



DETERMINAÇÃO DO RISCO DA PRODUÇÃO DE CEREULIDE POR BACILLUS CEREUS EM MATÉRIAS PRIMAS DE FÓRMULAS INFANTIS

Manoela R. Godoy¹;

Anna J. Panzenhagen¹;

Carla K. Rushel¹;

Rosane C. Santos¹.

¹ Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha

23000432@liberato.com.br

Palavras-Chave: Segurança dos alimentos, toxina emética, análise cromatográfica.

Introdução

A contaminação alimentar por microrganismos representa um importante problema de saúde pública, desde a origem, alimentos podem estar contaminados por microrganismos como fungos e bactérias, colocando em risco a saúde e a segurança microbiológica. Entre a população afetada, destaca-se os bebês que são particularmente vulneráveis a infecções transmitidas por alimentos devido ao seu sistema imunológico e metabólico ainda em desenvolvimento (OMS, 2024).

A ANVISA determinou, em janeiro de 2026, a proibição de comercialização de alguns lotes de fórmulas infantis produzidas pela empresa Nestlé. O motivo, foi o risco de contaminação por cereulide, uma toxina produzida pela bactéria *Bacillus cereus*. Segundo a empresa, a presença da substância foi identificada em um ingrediente usado na fórmula (ANVISA, 2026).

Bacillus cereus pode ser encontrado no solo, na água e em diversas matrizes alimentares incluindo cereais, arroz, leite, vegetais, frutas e bebidas. Além disso, a bactéria demonstra forte resistência a condições extremas devido à sua produção de esporos que podem superar essas dificuldades, em particular ao calor, congelamentos, dessecação e radiação UV (YANG et al., 2023).

A cereulide é uma toxina associada a surtos de intoxicação alimentar do tipo emética e diarreica, extremamente termoestável, ou seja, tem baixa probabilidade de ser inativada pelo processamento dos alimentos. A forma diarreica é tem um período de início de 8 a 16 horas, enquanto a emética começa a demonstrar sinais de 0 a 5 horas. Ela é normalmente desenvolvida em alimentos armazenados incorretamente, devido ao seu crescimento em uma ampla faixa de temperatura, variando entre 10 e 48°C e é improvável de ser inativada no processamento visto que é estável sob tratamento térmico a 121°C. Também é estável a uma ampla variação de pH (2-10). Assim a toxina cereulide representa um risco para os consumidores (YANG et al., 2023).

A cromatografia de camada delgada (CCD) é um procedimento de adsorção. Consiste em uma fase estacionária fixada numa placa e uma fase móvel, composta por um solvente, chamado eluente (Brondani, 2019). É uma técnica relativamente simples, barata e importante



para separação rápida e análise qualitativa ou quantitativa de pequenas quantidades de material (UFJF, 2018).

Nesse contexto, surge o problema de identificar quais matérias primas apresentam maior associação com o crescimento de *Bacillus cereus* e da toxina cereulide e se o perfil cromatográfico dessas matérias-primas de fórmulas infantis pode ser utilizado como indicador químico de risco para o crescimento da bactéria e possível formação da toxina. Parte-se da hipótese de que o crescimento bacteriano nessas matérias-primas promove alterações em seu perfil químico, resultando na formação de metabólitos detectáveis por cromatografia em camada delgada, os quais podem ser empregados como indicadores de risco microbiológico.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o risco da produção de cereulide por *Bacillus cereus* em matérias-primas utilizadas na fabricação de fórmulas infantis por meio de cromatografia em camada delgada.

Material e Métodos

O medicamento Biovicerin, cultura viva de *Bacillus cereus* contendo 1×10^6 endósporos por mililitro, foi utilizado neste estudo. As amostras de leite em pó e farinha de arroz foram submetidas à determinação de pH por meio de pHmetro e à caracterização de umidade com devido ajuste a fim de fornecer condições semelhantes conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Com o intuito de simular uma contaminação acidental, 500 μL de suspensão padrão foram adicionados em 4,5 g de cada amostra em tubo Falcon e homogeneizado em vórtex, resultando em concentração aproximada de $1,1 \times 10^5$ UFC/g. As culturas foram incubadas, juntamente com o controle negativo que não contém o medicamento Biovicerin, em condições favoráveis e não favoráveis ao crescimento, a 35°C por 24 horas e a 4°C por 7 dias respectivamente (JAY, 2005).

Para o meio de cultivo, foi utilizado o Ágar seletivo para *Cereus* segundo Mossel, composto por peptona de carne, extrato de carne, manitol, NaCl, vermelho de fenol, ágar-ágar e água deionizada, seguido pela adição de emulsão de gema de ovo após a esterilização. O *B. cereus* é manitol negativo, apresentando coloração avermelhada, e é anunciado como colônias ásperas e secas com substrato rosa, circundadas por um anel de precipitado branco, devido a ser lecitinase positivo (MERCK, 1994). As amostras foram diluídas em 45 mL de solução salina 0,85% em ambiente asséptico para realizar a inoculação. Para esta ser efetuada, foram inseridos 100 μL no centro da placa de Petri contendo o meio de cultivo e realizada a semeadura por espalhamento em superfície com o auxílio de alça de Drigalski esterilizada (SANDERS, 2012).

