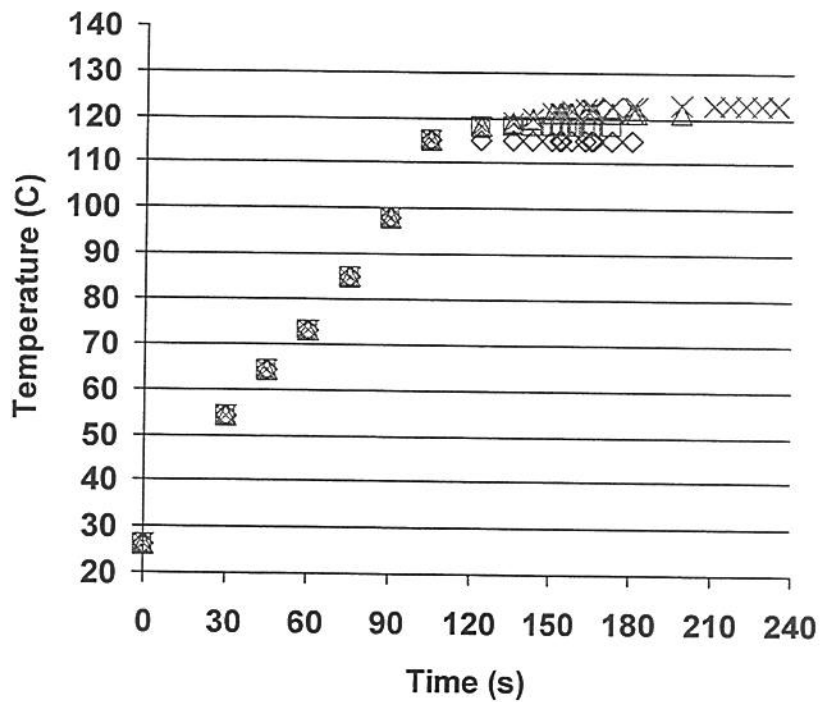
616

617

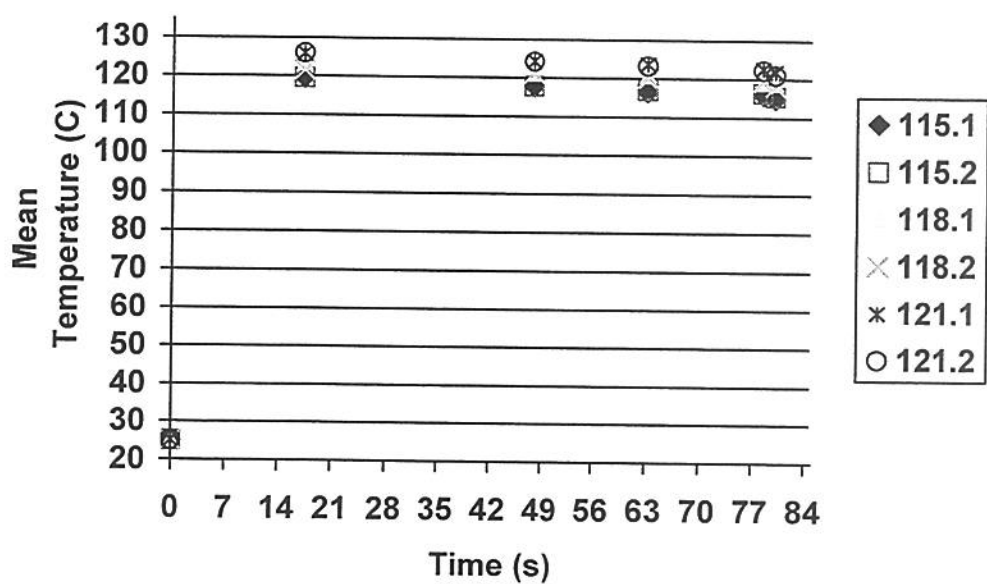
618

619

TDT-tube



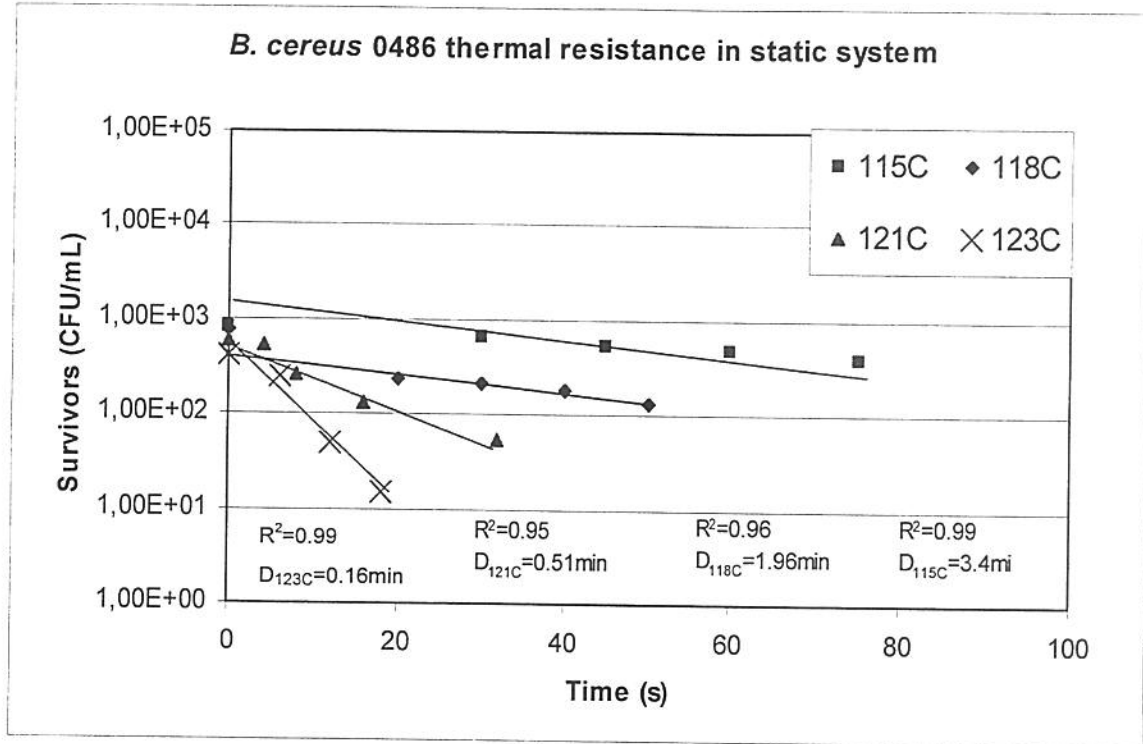
Microthermics unit



620

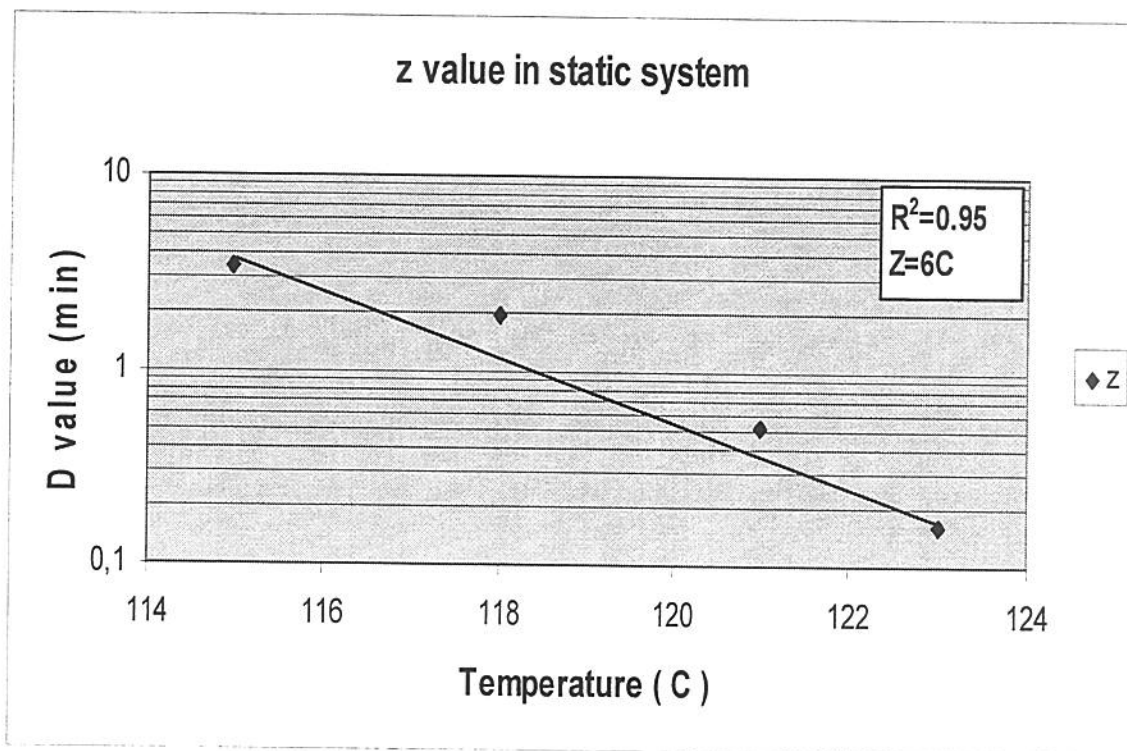
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642

FIGURE 3.
TIME-TEMPERATURE PROFILES FOR INOCULATED PASTEURIZED WHOLE
MILK IN TDT AND CONTINUOUS SYSTEMS.



643

644



646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668

FIGURE 4.
B. cereus KINETIC PARAMETERS IN STATIC SYSTEM.

669

TABLE 2.

670

B. cereus KINETIC PARAMETERS IN CONTINUOUS SYSTEM BY ALIKINETIC

671

SOFTWARE.

EPM Method				
	Equivalent binomium			
	Time (s)	Temperature (C)	Equivalent k (s ⁻¹)	Equivalent D (s)
Ea = 151,107,677 J/mol	36.38	125.99	3.74E-01	6.2
K _{121C} = 0.1657069 s ⁻¹	36.31	126.31	3.66E-01	6.3
D _{121C} = 13.90 s	68.55	117.26	1.35E-01	17.0
R ² = 0.731068	68.81	117.88	1.18E-01	19.6
	53.08	121.01	1.40E-01	16.5
	52.56	123.32	1.38E-01	16.8
PEIE Method				
	Equivalent binomium			
	Time (s)	Temperature (C)	Equivalent k (s ⁻¹)	Equivalent D (s)
Ea = 153,206,694 J/mol	42.42	123.52	3.21E-01	7.2
k _{121C} = 0.1861150 s ⁻¹	42.42	123.84	3.13E-01	7.3
D _{121C} = 12.37 s	73.01	116.02	1.27E-01	18.0
R ² = 0.666712	73.16	116.69	1.11E-01	20.6
	57.96	119.41	1.28E-01	17.9
	57.89	121.67	1.38E-01	18.4

672

673

674

CAPÍTULO 4

***B. cereus* INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY**

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Brazilian Journal of Food Technology

1
2
3 ***B. cereus* INOCULATED WHOLE MILK PACKAGES STUDY**
4
5
6
7

8 Cristiana de Paula PACHECO-SANCHEZ*¹ e Pilar Rodriguez de MASSAGUER²
9
10
11
12
13
14

15 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Rua :
16 Monteiro Lobato, 80 - CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

17 ¹pacheco@fea.unicamp.br; ²esteril@unicamp.br.

ABSTRACT

The objective of this research was to study the rate of defects in continuous UHT indirect process applied to whole milk (pH 6.6). Spores of *Bacillus cereus* 0486 were selected as Brazilian target.

In order to verify the theoretical defect rate of *B. cereus* 0486 spores, two thermal processes at 1.24L/min, in duplicate, were carried out in an aseptic pilot unit and tested by direct inoculation packages. The first thermal treatment simulated 1.35% of defects outside the UHT region for milk (150.5s at 121C). The second thermal process situated at the upper limit of UHT region for milk (36.3s at 134C) was inoculated with 1E+02 spores/mL. The thermal process at 134C for 36.3s did not allow the survival of *B. cereus* 0486 when 1E+02 spores/mL were inoculated. In the other process 1.33% of defects found were very close to the theoretical one.

The utilization of kinetic parameters determined in dynamic systems allows a better simulation of the thermal process in UHT region for milk with accurate prediction of defect levels.

In conclusion, the UHT milk thermal process, situated at upper limit of the UHT region, promotes sterile packages free from the pathogen *B. cereus* when its initial contamination is up to 1E+02 spores/mL.

Keywords: UHT milk, Bacillus cereus, Kinetic parameters, Continuous process.

RESUMO

Esta pesquisa estudou a taxa de defeitos no processo UHT contínuo indireto aplicado ao leite integral (pH 6,6). Os esporos de *Bacillus cereus* 0486 foram selecionados como alvo brasileiro. Para verificar a taxa de defeitos teórica de 1.35% de esporos de *B. cereus* 0486, dois processos térmicos a 1,24 l/min, em duplicata, foram realizados em unidade piloto asséptica e testados por inoculação direta dos esporos.

O primeiro tratamento térmico simulou a taxa de 1,35% de defeitos fora da região UHT para leite (150,5s a 121°C). O segundo processo térmico, situado no limite superior da região do UHT para leite (36,3s a 134°C) foi inoculado com 1E+02 esporos/ml. O processo térmico a 134°C por 36,3s não permitiu a sobrevivência de *B. cereus* 0486 quando inoculado com 1E+02 esporos/ml. No outro processo a taxa de defeitos encontrada foi de 1.33%, muito próximas da estabelecidas teoricamente.

A utilização dos parâmetros cinéticos determinados em sistema contínuo permite uma simulação mais precisa do processo térmico na região UHT para leite com predição exata de taxas de defeito.

Em conclusão, o processo térmico situado no limite superior da região do UHT para leite promoveu embalagens livres do patógeno *B. cereus* quando sua contaminação inicial for de até 1E+02 esporos/ml.

Palavras-chave: leite UHT, Bacillus cereus, Parâmetros cinéticos, Processamento contínuo.

INTRODUCTION

Fluid milk is a highly perishable commodity. Milk also has a special importance as a component of the diets for the young and the old people, as both of these groups tend to have greater vulnerability to adverse dietary factors than do people in the middle age groups. For both of these reasons, greater emphasis has been placed upon the quality of milk than upon the quality of most other groups of foods. In some instances this concern has been carried to the point where basic requirements have been superseded by primarily aesthetic considerations. Some thought must be given to what may be considered good manufacturing and handling practices of milk within a given environment. Certainly, where the need is great for the nutritional advantages of milk and milk products, adoption of either marginal or unnecessary requirements would be of very questionable value^{Nelson, 1981}.

The growing of aseptic packaging techniques for food products has increased the need for microbial quality control methods.