Houve a coleta da biomassa das placas e extração com metanol, realizada por meio da adição de 1 mL de metanol, homogeneização em vórtex e centrifugação durante 10 minutos a 5000 RPM. Posteriormente, ocorreu a realização da concentração por evaporação do metanol, a fim de aumentar a sensibilidade da detecção cromatográfica, em banho maria em aquecimento médio e adição de 50 μL de diclorometano, com agitação posterior (CUI et al., 2016).

A cromatografia por camada delgada foi constituída pela fase estacionária de placa de sílica gel e pela fase móvel formada por diclorometano e metanol 95:05. Com o auxílio de uma micropipeta, foram aplicados 10 μL das amostras na linha de aplicação na fase estacionária,



previamente ativada, e introduzidas no recipiente fechado contendo a fase móvel, ocorrendo eluição até cerca de 0,02 m da extremidade superior. A fase móvel arrastou mais os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos compostos mais adsorvidos. Após a secagem da placa, foi adicionado a um recipiente fechado contendo cristais de iodo, evidenciando manchas marrons devido a complexação do iodo (CASS; DEGANI; VIEIRA, 1998).

Resultados e Discussão

A caracterização físico-química das matérias-primas selecionadas, realizadas inicialmente, revelaram distinção nos teores de umidade e nos valores de pH. Os valores de pH determinados para a farinha de arroz e leite em pó foram 6,20 e 6,62, respectivamente. Tais valores se enquadram na faixa de pH ótimo, entre 6,0 e 7,0, para o crescimento de *Bacillus cereus* (MPI, 2015). Enquanto em relação ao teor de umidade, os valores para farinha e leite em pó foram $10,160 \pm 0,130\%$ e $2,896 \pm 0,191\%$, respectivamente. A fim de proporcionar condições semelhantes para os testes, reduzindo a influência da umidade de cada matriz, o teor de umidade do leite em pó foi ajustado, utilizando o valor determinado pela farinha como base, resultando na **tabela 1**.

Tabela 1 - Caracterização inicial.

Matéria-prima	Umidade inicial (%)	pH	Umidade utilizada no ensaio
Farinha de arroz	$10,160 \pm 0,130$	6,20	$\approx 10,16\%$
Leite em pó	$2,896 \pm 0,191$	6,62	$\approx 10,16\%$

As amostras foram padronizadas quanto ao teor de umidade, que representa a quantidade total de água contida em um alimento. Entretanto, não corresponde diretamente à atividade de água (A_w), que representa a disponibilidade de água para o crescimento microbiano, onde quanto maior a A_w , mais rapidamente os microrganismos podem se multiplicar (CUNHA, 2016). Dessa forma, mesmo apresentando teores de umidade semelhantes, podem apresentar diferentes valores de atividade de água devido a sua composição.

Em relação ao crescimento microbiológico, foram observadas o crescimento de colônias de microrganismos manitol negativos, devido a coloração avermelhada, nas amostras com adição dos endósporos de *Bacillus cereus* e nas amostras de teste negativo somente com as matrizes (brancos). As colônias desenvolvidas apresentaram características morfológicas semelhantes às observadas para *Bacillus cereus* por serem visualizadas colônias ásperas e secas



com substrato rosa e com aparência opaca. As condições e resultados foram reunidos na **tabela 2** e **tabela 3**.

Tabela 2 - Análise do leite em pó.

Leite em pó	Adição de endósporo bacteriano	Temperatura de incubação	Crescimento microbiano
1	Sem	4°C	Positivo
2	Com	4°C	Positivo
3	Sem	35°C	Positivo
4	Com	35°C	Positivo

Tabela 3 - Análise da Farinha de arroz.

Farinha de arroz	Adição de endósporo bacteriano	Temperatura de incubação	Crescimento microbiano
1	Sem	4°C	Positivo
2	Com	4°C	Positivo
3	Sem	35°C	Positivo
4	Com	35°C	Positivo

A presença dessas colônias e de suas morfologias nos quatro controles representa um alto indício da presença prévia de microrganismos do grupo *Bacillus cereus* nas matérias-primas selecionadas para o estudo.

Em relação aos extratos, obtidos após os processos realizados descritos na metodologia, foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD). Foram identificadas zonas de separação detectáveis por sublimação do iodo nos quatro controles dos extratos de farinha de arroz e de leite em pó. Na cromatografia da farinha de arroz, foram observadas duas regiões reveladas com a sublimação do iodo, uma próxima a linha final de eluição, compostos mais apolares, e outra na região de aplicação dos extratos, compostos mais polares. Enquanto no leite em pó, também foram observadas a presença de compostos na parte superior, porém de forma mais espalhada, e próximo ao ponto de origem. Os valores obtidos foram reunidos na **tabela 4**.