For product development in aseptic lines, challenge tests are recommended and the sterilization effectiveness of the process is verified by conducting tests with inoculated packs. In conducting such in-plant tests, the product is batch inoculated with the appropriate test organism. At least, 100 inoculated containers per processing variable should be prepared for incubation because detection of non-sterility with certainty requires many samples, since only a low number of packages may be non-sterile^{Ahvenainen, 1988}.

It is usually necessary to run a protocol of process variables by changing temperatures and maintaining a constant product flow rate; one of these processes is equivalent to that about to be verified.

The final step is to incubate the final product at target microorganism optimum temperature and to observe the spoilage pattern in relation to the process delivered. Results should confirm the adequacy of the scheduled process ^{Heppell, 1985 cited by Ahvenainen, 1988}.

The mathematical solution to the probability, with 95% of confidence, of obtaining the fastest particle from a population of residence times is very straightforward. If the residence time of “N” particles was measured, the probability that *none* would be a member of the fastest percentile can be expressed as $(1 - P)^N$, choosing the fastest percentile as 1% of the particle’s residence time population, which was considered consistent with the traditional use of 2-3 standard deviations of the mean to describe normal distributed variations. Therefore, the probability that *at least one* of the residence time is from the fastest percentile is $C = 1 - (1 - P)^N$. Choosing a value of “N” so that $C > 0.95$ (95% of confidence) will ensure that, at least, one particle residence time will be in the top “P” percentile of the population. The smallest “N” is 299 ($0.95 < 1 - 0.99^{299}$) ^{Digeronimo, Garthright and Larkin, 1997}.

UHT milk presents pH range from 6.6 to 6.8 ^{von Bockelmann, 1982}; with an average of 6.63 ^{Quality Management, 2003}. Considering that one of the rules for evaluating the UHT milk stability, during its shelf life, is that the fluctuations in pH values should be lower than 0.2

pH units^{von Bockelmann, 1988}. It can then be affirmed that assuming UHT milk average pH as 6.70, a minimum limit of 6.5 may be established as a simple criterion to identify non sterile samples with considerable safety margin^{Pacheco-Sanchez, 2004}.

Since the kinetic batch generated data used to design continuous heat treatments is not always accurate, the thermal processes design must consider kinetic data obtained in dynamic systems^{Wescott, Fairchild and Foegeding, 1995}.

Recently in Brazil, kinetic parameters for *Bacillus cereus*, in whole milk, have already been determined in continuous non-isothermal process ($D_{121C}=0.23$ min and $E_a=151,711.64$ J/mol) using ALIKINETIC software developed in MS Visual Basic 6.0® language^{Pacheco-Sanchez, 2005}. ALIKINETIC is a computer program with a graphical interface, where one can insert his experimental kinetic data for each new situation. The program estimates the kinetic parameters based on the Equivalent Point Method (EPM)^{Nunes and Swartzel, 1990} and on the Paired Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) method^{Welt et al, 1997}. ALIKINETIC also carries through the equivalent point calculations ($T_e \times t_e$) and predicts the remainder concentration of thermal labile factors and process lethality^{Tamega Jr., 2005}.

The Equivalent Point Method (EPM) was developed by Swartzel (1982), in order to facilitate the design of continuous ultra-high temperature flow processes. It was suggested that the EPM provided a reliable means for determining the kinetic parameters from dynamic thermal processing conditions^{Swartzel, 1984}. EPM has been applied in kinetic analysis and thermal assessment of continuous flow systems^{Westcoot et al, 1995 ; Berry et al, 1990}.

The EPM was recognized as “a significant advance in the application of food technology to food production” Giese, 1994 contributing to an Industrial Achievement Award from the Institute of Food Technologists in 1994.

The Paired Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) method was proposed for dynamic thermal treatment of uniformly heating samples Welt et al, 1997a. The rise of the PEIE method was demonstrated by successfully defining kinetic parameters that had been used to generate simulated experimental data.

The PEIE was also employed to understand thermal inactivation behavior of a particular spore population, in a specific product, submitted to specific process conditions. In the absence of shoulder in survivor curves, the PEIE method provides results similar to the traditional kinetic parameters estimation Welt et al, 1997b.

Members of the genus *Bacillus* are aerobic or facultative bacteria that can act as invasive or opportunistic pathogens of man and animals. Due to their capacity of forming endospores that are highly resistant to heat, drying and other destructive agencies are of particular importance in the milk industry Singh et al, 1980.

The UHT milk has become a preferential product of the Brazilian consumer, increasing the consumption and production, during 1993 to 2003, from 187 million liters to 4,200 million liters (ABLV, 2003).

In Brazil, the incidence of *Bacillus* in UHT milk was studied and the results showed 18.75% of samples enumerated with 1-9 CFU/mL of milk, 15.65% of samples with 10-49 CFU/mL of milk, 18.75% with 50-99 CFU/mL of milk and 6.25% with more than 100 CFU/mL of milk^{Schoken-Iturrino, Nader Filho and Dimenstein, 1996}. In 2000, 45% of UHT milk samples presented values higher than of 1E+02 CFU/ml of milk, the highest limit established by the Brazilian standard for mesophilic aerobic sporulated microorganism^{Secretaria de Vigilância Sanitária, 1997}. Three hundred cultures were isolated and 8% of them were confirmed as *B. sporothermodurans* by genetic tests^{Zacarchenco et al, 2000}.

Bacillus cereus is well known as a spoilage organism in the dairy industry and numerous sources of this and another *Bacillus* species contaminating milk supplies exist.

B. cereus is commonly found in soil, vegetables and in many raw and processed foods^{Rhodehamel and Harmon, 1998} and represented the most important *Bacillus* species in terms of food hygiene and public health. It is considered in the traditional taxonomy to be closely related to *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and *B. mycoides* - *cereus* group^{Christiansson & Griffiths, 2000}.

However, the relative contribution performed by each source and how the *Bacillus* population of milk develops during processing remains unclear. In addition, *B. cereus* has already been sporadically isolated from bulk milk tank^{Bramley and McKinnon, 1990}. It is associated with cattle feed throughout the year and tended to be more common in raw milk during the summer months.

154 Even with low concentrations of *B. cereus* and *B. licheniformis* in raw and
155 pasteurized milk pre-incubated at room temperature, *B. cereus* can dominate the *Bacillus*
156 population, reaching levels associated with the enterotoxin production proving that its
157 growth kinetics is greater than *B. licheniformis* at ambient temperatures ^{Crielly et al, 1994}.

158 Food poisoning caused by *Bacillus cereus* may occur when foods are prepared and
159 held without adequate refrigeration for several hours before serving and may occur if
160 $1\text{E}+06$ *B. cereus*/g are present. Two types of illness have been attributed to the
161 consumption of foods contaminated with *B. cereus* ^{Rhodehamel and Harmon, 1998}.

162 It is known that *B. cereus* can survive the milk pasteurization processes. Its thermal
163 resistance at 100C is about 5.5 min ^{Mossel et al, 1967}, but the survival is very rare at 145C. The
164 literature presents only one study that reports an extremely resistant isolate surviving rate at
165 135C for 4h when $1\text{E}+05$ to $1\text{E}+06$ spores/mL were inoculated ^{Franklin, 1970}.

166 *B. cereus* thermal resistance in continuous flow systems is relatively low,
167 considering $D_{103\text{C}} = 4$ s and $z = 8.2\text{-}8.5\text{C}$ ^{Wescott, Fairchild and Foegeding, 1995} but it has been
168 occasionally isolated from UHT milk ^{Mostert, Lück and Husmann, 1979; Westhoff and Dougherty, 1981}.

169 Ultra high temperature (UHT) sterilization of milk is a process in which milk is
170 heated to a temperature of 135C-150C in a continuous flow and held at that temperature for
171 a few seconds to produce a satisfactory level of commercial sterility with an acceptable
172 amount of sensorial change in the final product.

The sterilized milk is not completely free of all microorganisms. It is free of sporulating, toxicogenic and pathogenic microorganisms to a level so that it remains safe for consumption for several weeks at room temperature^{Pien, 1955 cited by Sahoo et al, 2002}. In Brazil, the definitions are in agreement with Pien (1955) but UHT milk treatment range from 130 - 150C for 2-4 s^{Ministério da Agricultura , 1997}. The use of less severe heat process in the lower portion of this range allied to a large initial concentration of bacilli in milk may present a risk of survivors.

The objective of this research was to verify the rate of defects, in terms of direct *B. cereus* 0486 inoculation in UHT whole milk thermal process applying the kinetic parameters previously obtained in dynamic system.

METHODOLOGY

Spore production and collection

B. cereus 0486 isolated from Brazilian whole milk, in the Termobacteriology Laboratory-Unicamp, was inoculated in Nutrient Broth (Difco) and incubated for 24h at 30C. Slants (70mL of medium in 220mL sterile glass bottles) were prepared using Nutrient Agar (Difco) plus 5 ppm MnSO₄ and inoculated with 0.2mL of the cell suspension. Eighty bottles were incubated in horizontal position for 9 days at 30C in order to maximize sporulation.

Distilled water was added for spore collection and washing. The resultant suspension was filtered and submitted to three refrigerated centrifugations at 1000 g for 10min, as well as, to the ultrasonic treatment for 2min at 2C in order to obtain free spores (microscopically observed). The treated suspension was stored at 4C ^{Pflug, 1990}.

Spore counting in the suspension

The *B. cereus* spores suspension was heat shocked for 10min at 80C ^{Pflug, 1990}. After the heat activation, the suspension was pour plate, in duplicate, in Nutrient Agar (Difco) ^{Gonzales et al, 1995} and incubated for 2 days at 30C.

Whole milk

Pasteurized (73-76C for 20-30s) and refrigerated (4C) Brazilian whole milk (pH 6.7) was used in all thermal processes. The initial pH was determined at room temperature and the milk contamination was characterized by aerobic plate counts ^{Morton, 2001}, mesophilic aerobic sporeforming count ^{Stevenson and Segner, 2001}, mesophilic anaerobic sporeforming detection ^{Scott et al, 2001} and *B. cereus* spores count ^{Rhodehamel and Harmon, 1998}. After 48h this milk were used in all thermal process because the pasteurized milk initial contamination with *B. cereus* was considered to standardize the total inoculation level before thermal processes, otherwise the *B. cereus* inoculum would not be precise.

Spore inoculation level

B. cereus 0486 spore suspension was aseptically inoculated in a class 100 laminar flow cabinet, in pasteurized refrigerated whole milk plus 0.03% sodium citrate.

The inoculation levels were calculated considering the kinetic parameter, $D_{121C}=13.90$ s, determined in *Microthermics* UHT-HTST Lab-25-DH pilot unit ^{Pacheco-Sanchez, 2005}. The following processes, estimated using the Equivalent Point Method ^{Miles and Swartzel, 1995} were tested:

A) 150.5 s at 121C, inoculated with 5.0E+06 spores/mL of milk. This process is located outside the UHT region for milk ^{Kessler, 1981} and the theoretical inoculation level was calculated to cause 1.35% of defects, in packages contaminated with *B. cereus* 0486, promoting 10.8 decimal reductions in its population ^{Toledo, 1991} applying the Pacheco-Sanchez (2005) kinetic parameters.

B) 36.3 s at 134C, inoculated with 1.0E+02 spores/mL of milk simulating the commercial contamination level of raw milk. This process is located at the upper limit of UHT region for milk ^{Kessler, 1981} and was designed to promote 11.8 decimal reductions in *B. cereus* population ^{Toledo, 1991} applying the Pacheco-Sanchez (2005) kinetic parameters.

Continuous Thermal Processing

All thermal processes, in duplicate, were carried out in an aseptic pilot unit (*Microthermics* UHT/HTST Lab-250DH, Raleigh, USA) available at UNICAMP. This unit is equipped with two indirect spiral heat exchangers (pre heater and final heater), several jumpers to promote different retention times and one spiral cooler. All exchangers have 11,58m of length. Before each heat treatment the unit was sterilized, with water, for 15 min at 121C.

In order to stabilize the system, at process temperature, uninoculated milk was used. Flow rate of 1.24 L/min was applied in all cases to promote a turbulent flow ($Re > 2600$). A Fluke Hydra data logger, model 265A was used, for temperature data collection every 8 s at five positions (pre heater outlet, final heater outlet, hold tube outlet, cooler outlet and sterile product outlet)

After each heat process 300 glass bottles (220mL), sterilized at 121C for 15 min, were aseptically filled, at 20-25C, in class 100 laminar flow cabinet and aseptically sealed with crown caps, sanitized for 10 minutes with Vortexx ES 0.3% v/v (ECOLAB®).

All bottles were incubated for 30 days at 30C ^{von Bockelmann, 1988} in order to recuperate injured spores.

Thermal profiles

Product and utilities temperatures during processing were determined by averaging the temperature measurements logged during the process period at each section position.

Flow rate, system and connection dimensions were then used to determine residence time between each section. This time was divided into 20 intervals to construct the temperature history.

Considering the flow heating conditions using isothermal heat or cooling source, using isothermal heat sink, the Deindoefer and Humprey relation presented in equation 1 and 1.1, was used to determine as exponential solution for the mass average temperature ^{Swartzel, 1982}.

$$\ln(T_{H,C} - T_s(t)) = \ln(T_{H,C} - T_0) - \frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} \cdot t \quad (\text{eq.1})$$

$$\frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} = J \quad (\text{eq.1.1})$$

To approach an exact solution for equation 1, the values of the initial parameter values are established at t_0 resulting in the determination of J . Each section presents a residence time, divided into 20 intervals, generating a specific value for J .

Thus, knowing the other parameters, in equation 1, T_s can be determined in all cases. The iteration continues in each section until time-temperature curve emerges determining the thermal profile from the start of the process to each section up to the fill system.

CIP procedure

After each heat processes, the fill system was closed and rinse water flushed through the pilot unit, at process temperature and flow rate of 2.48L/min, for 10 min.

Initially, NaOH 1% v/v plus P3-Stabicip ZN 0.5% v/v (ECOLAB®) ran about 10 min at 55C in order to maximize the detergent action followed by rinse water flowing for 10 min; in sequence, Elsolve97 0.13% w/v (ECOLAB®) flowed for 10 min at 45C as a descaler and rust remover, followed by 10 min of rinse water and, finally, Vortexx ES 0.5% v/v (ECOLAB®) ran for 20 min at 35C for its sporicidal activity, concluding with 20 minutes of rinse water. This way, an efficient CIP procedure was obtained ^{Ecolab, 2004}.

Non-sterile units

After incubation, glass bottles were characterized by color, phase separation and gas formation; then they were aseptically opened in a class 100laminar flow cabinet for pH measurements at room temperature.