Tabela 4 – Fatores de retenção obtidos na cromatografia.

	Fator de retenção (apolares)	Fator de retenção (polares)
Leite em pó	0,92	0,02
Farinha de arroz	0,91	0,03

Dessa forma, as cromatografias apresentaram semelhanças observáveis entre ambas as matrizes, indicando comportamentos cromatográficos parecidos dos componentes presentes nos extratos. Entretanto, não é possível vincular diretamente, apenas com os resultados atuais, as regiões observadas nas placas à cereulide. Portanto, nesta etapa, a análise pelo método de cromatografia em camada delgada foi considerada como uma avaliação preliminar da composição dos extratos.

Conclusões

Os resultados preliminares demonstraram que a farinha de arroz e o leite em pó apresentaram características físico-químicas iniciais distintas, principalmente em relação ao teor de umidade. A padronização desse parâmetro permitiu avaliar as matrizes sob condições de umidade semelhantes, enquanto os valores de pH de ambas permaneceram em uma faixa compatível com o desenvolvimento de *Bacillus cereus*.

O crescimento microbiano foi observado em todas as condições avaliadas, incluindo os ensaios sem adição experimental de endósporos. A presença de colônias com características morfológicas semelhantes às descritas para o grupo *B. cereus* nos controles sugere presença prévia desses microrganismos nas matérias-primas.

A análise dos extratos por cromatografia em camada delgada permitiu observar zonas de separação semelhantes entre os perfis cromatográficos da farinha de arroz e do leite em pó. Os valores de fator de retenção (R_f) calculados a partir da razão entre a distância percorrida por cada zona e a distância percorrida pela fase móvel indicam migração de compostos semelhantes entre as amostras. Entretanto, os sinais obtidos não permitem confirmar a presença de cereulide, sendo necessária uma técnica analítica confirmatória para determinar a identidade dos compostos detectados.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram a viabilidade da abordagem experimental para avaliação preliminar do comportamento microbiológico e cromatográfico das matérias-primas, porém é necessária continuidade das análises para confirmação da presença de *B. cereus* e identificação dos compostos observados por CCD.

Agradecimentos

Agradecemos aos nossos pais e irmãos pelo apoio, às orientadoras Carla e Rosane pelo incentivo na pesquisa, e ao pequeno Joaquim por ser a inspiração desse estudo.

Referências



AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Proibida venda de fórmula infantil com risco de contaminação por toxina.** Brasília, 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2026/proibida-venda-de-formula-infantil-com-risco-de-contaminacao-por-toxina>. Acesso em: 16 mar. 2026.

BRONDANI, Patrícia Bulegon. **Cromatografia de camada delgada.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2019. Disponível em: <https://patyqmc.paginas.ufsc.br/files/2019/07/Cromatografia-de-Camada-Delgada.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2026.

CUI, Yifang et al. Evaluation of the toxicity and toxicokinetics of cereulide from an emetic *Bacillus cereus* strain of milk origin. **Toxins**, v. 8, n. 6, p. 156, 2016. DOI: 10.3390/toxins8060156.

CUNHA, H. V. F. A diferença entre atividade de água (Aw) e o teor de umidade nos alimentos. **Food Safety Brazil**, 2016. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/diferenca-entre-atividade-de-agua-aw-e-o-teor-de-umidade-nos-alimentos/>. Acesso em: 28 jul. 2026.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, maio 1998. Disponível em: <https://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07>. Acesso em: 17 mar. 2026.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Versão digital. Disponível em: ial.sp.gov.br. Acesso em: 29 jul. 2026.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 510-511.

MERCK. **Manual de Medios de Cultivo.** 1994. p. 153-154

MINISTRY FOR PRIMARY INDUSTRIES (MPI). **Bacillus cereus** - Microbial Pathogen Data Sheet. 2015. Disponível em: <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/21545-Bacillus-cereus-Microbial-Pathogen-Data-Sheet>. Acesso em 21 de jul. de 2026.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 3064, 2012. DOI: 10.3791/3064. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4846335/>. Acesso em: 20 mar. 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF). **Laboratório de fundamentos de química: aula nº 5 – método para separação de misturas (cromatografia).** Juiz de Fora: UFJF, 2018. Disponível em: <https://www2.ufjf.br/quimica/files/2018/03/Aula-5-Laborat%C3%B3rio-de-Fundamentos-de-Qu%C3%ADmica.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 20 mar. 2026.

YANG, Shuo et al. Cereulide and emetic *Bacillus cereus*: characterizations, impacts and public precautions. **Foods**, Basel, v. 12, n. 4, p. 833, 2023. DOI: 10.3390/foods12040833. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/4/833>. Acesso em: 23 mar. 2026.