Non-sterile units, identified by swelling, color changes, phase separation, gas formation and/or pH measurements lower than 6.5, had an aliquot transferred to *B. cereus* selective MYP plus polymixin 0.1% (Mannitol-egg-yolk-polimix Agar- Difco) medium, BHI (Brain Heat Infused Agar - Difco) medium and Fluid Thioglycollate medium (Difco) and incubated at 30C and 37C for 7 days.

Growth of colonies were characterized in each medium and submitted to Gram, spore stain and catalase test. Only typical colonies of *B. cereus* in MYP, surrounded by precipitate zone which indicates lecithinase production and presenting a pink color due to no fermentation of mannitol, were submitted to relevant FDA confirmatory and differential series for *B. cereus*: Anaerobic growth in phenol red glucose broth, Reduction of Nitrate to Nitrite, Motility test and Rhizoid Growth on Nutrient Agar (Difco) ^{Rhodehamel and Harmon, 1998}.

RESULTS AND DISCUSSION

Spore suspension and whole milk

Bacillus cereus suspension was 5.0E+09 spores/mL of milk and the pasteurized milk showed pH of 6.92.

The total aerobic colony count of pasteurized milk was 1.22E+07 CFU/mL of milk; the mesophilic aerobic sporeforming count was 2E+02 spores/mL of milk, the mesophilic anaerobic sporeforming detection was 33,33% and the enumeration for *B. cereus* was 1E+02 spores/mL of milk.

The refereed microbiological values were higher than those reported in literature and/or Brazilian standard for pasteurized milk because for aerobic colony the standard count is 1E+06 CFU/mL of milk and for mesophilic aerobic sporeforming the respective count exceeds in 50% the upper limit permitted in the Brazilian legislation ^{Secretaria de Vigilância}

Sanitária, 1997

These results may be explained because the pasteurized milk was stored, at 4C for 2 days, before thermal processing while waiting for the microbial analyses results. In this situation the contamination level was higher because some psicrotrophic microorganisms may have developed. This fact certainly does not occur inside a processing plant where the pasteurized milk is processed on the same day it is received. This contamination level, of course, represents a challenge for the thermal processes tested.

Rate of Defects

As presented in Table 1, the predicted rate of defects, based on dynamic kinetic parameters showed a good performance, once in process with survivors confirmed as *B. cereus*, both the predicted (1.35%) and experimental (1.33%) rates of defects were very close to each. In addition, the predicted rate was higher than the experimental one offering safety margin for processors.

Table 1. Direct inoculation heat treatment with *B. cereus* spores

Conditions	Heat Treatments	
	121C/150.5s	134C/36.3s
Inoculum (spores/mL)	5.0E+06	1.0E+02
Decimal reductions expected	10.8	11.8
Predicted rate of defects for <i>B. cereus</i> (%)	1.35	1.6E-08
1° repetition		
Experimental rate of defects for <i>B. cereus</i> (%)	1.33	<1
Predicted rate (%) – experimental rate (%)	0.02	-
Experimental rate of defects for other microorganisms (%)	4.6	<1
2° repetition		
Experimental rate of defects for <i>B. cereus</i> (%)	1.33	<1
Predicted rate (%) – experimental rate (%)	0.02	-
Experimental rate of defects for other microorganisms (%)	5	<1

323

324

325

326

327

328

329

Tables 2 and 3 detail microbiological characteristic of the non sterile units, after each thermal process, showing the pH measurements and the identification of the respective contaminants. Figures 1 and 2 shows the duplicate processes profiles.

Table 2. Microbiological characterization of non sterile units processed at 121C for 150.5s, 1^o repetition, with inoculation level of 5.0E+06 *B. cereus* spores/mL of milk

121C for 150.5s - 1 ^o repetition												
bottle	pH	MYP	BHI*	TB	gram/endospore	catalase	Group	FR	N	MOT	RG	Conclusion
15	6,09	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
17	6,47	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
21	6,48	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
38	5,77	no growth	no growth	+	rods +/-terminal	-	<i>Clostridium</i>					<i>Clostridium sp</i>
54	6,20	no growth	no growth	+	rods +/-terminal	-	<i>Clostridium</i>					<i>Clostridium sp</i>
56	6,10	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
104	6,12	no growth	no growth	+	rods +/-terminal	-	<i>Clostridium</i>					<i>Clostridium sp</i>
107	6,48	atypical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
110	6,12	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
120	6,45	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
121	6,13	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
162	6,50	no growth	growth	-	rods +/-no spores	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
176	6,48	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
178	6,50	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
209	6,47	typical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
220	6,46	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
226	6,49	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
291	6,46	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>

FR =Anaerobic growth in phenol red glucose broth; N=Reduction of Nitrate to Nitrite; MOT=Motility test; RG=Rhizoid growth on Nutrient Agar; MYP = Mannitol-egg-yolk-polimix Agar, BHI = Brain Heat Infused Agar growth, TB = Tioglicolate Broth growth

330

331

332

333

334

In this heat treatment, all non-sterile units presented swelling, alteration in color, loss of homogeneity and, for units 38, 54 and 104 putrefactive smells. Eighteen non sterile units were counted in 300 processed bottles (rate of defects = 6%), and just four non sterile units were contaminated with *B. cereus* (rate of defects = 1.33%).

335 This fact proved that, kinetic parameters help to establish a good prediction for rate
336 of defects estimated for *B. cereus* in thermal processed products but also indicates that there
337 are another microorganisms (aerobic and/or anaerobic) in milk, more resistant than the
338 microbiological target selected or in higher concentration.

339 The bottles contamination with *Bacillus sp* such as *B. subtilis* and/or *B.*
340 *licheniformis* indicate common organisms isolated from UHT milk as reported by Ridway
341 (1958) and Mostert et al (1979). Units contaminated with *Clostridium sp* showed a pH
342 value lower than those contaminated with *Bacillus*. This may be explained by the
343 proteolysis of the majority members of this group. Bottle number 162 presented a *Bacillus*
344 culture but no spores were obtained even in Sporulating Agar.

345 *B. sporothermodurans* is a mesophilic bacterium with highly heat-resistant spores
346 that was detected in Europe, in UHT milk, in 1985. *B. sporothermodurans* spores are seen
347 infrequently. The vegetative cells growth at 37C but did not grow in anaerobic conditions,
348 presents a negative reduction for nitrate and did not produce acid from mannitol ^{Hammer, 2000}.
349 Thus, the isolate from bottle 162 follows this pattern and could be *B. sporothermodurans*,
350 but conclusive and specific tests must be conducted.

351 The original *B. cereus* 0486 strain showed motility when isolated from milk and
352 submitted to confirmatory and differential tests; but only 50% of *B. cereus* strains show
353 motility ^{Rhodehamel and Harmon, 1998}. This test was implemented because injured cells can loss
354 their motility as verified in results.

Table 3. Microbiological characterization of non sterile units processed at 121C for 150.5s, 2° repetition, with inoculation level of 5.0E+06 *B. cereus* spores/mL of milk

121C for 150.5s - 2° repetition												
bottle	pH	MYP	BHI*	TB	gram/endospore	catalase	Group	FR	N	MOT	RG	Conclusion
6	6.07	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
49	6.43	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
71	6.12	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
126	6.11	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	+	<i>Bacillus sp.</i>
131	6.50	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
136	6.12	atypical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
140	6.09	no growth	no growth	+	rods +/-terminal	-	<i>Clostridium</i>					<i>Clostridium sp</i>
154	6.13	typical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
155	6.10	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
160	6.07	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	-	+	-	+	<i>Bacillus sp.</i>
190	6.08	atypical	growth	-	rods +/-terminal	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
224	6.43	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
229	6.18	typical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
234	5.48	no growth	no growth	+	rods +/-terminal	-	<i>Clostridium</i>					<i>Clostridium sp</i>
246	6.13	atypical	growth	-	rods +/-terminal	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
250	5.77	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>
261	6.11	typical	growth	-	rods +/-subterminal	+	<i>Bacillus</i>	-	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
279	6.34	typical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
297	6.16	atypical	growth	-	rods +/-central	+	<i>Bacillus</i>					<i>Bacillus sp.</i>

FR =Anaerobic growth in phenol red glucose broth; N=Reduction of Nitrate to Nitrite; MOT=Motility test; RG=Rhizoid growth on Nutrient Agar; MYP = Mannitol-egg-yolk-polimix Agar, BHI = Brain Heat Infused Agar growth, TB = Tioglicolate Broth growth

In 2° repetition, at 121C for 150.5s, the non sterile bottles presented the same characteristics as the 1° repetition, including the putrefactive smell in units 140 and 234. Nineteen non sterile units were counted in 300 processed bottles (rate of defects = 6.3%), and four non sterile units were contaminated with *B. cereus* (rate of defects = 1.33%).

Both bottles contaminated with *Clostridium sp* also showed the lowest pH values. In this repetition, the potential presence of *B. sporothermodurans* was not verified. Thus, the repetitions at 121C for 150.5s were very close in terms of recuperated microbiological groups. This process characterizes an insufficient treatment to eliminate contaminants.

367 Figure 1 shows duplicate processes profiles, at 121C for 150.5 s, with theoretical
368 1.35% rate of defects for *B. cereus*.

369 Profiles for repetition 1 and 2, were superposed and the 1.33% experimental rate of
370 defects for *B. cereus* was verified. The error of 0.02% may be justified by numbers
371 approximation because, with 1.33% and 1.35%, the non sterile units expected are 3.99 and
372 4.05, respectively; no greater than 4 units in both cases. Even with error of 0.02% for non-
373 sterile units, the kinetic parameters obtained in dynamic system predicted a very close rate
374 of defects for *B. cereus*, applied for a process outside the UHT region for milk.

375

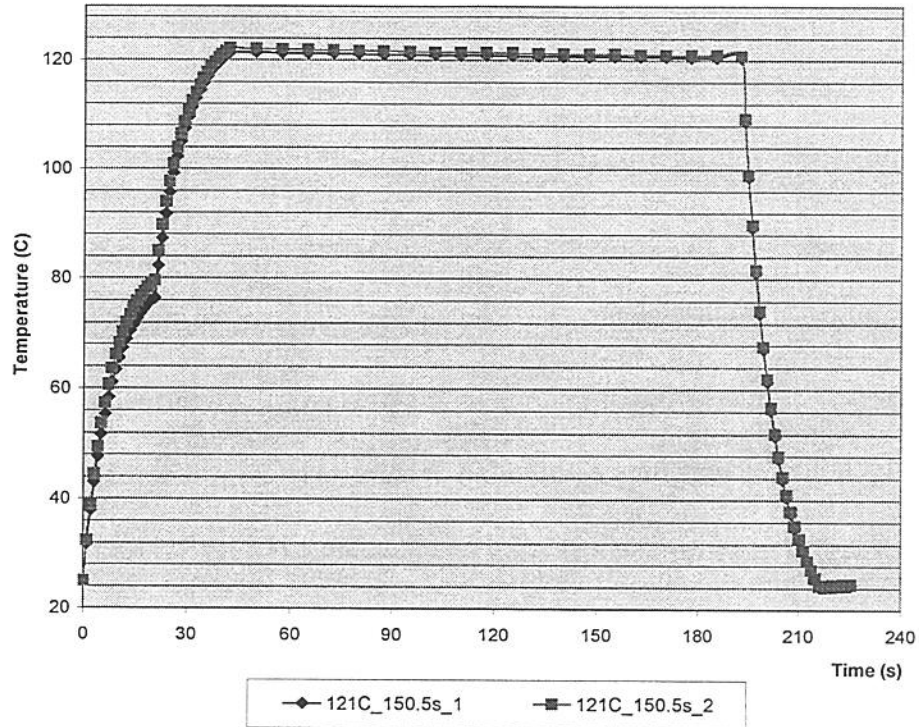


Fig. 1. Time-temperature profile at 121C for 150.5s with inoculation level of $5.0E+06$ *B. cereus* spores/mL of milk

At 134C for 36.3s, none non sterile units was found indicating that this process is sufficient to eliminate all natural and inoculated flora presented.

Figure 2 presents the duplicate processes profiles, at 134C for 36.3 s, with $1.0E+02$ *B. cereus* spores/mL of milk. In this case, both profiles were superposed, except for cooling portion where lethality is not significant anymore.

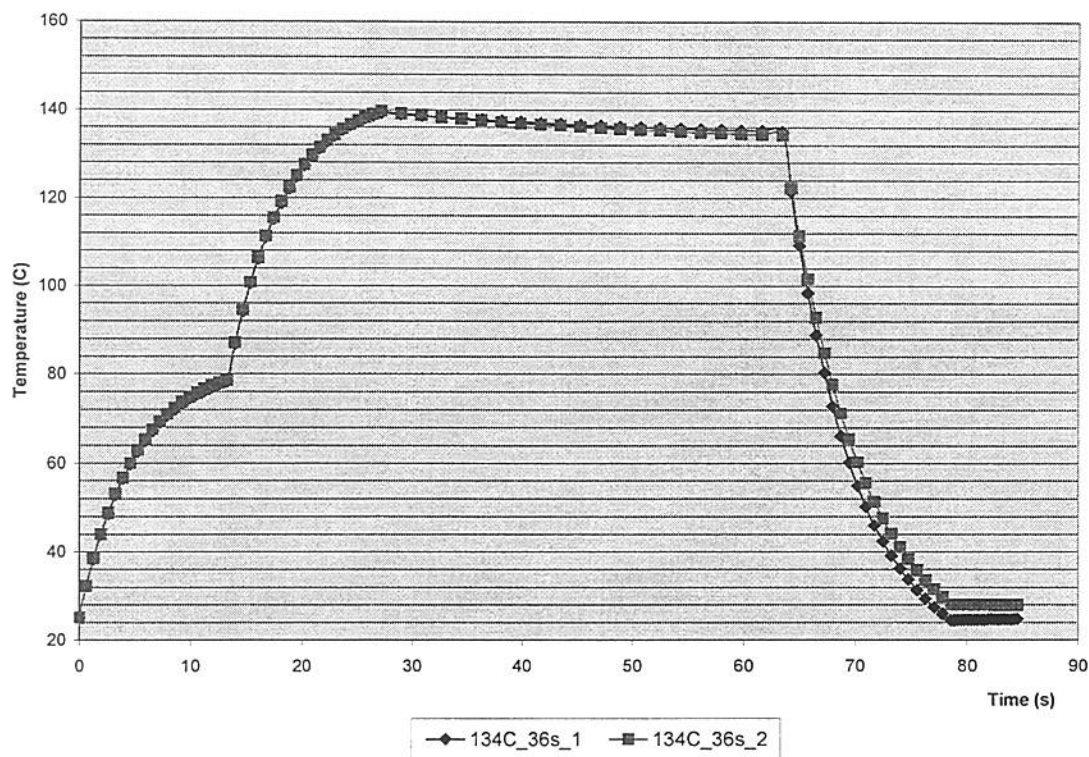


Fig. 2. Time-temperature profile at 134C for 36.3 s with inoculation level of $1.0E+02$ *B. cereus* spores/mL of milk

CONCLUSION

⇒ The kinetic parameters in dynamic systems allowed a satisfactory prediction of thermal process rate of defects, with *B. cereus* as target, outside and inside UHT region for milk.

⇒ The equivalent processes, to 36.3 s at 134C, did not allow the survival of *B. cereus* 0486 or any other microorganism, if the *B. cereus* 0486 contamination level is $1.0E+02$ spores/mL of milk.

418 $\Rightarrow$ Although the Brazilian regulation ^{MAPA, 1997} indicates that UHT milk treatment is
 419 between 130 -150C for 2-4 s; in practice only equivalent thermal processes for
 420 Brazilian milk at 134C for 36.3s or higher in indirect system, at the upper limit of UHT
 421 region for milk ^{Kessler, 1981}, could safely assure the absence of *B. cereus*, considering the
 422 microbial quality of the Brazilian milk.

423 ACKNOWLEDGMENTS

424 CNPq and *Microthermics*®.

425 NOMENCLATURE

426			
427	<i>Symbol</i>	<i>Quantity represented</i>	<i>Units</i>
428	A	Heat transfer surface area	m ²
429	c	Specific heat	J/Kg K
430	D	Decimal reduction time	s
431	J	($U_t A / c_p \varpi_p$)	s ⁻¹
432	Re	Reynolds number	dimensionless
433	t	Time	s
434	U	Overall heat transfer coefficient	J/m ² s K
435	ϖ	Mass of flowing medium in heat exchanger	Kg

436 **Subscripts**

437 *Symbol* *Quantity represented*

438 C Cooling

439 H Heating

440 o Initial condition

441 p Product

442 t Time or time dependent

443

444

REFERENCES

445 [1] ABVL–Associação Brasileira de Leite Longa vida.
446 www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida. 2003.

447 [2] AHVENAINEN, R. Quality assurance and quality control of aseptic packaging. **Food**
448 **Reviews International**, 4(1):45-76, 1988.

449 [3] BERRY, M.F.; SINGH, R.K.; NELSON, P.E. Kinetics of Methionine sulfonium salt
450 destruction in a model particulate system. **Journal of Food Science**, 55(2): 502-505.
451 1990.

452 [4] BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON,
453 R.K. (Ed). **Dairy Microbiology**, 1. London: Elsevier Science Publishers. 1981. p.163-
454 208.

455 [5] MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 370, de 4 de
456 Setembro de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de
457 Origem Animal. **Normas e Diretivas do Mercosul**. 1997.

458 [6] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria 451, de 19 de Setembro de
459 1997. Padrões Microbiológicos em Alimentos. **Diário Oficial** (República Federativa do
460 Brasil). 1997.

- 461 [7] CHRISTIANSSON, A.; GRIFFITHS, M.W. Summary and Conclusions. In:
462 INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **New developments in detection and**
463 **identification of spore-forming bacteria in milk and milk products.** 1 Ed. Brussels:
464 IDF, 357/2000, p. 55-56. 2000.
- 465 [8] CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of
466 milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, 77(3), 256-263, 1994.
- 467 [9] DIGERONIMO, M.; GARTHROGHT, W. LARKIN, J.W. Statistical Design and
468 Analysis. **Food Technology**, 51(10), 52-56, 1997.
- 469 [10] FRANKLIN, J.G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing.
470 **Journal of Applied Bacteriology**, 33:180-191, 1970.
- 471 [11] GIESE, J. 1994. Ultrapasteurized liquid whole eggs earn. IFT - Food technology
472 Industrial Achievement Award. **Food Technology**, 48(9), 94-96, 1994.
- 473 [12] GONZALES, I.; LOPEZ, M.; MASAS, M.; GONZALES, J.; BERNARDO, A. The
474 effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores.
475 **Journal of Applied Bacteriology**, 78(5), 548-554, 1995.
- 476 [13] HAMMER, P. Raw Materials: Quality and Pricing. In: INTERNATIONAL DAIRY
477 FEDERATION. *Bacillus sporothermodurans* – A *Bacillus* forming highly heat-
478 resistant spores. 1 Ed. Brussels: IDF, 357/2000, p. 5-8.

- 479 [14] KESSLER, H.G. **Food Engineering and Dairy Technology**. Germany. 1981.
480 654p.
- 481 [15] MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 370, de 4 de
482 Setembro de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de
483 Origem Animal. **Normas e Diretivas do Mercosul**. 1997.
- 484 [16] MILES, J.J.; SWARTZEL, K.R. Evaluation of continuous thermal process using
485 thermocouple data and calibrating reactions. **Journal of Food Process Engineering**,
486 **18**, 99-113. 1995.
- 487 [17] MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: WANDERZANT, C.; SPLISTTOESSER,
488 D.F. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**,
489 4 ed. Washington: APHA, 2001, p. 63-67.
- 490 [18] MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E.; Enumeration of *Bacillus*
491 *cereus* in foods. **Applied Microbiology**, **15**(3):650-653, 1967.
- 492 [19] MOSTERT, J.F.; LÜCK, H.; HUSMANN, R. A. Isolation, identification and practical
493 properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South African Journal of**
494 **Dairy Technology**, **11**(3):125-132, 1979.
- 495 [20] NELSON, F.E. The Microbiology of Market Milk. In: ROBINSON, R.K. (Ed). **Dairy**
496 **Microbiology**, 1. London: Elsevier Science Publishers. 1981. p.165-207.

- 497 [21] NUNES, R.V.; SWARTZEL, K.R. Modeling thermal Processes Using the Equivalent
498 Point Method. **Journal of Food Engineering**, 11:103-117, 1990.
- 499 [22] QUALITY MANAGEMENT. Quality in Chemistry Scheme.
500 www.qualitymanagement.co.uk. 2003.
- 501 [23] PACHECO-SANCHEZ, C.P. Microbiological safety of Brazilian UHT milk. In:
502 International Conference Engineering and Food, Montpellier, France, Société de
503 Chimie Industrielle, 2004.
- 504 [24] PACHECO-SANCHEZ, C.P. *B. cereus* kinetic parameters in continuous milk
505 process. **Journal of Food Process Engineering**, proceedings. 2005.
- 506 [25] PFLUG, I.J. Text Book for an Introductory Course in the Microbiology and
507 Engineering of Sterilization Processes. 6th edition. **Environmental Sterilization**
508 **Laboratory**. 1990.
- 509 [26] RIDGWAY, J.D. The incidence and thermal resistance of mesophilic spores found in
510 milk and related environments. **Journal of Applied Bacteriology**, 21:118. 1958.
- 511 [27] RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: U.S. Food Drug
512 Administration (Ed). **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed. Gaithersburg: AOAC,
513 1998. 14.01-14.08p.

- 514 [28] SAHOO, P.K; ANSARI, Md.I.A. ; DATTA, A.K. Computer-aided design and
515 performance evaluation of an indirect type helical tube ultra-high temperature (UHT)
516 milk sterilizer. **Journal of Food Engineering**, 51(1):13-19, 2002.
- 517 [29] SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência
518 de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa
519 vida. **Higiene Alimentar**, 1(42): 25-27 1996.
- 520 [30] SCOTT, V.N.; ANDERSON, J.E.; WANG, G. Mesophilic Anaerobic Sporofomers.
521 In: WANDERZANT, C.; SPLISTTOESSER, D.F. (Ed). **Compendium of Methods for**
522 **the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. Washington: APHA, 2001, p. 229-
523 237.
- 524 [31] SINGH, R.S.; SINGH, S. BATISH, V.K.; RANGANATHAN, B. Bacteriological
525 quality of infant milk foods. **Journal of Food Protection**, 43:340-342, 1980.
- 526 [32] STEVENSON, K.E.; SEGNER, W.P. Mesophilic Aerobic Sporofomers. In:
527 WANDERZANT, C.; SPLISTTOESSER, D.F. (Ed). **Compendium of Methods for**
528 **the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. Washington: APHA, 2001, p. 223-
529 227.
- 530 [33] SWARTZEL, K.R. Arrhenius kinetics as applied to product constituent losses in ultra
531 high temperature processing. **Journal of Food Science**, 47(6), 1886-1891, 1982.

- 532 [34] TAMEGA Jr., W.P. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em**
533 **sistemas de processamento térmico contínuo de alimentos.** 196p. 2005. Dissertação
534 (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos,
535 Universidade Estadual de Campinas. 2005.
- 536 [35] TOLEDO, R.T. **Fundamentals of Food Process Engineering.** 2nd ed. New York:
537 Van Nostrand Reinhold, 1991, 602p.
- 538 [36] von BOCKELMANN, B. **Aseptic packaging processing.** Tetra Pak International.
539 1982.
- 540 [37] von BOCKELMANN, B. Quality control of aseptically packaged food products. In:
541 REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food.** 1988.
- 542 [38] WELT, B.A.; TEIXEIRA, A.A.; BALABAN, M.O.; SMERAGE, G.H. SAGE, D.S.
543 Iterative Method for Kinetic Parameter Estimation from Dynamic Thermal Treatments.
544 **Journal of Food Science**, 62(1):8-14, 1997a.
- 545 [39] WELT, B.A.; TEIXEIRA, A.A.; BALABAN, M.O.; SMERAGE, G.H.
546 HINTINLANG, D.E.; SMITTLE, B.J. Kinetic Parameter Estimation in conduction
547 heating foods subjected to dynamic thermal treatments . **Journal of Food Science**,
548 62(3):529-538, 1997b.

- 549 [40] WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated
550 from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, 64:572-
551 580, 1981.
- 552 [41] WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and
553 *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems.
554 **Journal of Food Science**, 60(3):446-450, 1995.
- 555 [42] ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F.; DESTRO, M.T.; ANDRIGUETO, C.
556 Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência
557 do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 20(3):363-368, 2000.

APÊNDICE

MYP - MANITOL-GEMA DE OVO-POLIMIXINA AGAR - DIFCO (pH 7,1)

Bacto extrato de carne	1g
Bacto peptona	10g
Bacto D-Manitol	10g
Cloreto de sódio	10g
Fenol red	0,025g
Bacto Agar	15g

PREPARAÇÃO

Pesar 46g e dissolver em 900ml de água destilada.

Distribuir 225ml em cada frasco de 500ml (4 frascos).

Autoclavar a 121°C por 15 min.

Resfriar a 50-55°C.

Adicionar 12,5ml de Bacto Emulsão de gema de ovo.

Adicionar 25000 unidades de polimixina:

A) Rehidratar com 5ml de água destilada estéril e adicionar 4,1ml ao meio.

B) Dissolver 500000 unidades de polimixina estéril, adicionar 50ml de água destilada estéril e adicionar 2,5ml da solução ao meio.

Homogeneizar e plaquear. Estocagem de 2 a 8°C.

CALDO FENOL RED-GLICOSE (pH 7,4)

Proteose peptona nº3	10g
Cloreto de Sódio	5g
Extrato de carne (opcional)	1g
Dextrose	5g
Fenol red (7,2ml de solução 0,25%)	0,018g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO

Dispensar 3ml em tubo 13x100mm. Autoclavar a 118°C por 10min.

CALDO NITRATO (pH 7,0)

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Nitrito de potássio	1g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO

Dissolver ingredientes. Dispensar 5ml por tubo 16x150mm.
Autoclavar a 121°C por 15min.

NITRATO AGAR - DIFCO (pH 6,8)

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Agar	15g

PREPARAÇÃO

Pesar 23g e dissolver em 1l de água.
Autoclavar a 121°C por 15min.

MEIO VOGES-PROSKAUER MODIFICADO (pH 6,5)

Proteose peptona	7g
Cloreto de Sódio	5g
Dextrose	5g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO

Dissolver os ingredientes e ajustar o pH se necessário. Dispensar 5ml por tubo 16x150mm.
Autoclavar a 121°C por 10min

TIROSINA AGAR - (pH 6,8)

Meio Base – Nutriente Agar

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Agar	15g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO DO MEIO BASE

Dissolver ingredientes. Dispensar 100ml em frasco de 170ml.

Autoclavar a 121°C por 15min e resfriar a 48°C.

PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE TIROSINA

Suspender 0,5g de L-tirosina em 10ml de água. Dispensar em tubo 20x150mm e agitar.

Autoclavar a 121°C por 15min.

PREPARAÇÃO DO MEIO

Adicionar 100ml base com a suspensão de tirosina e agitar.

Dispensar 3,5ml em tubos 13x100mm.

Inclinar e resfriar os tubos. (Evitar separação da tirosina)

CALDO LISOZIMA (pH 6,8)

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO DO MEIO BASE

Dissolver ingredientes. Dispensar 99ml em frasco de 170ml.

Autoclavar a 121°C por 15min. Resfriar a Temperatura ambiente.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LISOZIMA

Dissolver 0,1g de lisozima em 100ml de água destilada.

Esterilizar por filtração em membrana 0,45µm

Adicionar 1ml da solução em 99ml de NB e agitar.

Dispensar 2,5ml por tubo 13x100ml.

MEIO MOTILIDADE para *B. cereus* - (pH 7,4)

Trypticase	10g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	5g
Na ₂ HPO ₄	2,5g
Agar	3g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO

Dissolver ingredientes.

Dispensar 100ml em frasco de 170ml.

Autoclavar a 121°C por 15min.

Resfriar a 50°C.

Dispensar 2ml em tubo 13x100mm.

Estocar a temperatura ambiente por 2 dias antes do uso.

TRYPTICASE SOJA SANGUE DE CARNEIRO AGAR (pH 7,3)

Trypticase peptona	15g
Phytone peptona	5g
Cloreto de Sódio	5g
Agar	15g
Água destilada	1l

PREPARAÇÃO

Dissolver ingredientes.

Ferver por 1 min.

Autoclavar a 121°C por 15min.

Resfriar a 50°C.

Adicionar 5ml de sangue (com seringa de vidro estéril) a 100 ml de Agar 1,5% estéril.

Misturar ao meio.

Plaquarear.

BHI – INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO (pH 7,4)

Infusão de cérebro	12,5g
Infusão de coração	5g
Proteose	10g
Glicose	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato de sódio dibásico	2,5g
Ágar	15g
Água Destilada	1l

PREPARAÇÃO

Pesar 37g e dissolver em 1l de água.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

SOLUÇÃO DE FUSCHINA BÁSICA

Dissolver 0,5g de fuchsin básica em 20ml de etanol 95%.

Diluir em 100ml de água destilada.

REAGENTE ÁCIDO SULFANILICO

Ácido sulfanílico	1g
Ácido acético SN	125ml

REAGENTE α -NAFTOL

α -naftol	1g
Ácido acético SN	125ml

 α -NAFTOL

α -naftol	5g
Álcool absoluto	100ml

HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

Hidróxido de potássio

40g

Água destilada

100ml

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP