

ORGANIZADOR:  
Luis Guillermo Ramírez Mérida

# Microbiologia

perspectivas em saúde e alimentação



ORGANIZADOR:

Luis Guillermo Ramírez Mérida

# Microbiologia

perspectivas em saúde e alimentação

Canoas  
**2023**



## Microbiologia: perspectivas em saúde e alimentação

© 2023 Mérida Publishers

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9>

### Organizador

Luis Guillermo Ramírez Mérida

### Adaptação da capa e desenho gráfico

Luis Miguel Guzmán

### Foto da capa e contracapa

Elaborado em DALL-E com IA



Canoas - RS - Brasil

[contact@meridapublishers.com](mailto:contact@meridapublishers.com)

[www.meridapublishers.com](http://www.meridapublishers.com)

Todos os direitos autorais pertencem a Mérida Publishers. A reprodução total ou parcial dos trabalhos publicados, é permitida desde que sejam atribuídos créditos aos autores.



#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

M626 Microbiologia: perspectivas em saúde e alimentação [livro eletrônico]  
/ Organizador Luis Guillermo Ramírez Mérida. – Canoas, RS:  
Mérida Publishers, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-84548-16-9

1. Microbiologia. 2. Alimentos. 3. Saúde pública. I. Mérida, Luis Guillermo Ramírez.

CDD 579

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

## **Apresentação**

Este livro busca compilar da forma mais completa revisões e trabalhos experimentais focados em diferentes áreas da microbiologia aplicada, a fim de atender uma variedade de pessoas interessadas no assunto.

A articulação e o sinergismo da microbiologia com outras áreas da ciência potencializam a sua ação no sentido de fornecer ferramentas para melhorar, compreender e abordar de forma abrangente os processos biológicos, tecnológicos e de saúde, e assim responder a hipóteses e questões colocadas em diferentes contextos.

Prof. Dr. Luis G. Ramírez Mérida  
Professor Titular do Departamento de Biologia  
Faculdade Experimental de Ciência e Tecnologia (Facyt)  
Universidade de Carabobo (UC).  
Venezuela

## **Autores**

### **Afonso Pelli**

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, código postal 38025-015, Uberaba-MG, Brasil.

### **Daniel Angelo Longhi**

Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua Dr. João Maximiano, 426, Vila Operária, 86900-000, Jandaia do Sul, Paraná, Brasil.

### **Flávia Melo Rodrigues**

Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética e Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil. Instituto Acadêmico de Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Estadual de Goiás, BR-153 3105, Fazenda Barreiro do Meio, 75132-903, Anápolis, GO, Brasil.

### **Liris Kindlein**

Doutora em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 8834 - Porto Alegre, RS, CEP: 90540-000.

### **Márcia Alves de Medeiros Gorodicht**

Pós-doutoranda em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 8834 - Porto Alegre, RS, CEP: 90540-000.

### **Marcos Vinicius Sena de Oliveira**

Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil.

### **Maria das Graças Reis**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, código postal 38025-015, Uberaba – MG, Brasil.

**Maxelle Martins Teixeira**

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, código postal 38025-015, Uberaba – MG, Brasil.

**Mônica Voss**

Department of Drug Science and Technology, Università Degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria n 9, 10125, Turim, Itália.

**Renata Alves Soares**

Graduanda em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-010.

**Rodrigo Coelho Silva**

Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética, Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil.

**Salah Chaji**

Department of Drug Science and Technology, Università Degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria n 9, 10125, Turim, Itália.

**Sandra Kunde Schlesner**

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima n 1000, 97105-340, Santa Maria, Brasil.

**Vanessa Carolina Martins Prina**

Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua Dr. João Maximiano, 426, Vila Operária, 86900-000, Jandaia do Sul, Paraná, Brasil.

**Wania Clelia dos Reis Brito Paranaíba**

Docente do Programa de Graduação em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-010.

## Índice

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>Agentes patogênicos associados ao consumo de pescados: uma revisão</b>	
Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein	
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>33</b>
<b>Patógenos bacterianos causadores de doenças veiculadas por alimentos</b>	
Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein	
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>69</b>
<b>Modelagem matemática da inativação da microbiota natural do leite cru em diferentes condições não-isotérmicas</b>	
Vanessa Carolina Martins Prina, Daniel Angelo Longhi	
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>93</b>
<b>Antibióticos – do surgimento ao problema na Saúde Única</b>	
Renata Alves Soares, Wania Clelia dos Reis Brito Paranaíba	
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>106</b>
<b>Verificação dos padrões globais do conhecimento científico sobre a microbiologia forense</b>	
Marcos Vinicius Sena de Oliveira, Rodrigo Coelho Silva, Flávia Melo Rodrigues	
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>127</b>
<b>Métodos para detecção e caracterização de biofilmes</b>	
Mônica Voss, Sandra Kunde Schlesner, Salah Chaji	
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>159</b>
<b>Formigas Vetores Mecânicos de Microbiota em Ambiente Hospitalar</b>	
Maxelle Martins Teixeira, Afonso Pelli, Maria das Graças Reis	





---

## Agentes patogênicos associados ao consumo de pescados: uma revisão

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c1>

### Resumo

O presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais agentes patogênicos do pescado, bem como seus fatores determinantes para a contaminação nos peixes e demais frutos do mar até o consumidor final. Com os resultados desta pesquisa, foi possível contatar que as principais bactérias descritas associadas a doenças veiculadas ao pescado foram: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*. Os agentes parasitários foram *Diphyllobothrium spp* e *Anisakis spp*. Os agentes virais como norovírus, e os vírus da Hepatite A e E estão associados aos surtos. As biotoxinas marinhas também são importantes e classificam-se em 3 grupos: toxinas amnésicas (ASP), toxinas paralisantes (PSP) e toxinas Diarreicas (DSP). Também é importante a biointoxicação por Escombróide devido ao consumo de peixes contendo altos níveis de histamina. Com este estudo, pode-se concluir que o consumo de pescado contaminado pode representar riscos à saúde pública, sendo essencial a adoção de medidas para aumentar o conhecimento e conscientização da população sobre os riscos gerados ao consumir pescados e frutos do mar, principalmente crus ou insuficientemente cozidos, assim como seus respectivos métodos de prevenção e controle. Para reduzir consideravelmente as contaminações e garantir a inocuidade do pescado é imprescindível a implementação de Boas Práticas de Manejo (BPM) na produção/captura do pescado, juntamente com a implementação do APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) nas indústrias de processamento desde o barco até comercialização do pescado, associado à implantação das Boas Práticas de Manipulação dentro dos serviços de alimentação, como higiene dos manipuladores e devido acondicionamento das matérias-primas.

**Palavras-chave:** pescados, doenças veiculadas por alimentos, bactérias, parasitas, biotoxinas.

## 1. Introdução

O pescado é um dos alimentos mais comercializado no mundo. A produção mundial de pescado foi de aproximadamente 178,5 milhões de toneladas em 2018, tendo a pesca contribuído com 96,4 milhões de toneladas e a aquicultura com 82,1 milhões de toneladas (FAO, 2020).

A inclusão de pescados na dieta alimentar dos brasileiros vem aumentando nos últimos anos, pois o país tem seguido a tendência mundial de consumir alimentos mais saudáveis. O pescado está incluído no rol de alimentos mais saudáveis por ser uma carne rica em proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais. Além disso, apresenta baixo índice de gordura e elevados teores de ômega-3, os quais trazem benefícios à saúde humana (FAO, 2014).

Ainda que o seu consumo traga inúmeros benefícios para a saúde humana, o pescado é um alimento altamente perecível devido aos fatores microbiológicos; rápida instalação do rigor post-mortem; pH próximo a neutralidade; a liberação de muco; à alta quantidade de água nos tecidos; à frouxa constituição do tecido conjuntivo e à constituição dos tecidos ricos em proteínas, fosfolipídios e ácidos graxos poliinsaturados que servem de substrato para as bactérias (GONÇALVES, 2021). O pescado pode ser contaminado com o mais amplo e variado grupo de microrganismos, bem como por resíduos de produtos químicos, através de águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras. O pescado fresco, por sua vez, apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, a manipulação indevida e a não observância de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar o desenvolvimento dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2010).

Os contaminantes do pescado podem ser classificados da seguinte forma: microrganismos deteriorantes (ex.: *Pseudomonas*); microrganismos indicadores de higiene e/ou processamento (ex.: estafilococos coagulase-positiva, bolores e leveduras); microrganismos indicadores de contaminação fecal (ex. *Escherichia coli* e *Salmonella*); microrganismos de indicadores de manipulação inadequada (ex.: *Staphylococcus aureus*); microrganismos capazes de causar doenças veiculadas por alimentos (ex.: *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*, *Salmonella*

*spp*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* enteropatogênica); microrganismos capazes de produzir histamina, associados a peixes da família Scombridae (atum e bonito); e as toxinas biológicas (biotoxinas marinhas), entre elas, as toxinas paralisantes: tetrodo toxina, ciguatera (PSP), toxinas diarreicas (DSP), neurotoxinas (NSP) e toxinas amnésicas (ASP), todas relacionadas ao consumo de pescado intoxicado com dinoflageladas e/ou bactérias simbiotes (GONÇALVES, 2021).

O pescado como fonte de microrganismos patogênicos para humanos, pode ser veiculador de uma série de microrganismos patogênicos causadores de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), grande parte deles fruto da contaminação ambiental ou da própria manipulação com o alimento. Desde o momento da captura até a sua destinação final, o produto passa por inúmeras fases de processamento e transporte, podendo ocorrer a contaminação em qualquer etapa da cadeia produtiva (FERREIRA, 2014; GERMANO & GERMANO, 2015; SILVA, 2016).

Além disso, com a crescente popularização dos sushis, que envolvem o uso frequente de ingredientes (principalmente de origem animal) crus, houve também o aumento do número de surtos de DVA envolvendo essa preparação. Possivelmente, uma das razões do aumento do número desses surtos é a não utilização de práticas adequadas de manipulação durante a preparação dos sushis, o controle de fornecedores de matéria prima de boa procedência, como também à escassez de parâmetros mais rigorosos estabelecidos em relação a segurança dos sushis (TONDO e BARTZ, 2019).

As DVAs constituem um dos problemas de saúde pública mais frequentes no mundo contemporâneo. No Brasil, existe uma falha nos sistemas de notificação, o que prejudica a análise de ocorrência no pescado e demais alimentos, evidenciando o problema mundial de subnotificação. Estes surtos, geralmente, são os que envolvem um grande número de pessoas ou os que apresentam sintomas mais prolongados ou severos.

Dados de publicação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), durante o período de 1983-2010, houve um total de 23 surtos, 312 casos e 3 óbitos por DVAs. Os principais agentes etiológicos descritos nessas ocorrências foram: as biotoxinas marinhas (8 surtos, 179 casos e 3 óbitos), seguidas pelas

parasitoses (13 surtos e 117 casos) e por bactérias patogênicas (1 surto e 16 casos). Analisando dados de 2000 a 2017, registrou um total de 12.503 surtos de DVA. Dos casos confirmados causados pela ingestão de pescado totalizaram 105 casos. Já os últimos dados publicados dos anos de 2012-2021, ocorreram 6.347 surtos e 104.839 doentes por doenças transmitidas por alimentos (DVAs), e 1,9 % destes casos estavam relacionados ao pescado (GONÇALVES, 2021; SVS, 2021).

Em virtude dessas mudanças nos costumes e hábitos alimentares que contribuem para o aumento da produção de pescados e, conseqüentemente, da exposição dos consumidores aos riscos de saúde, o trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os agentes patogênicos do pescado causadores de DVAs de interesse à saúde pública.

## **2. Metodologia**

O estudo é descritivo e de natureza qualitativa, utiliza como fonte principalmente publicações de organizações internacionais de pesquisa, como Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA – Food and Drug Administration). Além disso, outras fontes são livros sobre Ciência e Tecnologia, Inovação e Legislação do Pescado, Higiene Alimentar e Microbiologia de alimentos, além de artigos científicos que utilizam bases de dados PubMed, Google Acadêmico e SciELO.

## **3. Revisão de Literatura**

### **3.1. Bactérias associadas às doenças veiculadas ao pescado**

Diferentes estudos relataram a ocorrência de surtos de origem alimentar envolvendo o pescado, sendo os principais agentes causadores identificados *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* (GONÇALVES, 2021).

### 3.1.1. *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus*

Segundo dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da saúde, no Brasil, nos últimos 10 anos (2012 - 2021) ocorreram 6.347 surtos e 104.839 doentes por doenças transmitidas por alimentos (DVAs), estando a *Escherichia coli*, em primeiro lugar dentre os principais agentes etiológicos identificados (SVS, 2021).

A *E. coli*, presente nas fezes pode atingir peixes e frutos do mar a partir de esgoto, resíduos agrícolas e água não potável depositados no ambiente aquático, e também a partir de manipuladores infectados no processamento dos produtos (FORSYTHE, 2010). Teophilo et al. (2002) relataram a identificação de *E. coli* em peixes e camarões comercializados em Fortaleza-CE, associando-a a condições sanitárias precárias nas áreas de pesca. A FAO (2014), cita que embora a *E. coli* seja uma bactéria mesofílica, com crescimento propício em temperatura entre 35°C a 40°C, algumas cepas patogênicas podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 7°C e tão altas quanto 46°C.

Segundo Kumar et al. (2003), o habitat natural da *Salmonella spp.* é no trato gastrointestinal de mamíferos, aves e répteis, e pode alcançar os ambientes aquáticos através da contaminação fecal, tornando-se um problema de saúde pública associado a peixes e frutos do mar. Sua multiplicação acontece em temperaturas entre 5°C e 38°C, e, por serem consideradas relativamente termossensíveis, podem ser destruídas a temperatura de 60°C durante 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2010). Em 2006, Menezes et al. (2006) detectaram a presença de *Salmonella spp.* em 5 de 20 amostras de sushis e sashimis, preparados com salmão, camarão e atum na cidade de Fortaleza-CE, sendo o salmão o pescado mais contaminado. Segundo FAO (2010) a contaminação nos pescados pode ser proveniente do ambiente aquático, expondo os peixes a alimentos infectados, ou da manipulação no processamento de frutos do mar.

Já em relação *Staphylococcus aureus*, é a segunda causa mais comum de surtos de DTAs no país (SVS, 2021), com aproximadamente 12,9 % dos surtos. Para que ocorra a contaminação da bactéria o alimento necessita estar em temperatura ambiente. Em consequência dessa contaminação, há a produção de toxinas que são estáveis e sobrevivem ao cozimento I (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; FAO, 2014). Germano & Germano (2015), sugerem que as

peessoas que trabalham diretamente com pescado frequentemente, sobretudo manipuladores, devem utilizar luvas resistentes à perfuração por espinhas e/ao corte por fragmentos de cascas ou conchas para sua proteção, a fim de evitar contaminações dos alimentos.

A preparação do sushi envolve intensa manipulação e uso frequente de ingredientes crus, aumentando o risco de contaminação microbiana e, possivelmente, a ocorrência de DVAs. Como agravante, buffets de alimentos possuem diversos riscos para a segurança dos alimentos, principalmente a falta de controle de tempo e temperatura no balcão de distribuição. Abusos deste binômio podem ocasionar a multiplicação de bactérias formadoras de DVAs (ZANDONADI et al., 2007). No entanto, a utilização de Boas Práticas de Higiene (BPH) e medidas de controle adequadas durante o processamento, pode prover uma maior segurança aos sushis.

No Brasil, de acordo com a legislação vigente, em âmbito nacional, inexistente uma lei que cite em específico sobre estabelecimentos comercializantes de sushi. No estado do Rio Grande do Sul, encontra-se a Portaria da SMS Nº 1109 de 23/08/2016 que aprova as exigências mínimas para produção, preparo e comercialização de sushis e sashimis no município de Porto Alegre, onde alguns itens são citados referentes à segurança dos sushis, como, por exemplo, a obrigatoriedade do congelamento de peixes oriundos de captura de alto mar, o armazenamento refrigerado e não congelado do pescado oriundo de cativeiro, o controle do pH do arroz, o tempo de utilização do arroz já preparado, a temperatura de armazenamento dos peixes e as boas práticas de manipulação. Entretanto, a legislação não cita parâmetros de tempo e temperatura específicos para os sushis e os sashimis em nível de distribuição em buffets. Desta forma, para garantir a segurança microbiológica deste tipo produto, nesses locais, é de fundamental importância controlar as boas práticas desde o recebimento da matéria-prima até o processamento e, sobretudo, controlar o binômio tempo e temperatura no balcão de distribuição.

A legislação brasileira vigente (RDC 724/2022 IN 161/ 2022) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece padrões para algumas bactérias (*Escherichia coli*, estafilococcus coagulase-positivos, *salmonella sp.* em

25 g) que estão relacionados à ocorrência de pescado; e estabelece ainda limites de toxina/metabólito (histamina) para pescado em natureza e processado.

### 3.1.2. *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*

Os vibrios tem sido associados a uma variedade de peixes e crustáceos, como moluscos, camarões, lagostas, vieiras e caranguejos. A transmissão de DVA se dá principalmente do consumo desses frutos do mar crus, malcozidos ou preparados em más condições de higiene. As ostras, visto que são habitualmente ingeridas cruas, exercem um papel importante na transmissão em virtude de serem acumuladores biológicos (FAO/WHO, 2002; FAO, 2014).

O *Vibrio parahaemolyticus* concentra-se no intestino de moluscos bivalves alimentícios, como ostras, moluscos e mexilhões, onde tem capacidade de se multiplicar (FAO/WHO, 2011a). No inverno, as bactérias de *V. parahaemolyticus* tendem a se abrigar no fundo do mar e no verão, por meio da ressuspensão, os microrganismos ascendem à superfície d'água incorporando-se na cadeia alimentar de peixes e outros pescados (FAO/WHO, 2011; GERMANO & GERMANO, 2015). Pereira et al. (2004) isolaram 141 cepas de *V. parahaemolyticus* em 50 amostras de ostras e mexilhões nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro nos anos de 1997 e 1998.

O *Vibrio cholerae* é o agente causador da cólera, e seus sorogrupos O1 e O139 são os responsáveis pelas epidemias. A cólera é uma doença exclusivamente humana e a sua principal fonte são as fezes de pessoas infectadas com a bactéria. Diferentemente de *V. parahaemolyticus*, o *Vibrio cholerae* não vive em ambientes aquáticos. Algumas ocorrências dessa doença originaram-se da ingestão de água contaminada com despejos, porém, os alimentos contaminados são a via de transmissão primária da maioria dos surtos. O envolvimento dos moluscos bivalves está relacionado aos seus habitats contaminados e por serem filtradores e bioacumuladores, acumulam a bactéria em seus intestinos. O *V. cholerae* pode ser isolado em águas temperadas, subtropicais ou tropicais, em qualquer região do globo, porém, nos meses mais quentes do ano. Apesar da presença desse agente ser mais comum em ostras e mexilhões que em outros pescados, nem todos os surtos da doença são

causados pelo consumo desses frutos do mar. Estudos demonstram que o *V. cholerae* está diretamente relacionada às más condições de saneamento ambiental, como falta de tratamento de água e esgoto (FAO/WHO, 2011b; FORSYTHE, 2010; GERMANO & GERMANO, 2015).

### 3.2. Agentes parasitários

Os parasitas no estágio larval, consumidos em frutos do mar crus ou malcozidos, podem representar um risco aos consumidores. Entre os parasitas de maior preocupação para os consumidores de frutos do mar estão: os cestódeos (*Diphyllobothrium spp.*), nematódeos ou lombrigas (*Anisakis spp.* e *Pseudoterranova spp.*) e os trematódeos (*Phagicola longa*) (GONÇALVES, 2021).

#### 3.2.1. Cestódeos

Infecções por *Diphyllobothrium spp.*, também conhecido como a tênia do peixe, causam a difilobotriose. Esses agentes são os mais importantes cestódeos adquiridos por seres humanos pelo consumo de peixes de água doce ou salgada, crus ou malcozidos e defumados por processo caseiro, contendo as larvas do parasita (FAO, 2014).

As tênias do gênero *Diphyllobothrium* apresentam ciclo de vida envolvendo vários hospedeiros. Na sua forma adulta, o parasita vive no intestino delgado dos hospedeiros definitivos, como homem, cães, gatos e outros animais silvestres. Seus ovos são liberados nas fezes dos hospedeiros definitivos, e quando em contato com a água embrionam. Para não perder sua infectividade, necessitam ser ingeridos pelo primeiro hospedeiro, como crustáceos microscópicos. A partir dessa fase, os embriões ingeridos pelos crustáceos transformam-se em larvas, entrando na cadeia alimentar de pequenos peixes, que por sua vez são predados por outros peixes maiores, como o salmão e a truta, e consecutivamente, ser ingeridas pelo homem. A maioria das pessoas infectadas por essa tênia não apresenta sintomas, o que permite ao parasita desenvolver-se ao longo dos anos, atingindo mais de 10 metros de comprimento (FAO, 2014; GERMANO & GERMANO, 2015).



No Brasil, já foram registrados casos de infecção humana por cestóides pertencentes ao gênero *Diphyllobothrium*, principalmente *D. Latum*, cuja principal via de transmissão foi a ingestão de pescado cru (sushi e sashimi), malcozido, defumado ou frito. Os casos foram registrados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Sul e Paraíba, tendo como principal responsável o salmão importado do Chile (GONÇALVES, 2021; DDTHA, 2008).

### 3.2.2. Trematódeos

Os trematódeos são animais caracterizados pelo seu ciclo onde o ovo dá origem a uma larva que atinge o seu hospedeiro intermediário obrigatório, os moluscos, abandonando-o ativamente a procura de um segundo hospedeiro intermediário, que pode ser outro molusco, um girino ou um peixe (TRAVASSOS, 1950). Em caso de atingirem os peixes, o local a se fixarem é principalmente nos músculos. Podem ser ingeridos pelo hospedeiro definitivo, como cães, gatos, porcos e humanos, migrando para o sistema intestinal ou hepático, expelindo seus ovos por meio das fezes ou da urina. O ciclo continua a partir da falta de higiene e tratamento de esgoto, contaminando a água, ou em casos de utilização de fertilizantes com fezes de animais (TRAVASSOS, 1950; FAO, 2014).

A fagicolose é uma parasitose adquirida pelo consumo de peixes parasitados por *Phagicola longa*. Os peixes associados a transmissão da doença são pertencentes à família dos Mugilidae, como tainhas (*Mugil spp.*), paratis (*Mugil curema*) e paratis-pema (*Mugil gaimardianus*). Esses peixes são encontrados em águas tropicais e subtropicais, em especial nas regiões sul e sudestes do Brasil, onde se encontram os grandes cardumes.

No Brasil, um estudo com tainhas pescadas no litoral do Rio de Janeiro relatou 89% de prevalência do parasita. Na Baixada Santista, outro estudo com tainhas coletadas pelo Serviço de Vigilância Municipal e analisadas na unidade Laboratorial de Referência de Tecnologia do Pescado de Santos-SP, revelou, igualmente, nos fragmentos de vísceras, fígado e baço, cistos de metacercária do parasita em 100% das amostras. Nas regiões sul e sudeste, foi constatada a presença de *P. longa* em 100% das amostras de musculatura. A resistência da *P. longa* ao frio e ao calor é muito preocupante para a saúde pública e torna os

peixes da família Mugilidae uma fonte de perigo para o homem, não apenas se consumidos crus, mas também para o consumo de pratos à base de peixe cozido superficialmente (GERMANO & GERMANO, 2015).

### 3.2.3. Nematódeos

A doença mais importante em humanos relacionado aos nematódeos é a Anisakiase. A *Anisakis spp.* é a espécie mais associada e essa doença, seguida pela *Pseudoterranova spp.* O primeiro caso de infestação de larvas de *Anisakis simplex* foi diagnosticado em 1955. No Japão, foram relatados mil casos de *A. simplex* no ano de 1990 (GONÇALVES, 2021).

Os seres humanos adquirem a larva comendo arenque (*Clupea harengus*) cru, malcozido, mal salgado, em conserva ou defumado; bacalhau (*Gadus spp.*); cavala (*Scomber spp.*); salmão (*Oncorhynchus spp.*) ou lula (*Todarodes spp.*). Os hospedeiros definitivos, mamíferos marinhos, como baleias, golfinhos, focas e leões marinhos, abrigam os parasitas adultos no estômago e intestino delgado. Os ovos são eliminados nas fezes para o meio aquático, onde embrionam. Pequenos crustáceos exercem o papel de hospedeiros intercalados ao ingerirem a larvas, e esses crustáceos são importantes fonte de alimentação de lulas e peixes (ADAMS et al., 1997).

O homem torna-se hospedeiro acidental ao consumir pescados com as larvas fixadas nas vísceras ou nos músculos. No município de Ribeirão Preto-SP, entre os anos de 2001 e 2005, Prado & Capuano (2006) analisaram 11 amostras de bacalhau eviscerado seco e salgado. Do total de amostras, constataram 67% de presença do parasita *Anisakis spp.* fixados na carne.

De modo geral, tanto para os cestódeos, como nematódeos e trematódeos, o consumo de peixe cru, semicru ou parcialmente defumado é o principal responsável pela infecção do homem por larvas de parasitas. Prevenção maior diz respeito ao controle da contaminação ambiental, mediante a eliminação adequada de excretas, evitando dejetos em ambientes aquáticos. Um importante procedimento é a inspeção dos filés de pescado, no momento do preparo para detecção de larvas fixadas na carne. No caso das larvas dos *Anisakis spp.*, o procedimento para a sua eliminação é a cocção do pescado a

73°C, controlando para que o interior da carne permaneça nesta temperatura por 3 minutos. Para a eliminação de *Diphyllobothrium spp.* é possível garantir a inocuidade dos frutos do mar mediante tratamento prévio com gelo. O congelamento por no mínimo 7 dias a uma temperatura de -20°C ou por 15 horas a uma temperatura de -30°C é eficiente e inviabiliza as larvas presentes na musculatura dos peixes (GERMANO & GERMANO, 2015).

### **3.3. Agentes Virais**

#### **3.3.1. Norovírus**

O Norovírus é um dos principais agentes causadores de gastroenterite viral em todo o mundo, sendo responsável por muitos surtos de doenças transmitidas por alimentos. O consumo de pescados contaminados pelo Norovírus é uma das formas de propagação dessa infecção (GARCIA, et al., 2006).

Os norovírus são vírus RNA esféricos, não envelopados, pertencentes a família Caliviridae. São microrganismos ambientalmente resistentes que podem estar presentes em diversos locais, atingir pessoas de todas as idades. A infecção por norovírus é mais frequente nas épocas de frio, sendo que a transmissão via alimentos é mais comum em produtos marinhos, como as ostras e os mexilhões, além de água contaminada. O período de incubação do norovírus é de aproximadamente quarenta e oito horas e os sintomas mais frequentes envolvem diarreia, vômito, anorexia, dor abdominal e febre.

#### **3.3.2. Vírus da Hepatite A**

Vírus RNA de fita simples, pertence a família Picornaviridae, o qual tem distribuição mundial. A transmissão é pela via fecal-oral, sendo a água e os alimentos os principais veículos durante as epidemias. Entre os alimentos envolvidos, os moluscos bivalves merecem destaque, devido a possibilidade de cultivo em águas contaminadas, assim, o consumo de moluscos crus tem sido incriminado em casos de hepatite A, assim como saladas cruas (TAVARES, et al., 2005).

O período médio de incubação pode durar de 15 a 45 dias.

### 3.3.3. Vírus da Hepatite E

O vírus da Hepatite E, apesar de menos frequente, é causa uma doença transmitida geralmente pela água e por alimentos contaminados por dejetos humanos e de animais. A ingestão de mariscos crus ou mal-cozidos contaminados também é responsável pela transmissão (TAVARES, et al., 2005).

### 3.4. Biotoxinas marinhas

Intoxicações humanas, por toxinas de origem aquática, podem ocorrer tanto por contato primário, exposição ao aerossol, inalação ou ingestão, sendo as toxinas mais perigosas ou tóxicas aquelas produzidas por algumas espécies de microalgas (protistas), denominadas ficotoxinas (GONÇALVES, 2021).

As biotoxinas marinhas são definidas como sendo toxinas termoestáveis, provenientes de fitoplâncton produtor de toxinas, que no processo de filtração, são incorporadas pelos moluscos bivalves. Tais toxinas podem contaminar peixes e outros animais marinhos utilizados na alimentação humana (MAFRA et al., 2019). Os moluscos bivalves, por serem animais filtradores, ao se alimentarem em regiões com presença de toxinas, concentram-nas, tornando-se vetores para seres humanos (COSTA et al., 2017). Diversos surtos associados à ingestão das toxinas foram reportados em inúmeros países (FAO, 2004) e devido à ocorrência destes surtos, diversos programas de monitoramento foram implementados nos países com produção e consumo significativo de moluscos bivalves.

A Instrução Normativa Interministerial do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 07, de 08 de maio de 2012, estabelece os requisitos mínimos necessários para a garantia da qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento destes requisitos, institui o PNCMB (Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves). De acordo com o plano amostral estabelecido pelo PNCMB, cada área de cultivo é analisada quinzenalmente. São realizadas pelo menos duas coletas de 500 gramas de parte comestível de moluscos bivalves, embaladas separadamente, obtidas no mesmo dia e em dois pontos distintos de uma área

de cultivo e a partir do momento da coleta, o laboratório é responsável pelas análises tem até 72 horas (BRASIL, 2012). Quando um resultado de análise é maior ou igual ao limite de interdição a área é interditada para colheita, comercialização e consumo de mexilhões, ostras, vieiras e berbigões. Nesse caso, a área passa a ser monitorada intensivamente até obtenção de dois resultados negativos consecutivos, para então ocorrer a liberação para colheita, comercialização e consumo.

As principais biotoxinas marinhas monitoradas nos mais diversos países são classificadas em 3 grupos: toxinas amnésicas (ASP), toxinas paralisantes (PSP), toxinas Diarreicas (DSP)-toxinas lipofílicas (com os subgrupos do ácido okadáico e seus ésteres, azaspirácidos e yessotoxinas) (BRASIL, 2012).

#### **3.4.1. Biointoxicação toxinas amnésicas (ASP)**

O grupo de toxinas amnésicas (ASP) é representado pelo ácido domóico. Essas toxinas são produzidas principalmente pela diatomácea *Pseudo-nyctzschia spp* (BADEN et al., 1995) . Em humanos, os sintomas da ingestão de ASP consistem em desconforto gastrointestinal, confusão, desorientação, convulsões, perda permanente de memória, podendo culminar na morte do paciente nos casos severos (PERL et al., 1990). Em diversos países, assim como no Brasil, o limite regulatório de 20 mg DA g-1 de molusco bivalve tem sido adotado (BRASIL, 2012).

#### **3.4.2. Biointoxicação por Toxina Paralisante de Bivalve (PSP)**

A toxina PSP também pode ser chamada de saxitoxina, e está relacionada a mexilhões, mariscos, berbigões e vieiras (BARBIERI, 2010; FORSYTHE, 2010). Conhecida por ser “paralisante” devido os efeitos que provoca nos humanos que variam de um ligeiro formigamento ou dormência a uma paralisia respiratória completa (BARBIERI, 2010; FAO, 2004). A PSP pode ocorrer em moluscos bivalves que consomem dinoflagelados como *Gonyaulax catenella*, *Anabaena circinalis*, *Alexandrium tamarensis*, e *Pyrodinium bahamense* e o consumo destes animais pode provocar formigamento e dormência de lábios e língua, vertigem, náusea, vômito, e em casos mais graves paralisia respiratória,

podendo levar à morte (BRICELJ; SHUMWAY, 1998). O limite regulatório adotado no Brasil, assim como em outros países, é de 0,8 mg STX g<sup>-1</sup> de molusco bivalve (BRASIL, 2012). No Brasil, o registro mais antigo de intoxicações por seres humanos associados ao consumo de mexilhões ocorreu em Santa Catarina por volta de 1990 (BOUNDY et al., 2015).

O cozimento de moluscos contaminados por 5 minutos pode reduzir as concentrações de toxinas em aproximadamente 30%, e o cozimento por 20 minutos leva a uma redução de 40% (FAO, 2004).

### **3.4.3. Biointoxicação por Toxina Diarreica (DSP)**

A DSP pertence ao grupo das toxinas lipofílicas, estas toxinas são produzidas por diversos dinoflagelados dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum*. Os vetores mais importantes são os mitilídeos (mexilhões) e os pectinídeos (vieira). As ficotoxinas desse grupo acumulam na glândula digestiva (hepatopâncreas) dos moluscos e apresentam potente efeito de inibição das proteínas fosfatase, com inflamação das células do trato digestivo, causando diarreias. O ácido ocadaico e seus congêneres, além de estarem relacionados aos casos de doenças gastrointestinais, também estão sendo associados ao risco crônico de saúde aos consumidores, visto que diversos estudos têm demonstrado que exposições a baixas concentrações dessas ficotoxinas podem causar alterações de ordem molecular, celular, de expressão genética que podem promover o surgimento de tumores e até o desenvolvimento de câncer (BARBIERI, 2010).

No Brasil, a síndrome diarreica tem ocorrido com frequência em diferentes regiões e constituído o principal causador das interrupções de colheita e comercialização de moluscos em Santa Catarina, com consequências econômicas principalmente para produtores (GONÇALVES, 2021). Nos anos de 2008 e 2007 diversas localidades produtoras foram interditadas para colheita e comercialização de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina, sendo que no ano de 2007 houve 150 registros de pessoas intoxicadas pela ingestão de DSP (PROENÇA et al., 2007). Em 2014, a toxina diarreica foi responsável pela interdição da colheita de moluscos bivalves em todo o litoral de Santa Catarina,

devido a presença da toxina diarreica (DSP) em São Francisco do Sul e Porto Belo bem como pela presença de algas *Dynophysis* no município de Palhoça. A interdição de todos os locais de cultivo no litoral foi tomada como medida preventiva, tendo em vista que os resultados encontrados poderiam indicar uma contaminação generalizada no estado (CIDASC, 2014).

### 3.5. Microrganismos capazes de produzir histamina

A biointoxicação por Escombroide dá-se ao consumo de peixes contendo alto níveis de histamina (BARBIERI, 2010; CVA,2003). Originalmente, a doença foi denominada de “envenenamento por escombroide” devido à sua associação com peixes da família Scombridae, porém, outras famílias já estão relacionadas à intoxicação (FDA, 2011).

A intoxicação está associada, principalmente, ao consumo de atum (*Thunnus sp.*), cavala (*Scomber scombrus*), bonito (*Auxis thazard*) e o bonito listado (*Katsuwonus pelamis*). As estirpes bacterianas frequentemente associadas à presença de histamina em pescado são: *Morganella morganii*, *Klebsiela pneumoniae* e *Hafnia alvei* (GONÇALVES, 2021).

A histamina é formada na fase de *post-mortem* do pescado através da descarboxilação bacteriana do aminoácido L-histidina, um aminoácido livre facilmente convertido em histamina pela enzima histidina-descarboxilase quando as condições de manuseio e estocagem são inadequadas, favorecendo a multiplicação de micro-organismos que favoreçam sua atividade (CARMO et al., 2010). A histamina possui potencial alergênico, podendo intoxicar o ser humano e, em casos graves, levar à morte. Alguns surtos já foram registrados, nos EUA, em 1979-1980, mais de 200 pessoas ficaram doentes depois de consumir dourado importado congelado.

No Brasil o nível máximo de histamina é de 100 ppm no músculo, nas espécies pertencentes às famílias (Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryyphaenidae) (Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997,MAPA). Enquanto, a Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 da ANVISA, estabelece para (peixes, crustáceos, moluscos) e miúdos (ovas, moela, bexiga natatória) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados, que o limite máximo



de histaminas deve ser 100 mg/kg de tecido muscular, tomando como base uma amostra composta por 9 (nove) unidades amostrais e nenhuma unidade amostral pode apresentar resultado superior a 200 mg/kg.

A produção da toxina está relacionada a permanência destes peixes em temperatura ambiente por muito tempo, o que permite o crescimento de bactérias deteriorantes, que por sua vez produzem a enzima histidina descarboxilase que alteram a histidina em histamina. Alguns peixes têm níveis maiores de histidina que outros, por isso à associação de algumas espécies com a intoxicação (CVE, 2003).

As bactérias que estão associadas ao desenvolvimento de histamina estão naturalmente presentes nas guelras, nas superfícies externas e no intestino de peixes vivos de água salgada. Após a morte, os mecanismos de defesa dos peixes não inibem mais o crescimento bacteriano no tecido muscular, e as bactérias formadoras de histamina crescem resultando na produção da toxina. A evisceração e a remoção das brânquias podem reduzir, mas não eliminar essas bactérias (FDA, 2011).

O início da produção de histamina é decorrente do binômio tempo-temperatura do pescado, formada a partir de temperaturas superiores a 4,4°C. A manipulação do pescado fora das condições ideais de refrigeração permite que bactérias contaminantes consigam se multiplicar e promover a formação da histamina, pois em seu crescimento algumas delas produzem a enzima histidina-descarboxilase (RODRIGUES, 2007).

### **3.6. A toxina do peixe Baiacu**

Os peixes das famílias *Tetraodontidae* e *Diodontidae* são comumente denominados, no Brasil, de baiacus ou peixes-bola, no Japão de fugu e de *pufferfish* ou *blowfish* em comunidades de língua inglesa (OLIVEIRA, et al., 2003). Os baiacus têm como estratégia de defesa quando se sentem ameaçados, a capacidade de inflar seu corpo com a ingestão de ar ou água, mantendo sob pressão no estômago ou numa invaginação deste órgão, promovendo assim um aumentando de tamanho corporal que impede seus predadores de engoli-los (HADDAD JR, 2000).



Em algumas regiões litorâneas do Brasil, como na região Sudeste, mais especificamente no estado do Espírito Santo, o baiacu-arara (*Lagocephalus laevigatus*), família Tetraodontidae é um peixe muito popular no litoral sul do Espírito Santo (CARVALHO, 1945) e dentre as espécies consumidas a que apresenta maior valor comercial (COSTA et al., 2020). Os peixes da família Tetraodontidae são classificados como tóxicos pois, apresentam a tetrodotoxina (TTX), que é considerada a biotoxina marinha mais potente relacionada à casos de intoxicações alimentares (GOMES et al., 2011). A tetrodotoxina é a principal neurotoxina encontrada nos baiacus e pode ser isolada em maiores concentrações nas vísceras (especialmente gônadas, fígado e baço) e na pele do peixe (HADDAD JR, 2003), sendo que o envenenamento por baiacu ocorre diretamente pela ingestão toxina presente na pele e no trato digestivo dessas espécies.

O envenenamento por ingestão de baiacus é uma das mais graves formas de intoxicação por animais aquáticos, podendo após o consumo provocar a morte em alguns minutos (SANTANA NETO et al., 2010). Em um levantamento de dados de pacientes tratados em Centros Toxicológicos dos estados de Santa Catarina e Bahia, realizado entre os anos de 1984 e 2008, foram descritos 27 casos de intoxicações resultantes da ingestão de baiacu, sendo a maioria dos casos classificada como casos moderados (52%) e um terço como casos severos (33%), havendo o registro de dois óbitos (SILVA et al., 2010). No estado do Espírito Santo foram registrados 12 casos de intoxicação por baiacu de 2016 a 2018. Como a moqueca é um prato típico na culinária capixaba, o consumo de baiacu neste preparo foi o apontado em todos os casos de intoxicação registrados pelo Centro de Atendimento Toxicológico (Toxcen) da Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Espírito Santo (ALBUQUERQUE, 2018).

A comercialização do baiacu não é proibida, mas é necessário ter muito cuidado desde a pesca até o preparo do peixe, em função da presença da toxina. As espécies de baiacu usadas na alimentação devem ter o seu preparo feito por pessoa habilitada, para a retirada das partes tóxicas.

### 3.7. Doença de Haff (doença da “urina preta”)

A doença de Haff foi descrita pela primeira vez em 1924, na região litorânea de Königsberg Haff, costa do Mar Báltico. Esta síndrome é uma causa rara de rabdomiólise, síndrome provocada por lesão muscular que resulta na elevação dos níveis séricos de creatina fosfoquinase (CPK) e, em alguns casos, provoca escurecimento da coloração da urina, variando de avermelhada a marrom, característica que tornou a enfermidade popularmente conhecida como “doença da urina preta”.

O primeiro relato de um surto de doença de Haff no Brasil ocorreu em 2009, com o registro de casos da doença em Manaus/AM, entre junho e setembro de 2008. Os casos relatados envolviam, 24 horas antes do início dos sintomas, o consumo de peixes fritos ou assados como o pacu (*Mylossoma spp.*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (SANTOS et al., 2009).

A doença de Haff é considerada uma doença emergente, cuja importância tende a aumentar com o crescimento populacional, levando a um incremento do consumo de peixes, principalmente os de água doce oriundos da região amazônica (TOLESANI et al., 2013). Bandeira et al. (2017) registram a ocorrência de 67 casos de doença de Haff registradas em Salvador, Bahia, Brasil, onde os pacientes consumiram peixe “olho-de-boi” ou “arabaiana” (*Seriola sp.*) e badejo (*Mycteroperca sp.*). Um novo foi notificado durante a pandemia da Covid-19 (2020-2021). Durante o surto ocorrido entre 2020 e 2021, 16 pacientes com rabdomiólise confirmados por laboratório foram identificados (cinco necessitaram de cuidados intensivos e um foi a óbito).

O diagnóstico da doença de Haff baseia-se na suspeita clínica, história epidemiológica (ingestão de peixe nas 24 horas antes do início dos sintomas) e níveis elevados de marcadores de necrose muscular, particularmente mioglobina e creatinofosfoquinase. O diagnóstico diferencial deve incluir outras síndromes tóxicas nas quais ocorra rabdomiólise. Também é importante a notificação dos casos e a obtenção de amostras do alimento ingerido. São necessários estudos para identificar a toxina envolvida e o mecanismo que induz à sua expressão, já que as espécies de pescado citadas nos relatos clínicos são espécies comumente ingeridas por várias pessoas, sem que ocorra o desenvolvimento da

doença, em todos os locais em que os surtos são descritos ((TOLESANI et al., 2013).

#### 4. Considerações finais

O estudo destacou que através do consumo de pescado contaminado pode represnetar um risco à saúde pública. É importante aumentar o conhecimento e conscientização da população sobre os riscos gerados ao consumir pescados e frutos do mar, principalmente crus ou insuficientemente cozidos, assim como seus respectivos métodos de prevenção e controle. Os consumidores também devem ser informados sobre os possíveis casos intoxicação e transtornos causados pelo consumo de determinados tipos de pescado, bem como devem ser orientados sobre como proceder na ocorrência desses casos.

A implementação de Boas Práticas de Manejo (BPM) na produção/captura do pescado, juntamente com a de um plano de controle de qualidade, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nas indútrias de processamento desde o barco até comercialização do pescado, associada à implantação das Boas Práticas de Manipulação dentro dos serviços de alimentação, como hígine dos manipuladores e devido acondicionamento das matérias-primas, podem reduzir consideravelmente as contaminações e garantir a inocuidade do pescado.

#### 5. Referências

ADAMS, A.M. et al. **Parasites of fish and risk to public health**. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). v.6, p.652-660, 1997. <https://pdfs.semanticscholar.org/750d/ea6376172377f1540d1b59747563eeec5278.pdf>. (acessado 20 de fevereiro de 2021).

ALBUQUERQUE, M. ES. Registrou 8 casos de intoxicação por baiacu nos últimos três anos, diz Secretaria. **Portal G1**. 02 de janeiro de 2018. <https://g1.globo.com/es/espírito-santo/noticia/es-registrou-8-casos-de-intoxicacao-por-baiacu-nos-ultimos-tres-anos-diz-secretaria.ghtml>. (acessado 20 de fevereiro de 2021).

BADEN, D.G., FLEMING, L.E. e BEAN, J.A. **Marine toxins**. In: **Handbook of clinical neurology**, Vol. 21 – Intoxications of the nervous system, Part III. Editor: F.A. Wolf. Elsevier Science (B.V.), pp. 141-174, 1995.

BARBIERI, E. **O perigo das biotoxinas marinhas**. 2010. Artigo em Hypertexto. [http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/biotoxinas/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/biotoxinas/index.htm). (acesado 30 de abril 2022)

BRASIL, **Resolução RDC 724, de 01 de Julho de 2022**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. Órgão Emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL, **Instrução Normativa 161, de 01 de Julho de 2022**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Órgão Emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997**. Institui o Regulamento Tecnicode Identidade e Qualidade do Peixe Fresco (Inteiro ou Eviscerado). Diário Oficial da União, Brasília, 19 de maio de 1997.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). **Instrução Normativa Interministerial MPA/MAPA Nº 07, de 08 de maio de 2012**. DOU, n. 89, seção 1, p. 55, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2018. <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf> (acessado 07 de fevereiro de 2021).

BRICELJ, V. M.; SHUMWAY, S. E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: Occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. **Reviews in Fisheries Science**, v. 6, n. 4, p. 315–383, 1998.

CARMO, F.B.T.; MÁRSICO, E.T.; CLEMENTE, SCS; CARMO, R.P.; FREITAS, M.Q. Histamina em conservas de sardinha. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.174-180, 2010.

CARVALHO, V. A. O baiacu-arara e seu consumo público no Espírito Santo. **Revista do Museu Nacional**, dezembro, p. 27-28, 1945.

CIDASC. **Secretaria da Agricultura informa interdição preventiva das áreas de cultivo de ostras e mexilhões em Santa Catarina**. 22 de ago. de 2014. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2014/08/22/secretaria-da-agricultura-informainterdictaopreventiva-das-areas-de-cultivo-de-ostras-e-mexilhoes-em-santa-catarina>. Acessado em: 05/12/ 2021. <http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2019/08/06/cultivos-de-ostras-e-mexilhoes-de-bombinhas-57e-porto-belo-estao-interditados-devido-a-presenca-de-toxina-diarreica>. (acessado em 05 de dezembro de 2021).

CVA, Centro de Vigilância Epidemiológica. Informe Net. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos: Toxina Escombróide**. São Paulo: 2003. <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/toxinas/escombroide.pdf>. (acessado em 05 de abril de 2022).

COSTA, S. C.; FIM, C. S.; PONTES, F. M. C.; CARVALHO, G. D. **Os consumidores de baiacu sabem que este peixe tem uma toxina letal.** In: Anais do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia. Anais. Diamantina (MG) Online, 2020.  
<https://www.even3.com.br/anais/icobicet2020/258384-os-consumidores-de-baiacu-sabem-que-este-peixe-tem-uma-toxina-letal>. (acessado 02 de março de 2022).

COSTA, A. I. et al. **Intoxicação Alimentar por Ciguatera.** Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. v. 24, p. 30-32, 2017.  
[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0872-20671X2017000100008&lng=pt](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-20671X2017000100008&lng=pt). (acessado em 17 de março de 2021).

DDTHA. **Surtos de difilobotríase - Casos identificados por diagnóstico laboratorial por meio de exame de ovos e/ou estróbilo,** Estado de São Paulo – 2004 a 2008. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), Centro de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo: Tabela Excel.  
[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/ifnet08\\_Diphylo.xls](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/ifnet08_Diphylo.xls). (acessado em 12 de junho de 2021).

FAO. **The state of world sheries and aquaculture 2020.** Disponível em <http://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html>. Acessado em: 02 de junho de 2021.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Assessment and management of seafood safety and quality: current practices and emerging issues. Roma, Itália: 2014. <http://www.fao.org/3/a-10i3215e.pdf>. (acessado em 20 de fevereiro de 2022).

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** FAO Expert Workshop on the Application of Biosecurity Measures to Control Salmonella. Contamination in Sustainable Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Report No 937. India: 2010.  
<http://www.fao.org/docrep/013/i1547e/i1547e00.pdf>. (acessado em 11 de fevereiro de 2021).

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper No. 80. Roma: 2004.  
<http://www.fao.org/3/a-y5486e.pdf>. (acessado em 15 de fevereiro de 2021).

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.** Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and Technical report. Microbiological Risk Assessment Series No. 16. Roma, Itália. 2011a. <http://www.fao.org/3/a-i2225e.pdf>. (acessado em 25 de novembro de 2022).

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.** Risk Assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. FDA. Food and Drug Administration. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition. Estados Unidos da

América: 4.ed. 2011b.

<https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm251970.pdf>. (acessado em 05 de março de 2022).

FERREIRA, E. et al. **Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação.**

Arquivos do Instituto Biológico. v. 81, p.49-54, 2014.

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S180816572014000100049&lng=en&nrm=isso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180816572014000100049&lng=en&nrm=isso). (acessado em 30 de março de 2022).

FORSYTHE, S. **The Microbiology of Safe Food.** Estados Unidos da América: Wiley blackwell, 2010. 2.ed.

GARCIA, M. E. **Virus en águas de consumo.** Higiene y Sanidad Ambiental, Granada. 2006. v. 6, p. 173-189.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Manole, 2015. 5.ed.

GOMES, A. P.; DOS SANTOS, A.; AMBROSIO, C. E.; RIBEIRO, M. O.

Therapeutic use oftetrodotoxin in animals. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 4, p. 343-350, 2011.

GONÇALVES, A. A. 2021. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação.** Atheneu, São Paulo.

HADDAD JR, V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de diagnóstico e tratamento de acidentes.** Roca, São Paulo, 2003.

KUMAR H.S. et al. Detection of Salmonella spp. in tropical seafood by polymerase chainreaction. **International Journal Food Microbiology**. v.88, p.91-95, 2003.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001442?via%3Dihub>. (acessado 30 março de 2021).

MAFRA, L. L. et al. Multi-species okadaic acid contamination and human poisoning during a massive bloom of *Dinophysis acuminata* complex in southern Brazil. **Harmful Algae**, v. 89, p. 101662, 2019.

MENEZES, F.G.R. et al. **Salmonella e Staphylococcus coagulase positiva em sushis e sashimis comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará.** In: ANAIS DO II SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO - SIMCOPE, 2006, Anais eletrônicos. [http://www.simcope.com.br/II\\_Simcope/pdf/402.pdf](http://www.simcope.com.br/II_Simcope/pdf/402.pdf)> (acessado 10 de maio de 2021).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, jan. 2018.

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. (acessado 03 março de 2021).

PEREIRA, C.S. et al. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de ureas e isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e

- mexilhões (Perna perna) de banco natural. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.27 p.387390,2004.  
<http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n4/a19v24n4>.(acessado 12 novembro de 2021).
- PRADO, S. P.T.; CAPUANO, D.M. Relato de nematóides da família Anisakida e em bacalhau comercializado em Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v.36, p.580-581. 2006.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/1c31/9b0d268537e02982e5a967cb71ff7c15cb91.pdf> (acessado 09 novembro de 2021).
- PERL, T. M. et al. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 25, p. 1775–1780, 1990.
- PROENÇA, L. A. O. et al. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropica I Southwest Atlantic. **Harmful Algae News**, v. 33, p. 19–20, 2007.
- RODRIGUES, K.B. Histamina x Pescado: revisão bibliográfica.2007. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2007.
- OLIVEIRA, J. S.; PIRES JÚNIOR, O. R.; MORALES, R. A. V.; BLOCH JÚNIOR, C.; SCHWARTZ, C. A.; FREITAS, J. C. Toxicity of puffer fish - two species (*Lagocephalus laevigatus*, Linnaeus 1766 and *Sphoeroides spengleri*, Bloch 1785) from the southeastern Brazilian coast. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 76-88, 2003.
- SANTANA NETO, P. LIMA et al. Envenenamento fatal por baiacu (Tetrodontidae): relato de um caso em criança. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 1, p. 92-94, 2010.
- SANTOS, M. C.; ALBUQUERQUE, B. C.; PINTO, R. C.; AGUIAR, G. P.; LESCANO, A. G.; SANTOS, J. H. A.; ALECRIM, M. G. C. Outbreak of Haff disease in the Brazilian Amazon. **Rev Panam Salud Publica**, v. 26, n. 5, p. 469-470, 2009.7
- SILVA, T.M.; SABAINI, P.S.; EVANGELISTA, W.P.; GLÓRIA, M.B.A. **Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna**. Food Control, Estados Unidos: Elsevier, 2010.
- SILVA, Carlos Alberto da; SANTOS, Silvia de Oliveira. Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumido sem Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. 21 ed. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2016. 22 p. ISSN 1678-1961.  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157184/1/BP-126.pdf>. (acessado 19 de março de 2021).
- TAVARES, T. M. et al. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**. 2005. v. 34, n. 2, p. 85-104.

TEOPHILO, G.N. et al. Escherichia coli isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. **Microbiology**. v.5, p.11-14, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102230>. Acesso em: 02/11/2021.

TOLESANI JR, O.; RODERJAN, C. N.; CARMO NETO, E.; PONTE, M. M.; SEABRA, M. C.; KNIBEL, M. F. Doença de Haff associada ao consumo de carne de Mylossoma duriventre(pacu-manteiga). **Rev Bras Ter Intensiva.**, v. 25, n. 4, p. 348-351, 2013.

TRAVASSOS, L. Introdução ao estudo da Helmintologia. **Revista Brasileira de Biologia**.22 p.86-108, 1950. <http://www.icb.usp.br/~cewinter/Travassos>. (acessado 05 junho de 2021).

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2a edição ed. Porto Alegre, 2019.

ZANDONADI, R. P. et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de autosserviço. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 19–26, 2007.

## **Autores**

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein

Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Endereço: Avenida Bento Gonçalves, 8834 - Porto Alegre, RS, CEP: 90540-000.

\* Autor para correspondência: [marciamgorodicht@gmail.com](mailto:marciamgorodicht@gmail.com)



---

## Patógenos bacterianos causadores de doenças veiculadas por alimentos

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c2>

### Resumo

As doenças de origem hídrica e alimentar representam uma significativa preocupação para a garantia da segurança de alimentos, desafiando os sistemas de saúde no mundo todo. As consequências dessas doenças podem variar desde sintomas leves até complicações graves e até mesmo a morte, especialmente em grupos vulneráveis, como crianças, idosos e pessoas imunodeprimidos. Além da preocupação com a segurança e saúde dos consumidores, as DVAs são consideradas um relevante entrave ao crescimento socioeconômico mundial em função das perdas econômicas decorrentes dos surtos, bem como dos recalls e do desperdício de produtos devido a contaminações. O presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais patógenos bacterianos relacionados a surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA). Os resultados desta pesquisa apontaram que no Brasil, no período compreendido entre 2012 e 2021 houve um total de 6.347 surtos notificados no país, com 610.684 indivíduos expostos e 89 óbitos. Esse número pode ser bem maior devido à subnotificações causadas por alguns fatores, como: elevados períodos de incubação de alguns patógenos de origem alimentar, inúmeras fontes ou vias de infecção ausência de diagnóstico nas redes de atendimento médico, ausência de busca por auxílio médico principalmente em doenças de remissão espontânea, entre outros. A ocorrência de surtos relaciona-se com diversos fatores, como, condições de saneamento e qualidade da água para consumo humano impróprias, práticas inadequadas de higiene pessoal e consumo de alimentos contaminados. Os agentes etiológicos mais envolvidos nas DVAs foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Shigella* e *Clostridium perfringens*. Além destas, outras bactérias como o *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter* entre outros estão relacionadas a ocorrência de surtos. Garantir a qualidade e segurança dos alimentos por parte das indústrias, serviços de alimentação e conscientizar a população sobre os riscos associados as DVAs e disseminar informações sobre boas práticas alimentares, são passos cruciais para proteger a saúde pública e reduzir a incidência de novos surtos.

**Palavras-chave:** Doenças, intoxicação alimentar, patógenos bacterianos, DVA, DTA.

## 1. Metodologia

O presente estudo possui caráter exploratório, com metodologia de revisão de literatura. Foi delimitado primeiramente pelo contexto de segurança alimentar de forma geral, posteriormente aprofundando-se em conceitos e dados sobre DVAs e sua importância no contexto geral.

A pesquisa utiliza como fonte principalmente publicações de organizações internacionais de pesquisa, como Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA – Food and Drug Administration). Além disso, outras fontes são livros Microbiologia de alimentos, além de artigos científicos que utilizam bases de dados PubMed, Google Acadêmico, SciELO e outros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Definição e conceitos relacionados as Doenças Veiculadas por Alimentos

As doenças de origem hídrica e alimentar (DTHA) representam uma significativa preocupação para a garantia da segurança de alimentos, desafiando os sistemas de saúde no mundo todo (WHO, 2017).

Também conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ou Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) é um termo aplicado a uma síndrome atribuída à ingestão de água ou alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas e produtos químicos (BRASIL, 2022). Além da preocupação com a segurança e saúde dos consumidores, as DVAs são consideradas um relevante entrave ao crescimento socioeconômico mundial em função das perdas econômicas decorrentes dos surtos, bem como dos recalls e do desperdício de produtos devido a contaminações. O risco de ocorrência de surtos se potencializou devido à intensificação do comércio de alimentos e a rapidez em seu transporte, atingindo muitas vezes amplas regiões geográficas, e implicando em grandes perdas econômicas (LUNA *et al.*, 2013). Um relatório da União Europeia indicou que 40,5% dos surtos de origem alimentar ocorrem

dentro das residências o que demonstra a importância da conscientização da sociedade sobre o assunto (EFSA, 2019).

Segundo dados estimados pela World Health Organization (WHO) de 2007 a 2015 o número de mortes ao ano por DVA, em todo o mundo, foi de aproximadamente 420 mil pessoas. Na América a estimativa é de que 600 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente, com um total aproximado de 9 mil mortes. No entanto, a própria agência declara que o real ônus decorrente das DVAs não é totalmente conhecido. As lacunas de dados em todo mundo relacionadas à DVAs parecem ter relação com subnotificações causadas por alguns fatores, como: elevados períodos de incubação de alguns patógenos de origem alimentar, inúmeras fontes ou vias de infecção (BRASIL, 2012), ausência de diagnóstico nas redes de atendimento médico, ausência de busca por auxílio médico principalmente em doenças de remissão espontânea, entre outros.

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Centro de Vigilância de Doenças dos Estados Unidos, estima que 48 milhões de pessoas adoecem anualmente, 128 mil são hospitalizadas e 3 mil morrem anualmente devido a essas doenças. No Brasil, no período de 2007 a 2020, foram notificados, por ano, uma média de 662 surtos de DTHA, com o envolvimento de 156.691 doentes (média de 17 doentes/surto), 22.205 hospitalizados e 152 óbitos. Já de acordo com dados da Vigilância Epidemiológica, no período compreendido entre 2012 e 2021 houve um total de 6.347 surtos notificados no país, com 610.684 indivíduos expostos e 89 óbitos. Dos surtos notificados no Brasil, somente 1.559 tiveram seu agente etiológico elucidado, dos quais 73,3% foram causados por bactérias, 11,1% por vírus, 2% causados por protozoários e helmintos e 13,7% por outros agentes (BRASIL, 2022).

A ocorrência de surtos relaciona-se com diversos fatores, como, condições de saneamento e qualidade da água para consumo humano impróprios, práticas inadequadas de higiene pessoal e consumo de alimentos contaminados (MELO *et al.*, 2018). Um relatório da União Europeia indicou que 40,5% dos surtos de origem alimentar ocorrem dentro das residências, o que demonstra a importância da conscientização da sociedade sobre o assunto.

Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações; a existência

de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações. Acrescentam-se outros determinantes para o aumento na incidência das DTA, tais como a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (fast-foods), o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive no nível internacional (BRASIL, 2023).

É importante salientar que somente a presença de um agente infeccioso vivo em um alimento não é suficiente para que o indivíduo adoça ao consumi-lo. A medida básica de infectividade de um microrganismo é dado pelo número mínimo de partículas infecciosas que são necessárias para produzir uma infecção, chamada de dose infectante mínima (SHINOHARA *et al.*, 2008). Esse número pode variar muito entre os patógenos e de um hospedeiro para outro e dentro de uma mesma espécie, de acordo com as características e imunidade do indivíduo.

Alguns conceitos sobre DVAs devem ser levados em conta antes de compreender especificamente cada agente etiológico. O primeiro deles envolvem os termos infecção, toxinfecção e intoxicação, os quais são muitas vezes utilizados de forma equivocada.

Segundo o Ministério da Saúde, as doenças transmitidas ou veiculadas por alimentos podem ser divididas em:

**Infecções Veiculadas por alimentos:** são as doenças que resultam da ingestão de um alimento que contenha microrganismos patogênicos denominados invasivos, com capacidade de penetrar e invadir tecidos, originando quadro clínico característico. Exemplos: Salmonelose, Campilobacteriose, Brucelose, Hepatite viral tipo A e Toxoplasmose. Estes quadros geralmente são associados a diarreias frequentes, mas não volumosas, contendo sangue e pus, dores abdominais intensas, febre e desidratação leve, sugerindo infecção do intestino grosso por bactérias invasivas (BRASIL, 2012).

**Toxinfecção Alimentar:** são doenças que resultam da ingestão de alimentos que apresentam microrganismos patogênicos, que produzirá toxinas no intestino. O quadro clínico é provocado por toxinas liberadas quando estes se multiplicam, esporulam ou sofrem lise na luz intestinal. Essas toxinas atuam nos mecanismos de secreção/absorção da mucosa do intestino. Exemplo: Cólera, Toxinfecção causada por *Escherichia coli* O157:H7 e Toxinfecção causada por *Bacillus cereus* da Síndrome Diarréica e Botulismo Infantil associado à ingestão do mel. Normalmente, a diarreia nestes casos é intensa, sem sangue ou leucócitos, febre discreta ou ausente, sendo comum a desidratação (BRASIL,2012).

**Intoxicação Alimentar:** ocorre quando há a ingestão de alimentos com substâncias tóxicas, incluindo as toxinas produzidas por microrganismos. O quadro clínico é provocado pela ingestão de toxinas formadas em decorrência da intensa proliferação do microrganismo patogênico no alimento como bactérias e fungos. Exemplos clássicos deste processo são as intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (cepa emética) e *Clostridium botulinum*.

As Intoxicações alimentares também podem ocorrer por outros agentes não bacterianos como nas intoxicações por metais pesados, agrotóxicos, fungos silvestres, plantas e animais tóxicos (Ex.: moluscos, peixes) (BRASIL,2012).

Os conceitos citados anteriormente são essenciais para a compreensão da diferença entre os períodos de incubação em cada caso. O termo “período de incubação” é definido pelo Ministério da Saúde como “o tempo que transcorre desde a infecção até a apresentação dos sintomas”. Assim, nos casos em que a toxina já está pré-formada no alimento (intoxicação), o tempo de incubação tende a ser menor, de acordo com a quantidade de toxina ingerida e as características da mesma, já nos casos em que o microrganismo está presente no alimento (infecção e toxinfecção), o período de incubação tende a ser maior e depende da quantidade e infectividade do microrganismo presente no alimento (BRASIL,2010).

Outro conceito importante envolve a definição de surto, o qual é assim conceituado quando duas ou mais pessoas apresentam uma doença similar resultante da ingestão de um alimento contaminado. A exceção a esta regra ocorre no caso do Botulismo (causado pela bactéria *Clostridium botulinum*), onde

um caso é considerado um surto e uma emergência de saúde pública, que exige notificação e investigação imediatas. Isso se deve à gravidade da doença e à possibilidade de ocorrência de outros casos resultantes da ingestão da mesma fonte de alimentos contaminados (BRASIL,2006).

## **2.2. Fatores associados à ocorrência de doenças veiculadas por alimentos**

As características relacionadas ao alimento em si, bem como do ambiente em que este se encontra, impactará diretamente nos perigos biológicos que podem estar nesse alimento, bem como na probabilidade destes perigos acontecerem (risco). Assim, vamos ver alguns dos fatores importantes para o desenvolvimento de microrganismos causadores de DVA. Os conceitos a seguir são baseados no livro de Microbiologia de Alimentos do autor James M. Jay (2005).

### **2.2.1. Fatores Intrínsecos**

Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados com as características próprias dos alimentos, ou seja, as características do alimento em si, como: pH, atividade de água, potencial de oxirredução, composição química, fatores antimicrobianos, interações com outros microrganismos. Cada um destes fatores contribui ou não para a multiplicação dos microrganismos nos produtos bovinos e vamos falar mais sobre cada um deles:

### **2.2.2. pH**

O pH de um alimento é um dos fatores que pode ser determinante para a multiplicação de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Clostridium botulinum*, por exemplo.

As carnes de animais de açougue em geral possuem um pH próximo do ideal para grande parte dos microrganismos patogênicos (próximo à neutralidade). Isso faz com que, de forma geral, o controle de pH não seja um eficiente obstáculo em grande parte dos produtos de bovinos, devendo haver

outros obstáculos no processo para evitar o desenvolvimento destes microrganismos.

### **2.2.3. Atividade de água**

A atividade de água ( $a_w$ ) é definida como sendo a relação existente entre a pressão parcial de vapor de água contida na solução ou no alimento ( $P$ ) e a pressão parcial de vapor de água pura ( $P_0$ ), a uma dada temperatura. De forma simples, a atividade de água está relacionada à água livre disponível para o metabolismo dos microrganismos em um alimento. Em geral, quanto mais água livre para os microrganismos, maior a velocidade de multiplicação dos microrganismos.

Grande parte dos microrganismos patogênicos precisa de atividade de água acima de 0,90 para se desenvolver em um alimento (mas há várias exceções). Assim, as carnes bovinas por exemplo costumam ser um bom ambiente para o desenvolvimento dos microrganismos em geral. Precisamos levar em conta que, por exemplo, a  $a_w$  de uma linguiça frescal pode ser muito diferente de um bacon, por exemplo. Assim, cada produto precisa ser avaliado com cuidado.

### **2.2.4. Potencial de oxirredução**

Potencial de oxirredução é definido como a facilidade com que determinado substrato ganha ou perde elétrons ( $E_h$ ). Assim, a troca de elétrons de um composto para o outro gera diferença de Potencial (mV). De uma forma simplificada, quando um substrato perde elétrons, ele fica mais oxidado. Já quando o substrato ganha elétrons, ele fica mais reduzido. Assim, alimentos com maior “superfície de contato” são mais oxidados ( $E_h+$ ) e, portanto, mais “atrativos” aos microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos esse alimento se torna. Já os alimentos que têm menos contato com oxigênio, ficam mais reduzidos ( $E_h-$ ) e, portanto, são mais “atrativos” aos microrganismos anaeróbicos e anaeróbicos estritos.

As carnes bovinas, por exemplo, podem ter diferentes potenciais de oxirredução de acordo com sua apresentação. Carnes em pedaços tendem a ter Eh menor do que uma carne moída, por exemplo.

### **2.2.5. Composição química**

A composição química de um alimento interfere muito nos nutrientes que poderão ser utilizados pelos microrganismos para o seu metabolismo. Basicamente, os microrganismos necessitam de água, fonte de energia, fonte de nitrogênio e sais minerais. Em geral, as carnes e produtos cárneos bovinos são boas fontes de nutrientes para grande parte dos microrganismos, mas, quando há acréscimo de outros ingredientes, esses alimentos tendem a se tornarem “ambientes” ainda mais atrativos aos microrganismos. Lembrando que, alguns microrganismos necessitam de nutrientes específicos. Além disso, é importante esclarecer que a redução de algum tipo de nutriente pode somente diminuir a velocidade de multiplicação dos microrganismos, não acontecendo, necessariamente, sua interrupção.

### **2.2.6. Fatores antimicrobianos**

Os fatores antimicrobianos são substâncias ou barreiras presentes nos alimentos que retardam ou impedem a multiplicação bacteriana nos alimentos. Estes fatores podem ser naturais ou artificialmente adicionados. Em geral, nos produtos cárneos, observamos alguns temperos como fatores antimicrobianos, bem como produtos conservantes utilizados. Sempre que houver algum fator que interfere na multiplicação dos microrganismos, este pode ser considerado como uma barreira à multiplicação dos microrganismos. No entanto, é necessário lembrar que jamais a segurança de um alimento deve se basear em apenas uma barreira, de forma isolada, e sim, no conjunto de barreiras ao desenvolvimento dos microrganismos.



### 2.2.7. Interações com outros microrganismos

Um microrganismo, ao realizar seu metabolismo, pode produzir metabólitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos. Exemplo: bactérias produtoras de ácido láctico podem alterar o pH do alimento de tal forma que o tornam ácido demais para o crescimento de outro microrganismo. Já leveduras que degradam o ácido láctico de alimentos fermentados os tornam favoráveis para o desenvolvimento e produção de toxinas por *Clostridium botulinum*. Além disso, produtos do metabolismo de certas bactérias podem ser essenciais para a proliferação de outras. Exemplo: Tiamina e triptofano: essenciais ao desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*.

## 2.3. Fatores Extrínsecos

Os fatores extrínsecos são aqueles relacionados com as características do ambiente onde este alimento se encontra, ou seja, as características da embalagem em si ou do local/forma de armazenamento deste alimento. Por isso que a escolha responsável e planejada da embalagem de um alimento pode ser determinante para garantir a segurança ao consumidor.

### 2.3.1. Temperatura

Os microrganismos são classificados de acordo com a faixa de temperatura que são capazes de se multiplicar, por isso, a temperatura do alimento (que vem da temperatura do ambiente onde este alimento se encontra) é determinante para a velocidade de multiplicação destes microrganismos.

Grande parte dos microrganismos patogênicos são considerados mesófilos e, portanto, se desenvolvem dentro da chamada “zona de perigo”, que vai aproximadamente de 7°C a 65°C. Assim, essa temperatura deve ser evitada ao máximo, focando o controle do tempo x temperatura dos alimentos durante o processamento e na armazenagem (com exceção dos alimentos estáveis a essa temperatura ou esterilizados comercialmente, por exemplo).

### **2.3.2. Nível de Oxigênio**

O oxigênio é um gás presente no ar e desempenha um papel importante na deterioração dos alimentos. Quando o alimento entra em contato com o oxigênio, ocorrem reações químicas que podem levar à oxidação dos componentes presentes no alimento, resultando em alterações indesejáveis, como mudança de cor, sabor e odor.

A presença de oxigênio também pode estimular o crescimento de microrganismos aeróbicos, que necessitam de oxigênio para sobreviver. Esses microrganismos podem causar deterioração dos alimentos e, em alguns casos, podem ser patogênicos, causando doenças transmitidas por alimentos.

Portanto, o nível de oxigênio é um fator crítico a ser controlado no armazenamento e embalagem de alimentos. Para preservar a qualidade e a vida útil dos alimentos, é comum utilizar técnicas de controle de atmosfera, como embalagens com atmosfera modificada ou atmosfera controlada. Essas técnicas envolvem a remoção ou redução do oxigênio presente no ambiente de armazenamento, substituindo-o por outros gases, como dióxido de carbono e nitrogênio, que são menos reativos e inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis.

O controle do nível de oxigênio também é importante em processos de conservação de alimentos, como a pasteurização e a esterilização, nos quais a ausência de oxigênio é desejada para evitar a deterioração dos alimentos e a formação de substâncias indesejáveis.

### **2.3.3. Umidade**

A umidade é outro fator extrínseco que pode afetar a qualidade, segurança e vida útil dos alimentos. Refere-se à quantidade de água presente no ambiente em que o alimento está armazenado ou embalado, bem como à sua interação com o alimento em si.

Um alimento com alta umidade pode proporcionar um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras. Isso pode levar à deterioração do alimento, resultando em alterações de textura,

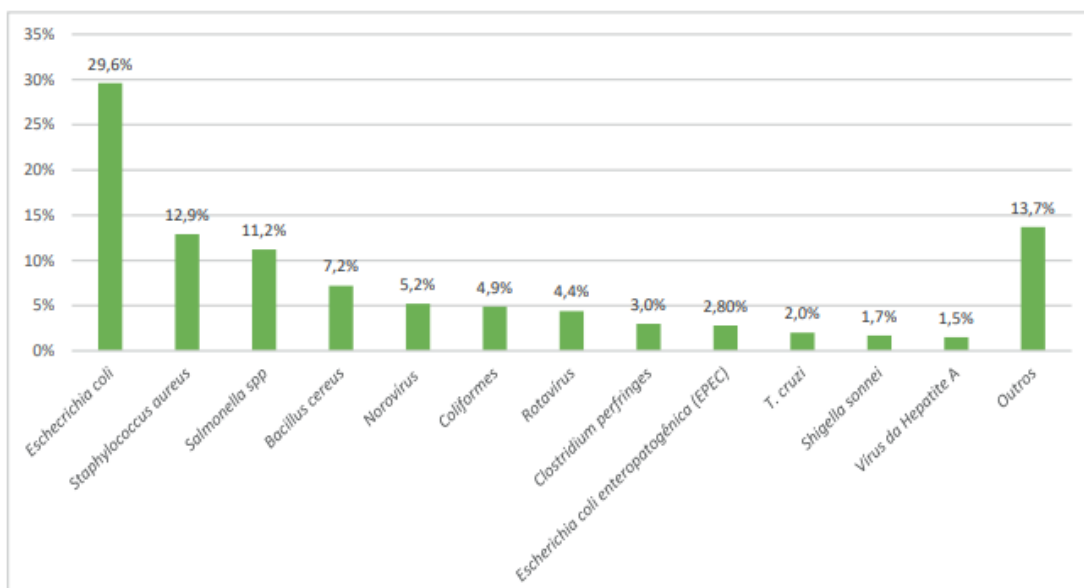
sabor, odor e cor. Além disso, microrganismos patogênicos também podem se desenvolver em alimentos com alta umidade, representando um risco à saúde dos consumidores.

Por outro lado, a umidade excessivamente baixa também pode ser problemática para alguns alimentos, especialmente aqueles que são sensíveis à perda de água, como certas frutas, vegetais e produtos de panificação. A baixa umidade pode levar à perda de qualidade, ressecamento, enrijecimento e perda de frescor desses alimentos.

O controle da umidade é fundamental na indústria de alimentos e serviços de alimentação para garantir a qualidade e a segurança dos produtos. Isso é feito por meio de técnicas de armazenamento adequadas, seleção de embalagens apropriadas (que possam restringir ou permitir a troca de umidade com o ambiente) e controle da temperatura e umidade relativa nos ambientes de armazenamento.

### 3. Agentes patogênicos bacterianos

Conforme a Figura 01, os dez agentes etiológicos mais envolvidos nas DVAs, no Brasil, incluem as bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Shigella* e *Clostridium perfringens*.



Fonte: Ministério da Saúde (2022).

### 3.1. *Escherichia coli*

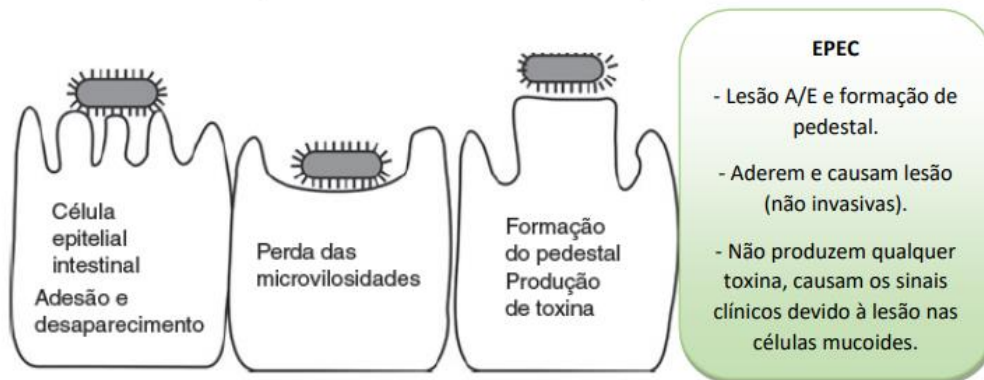
*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, anaeróbia facultativa e que faz parte do grupo *Enterobacteriaceae*. Está amplamente distribuída na natureza e presente principalmente no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais. Desta forma, *E. coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal em alimentos, ambientes marinhos e de água doce, sendo a principal representante do grupo dos coliformes fermentadores de lactose a 45°C (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

São capazes de crescer na temperatura de 5°C a 47°C, e a temperatura ideal é de 35°C a 40°C (mesófilas). A faixa de pH de crescimento é de 3,8 a 9,5, e o pH ideal entre 7 e 7,5. Relacionam-se com cocção inadequada dos alimentos, principalmente carnes, manipulação de alimentos por pessoas infectadas, emprego de água contaminada para lavagem ou refrigeração insuficiente.

Os isolados de *E. coli*, tanto de animais quanto de humanos, foram associados a patogenicidade, sendo visto que amostras patogênicas possuem mecanismo de virulência específicos. Baseado nestes fatores de virulência as bactérias foram classificadas em seis principais categorias patogênicas descritas de *E. coli* associadas a contaminação em alimentos, sendo classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC), sendo que as amostras são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (KAPER *et al.*, 2004; FORSYTHE *et al.*, 2013).

***E. coli* Enteropatogênica – EPEC:** os sintomas mais comuns da doença são diarreia aquosa, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre. A dose infecciosa em adultos saudáveis foi estimada em 10<sup>8</sup> organismos, e o período de incubação aproximado, de 16 a 48 horas. Na maioria dos casos, a diarreia induzida por EPEC é autolimitada e pode ser tratada de forma eficaz com terapia de reidratação oral.

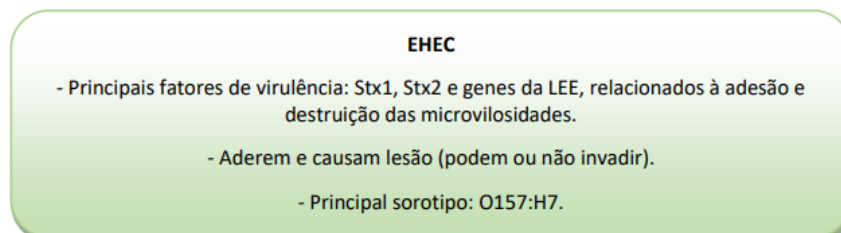
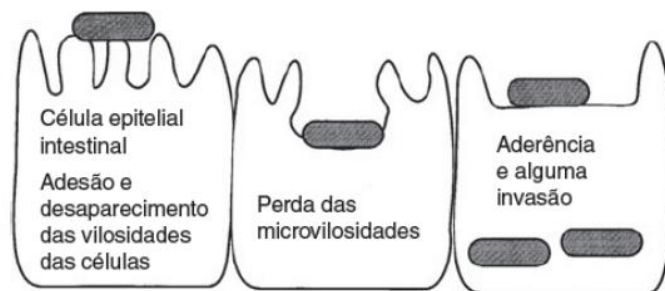
Na Figura 2, é possível observar o mecanismo de infecção das células mucoides do intestino pela EPEC.

Infecção das células mucoides do intestino pela **EPEC**:

Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

***E. coli* Enterohemorrágica – EHEC:** os sinais clínicos incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, febre, calafrios, cefaleia, mialgia, diarreia aquosa, com sangue a seguir, colite hemorrágica, e pode progredir para síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP). O período de incubação varia, em geral, de 72-120 horas.

Na Figura 3, é possível observar o mecanismo de infecção das células mucoides do intestino pela EHEC.

Infecção das células mucoides do intestino pela **EHEC**:

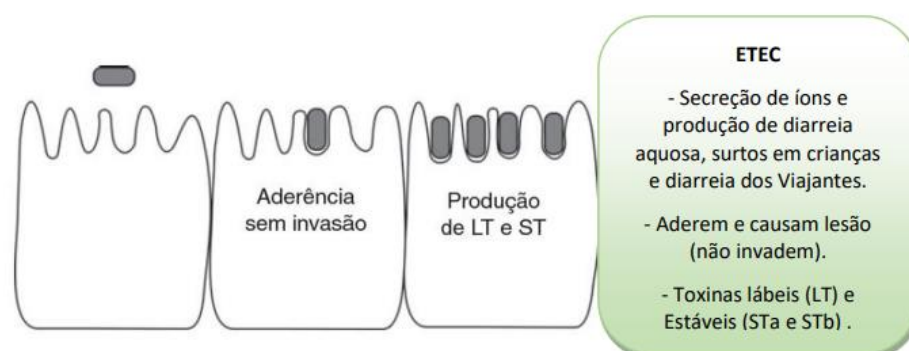
Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

*E. coli* Enterotoxigênica – ETEC/ STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga): relacionada a muitas doenças humanas, incluindo desde diarreias leves à colite hemorrágica (HC) e à síndrome hemolítico urêmica (HUS). O sorotipo O157H7 é reconhecido como um importante patógeno vinculado a doenças alimentares desde 1983 devido a um surto ocorrido após a ingestão de hambúrgueres mal-cozidos nos EUA (MITTEESTAEDT e CARVALHO, 2016) sendo que os ruminantes, em especial os bovinos (BLANCO et al., 1993; HANCOCK et al., 1994), além de ovinos e caprinos são considerados os principais reservatórios. Assim, os produtos de origem animal, assim como águas de superfícies ou subterrâneas, bem como culturas de hortifrutigranjeiro são produtos amplamente envolvidos nos surtos.

Os sintomas típicos da infecção por ETEC são diarreia aquosa, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre. Os sintomas duram cerca de 3–5 dias. A dose infecciosa de ETEC para adultos é estimada em  $10^8$  organismos. No entanto, crianças e idosos podem desenvolver infecções com um número menor.

Na Figura 4, é possível observar o mecanismo de infecção das células mucoides do intestino pela ETEC.

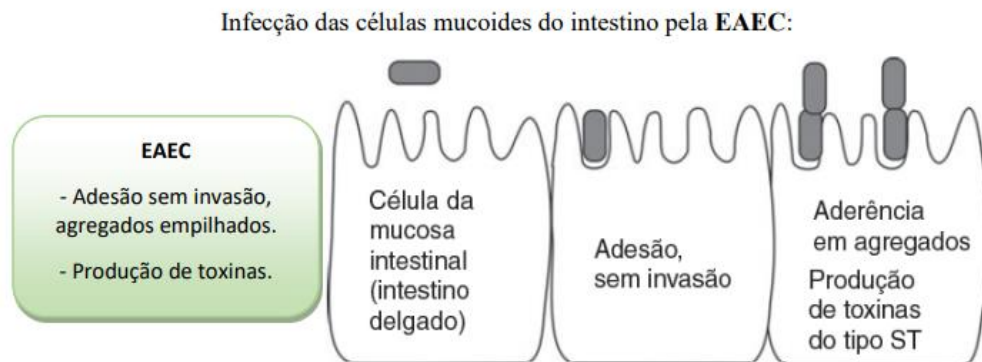
#### Infecção das células mucoides do intestino pela ETEC:



Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

***E. coli* Enteroagregativa – EAEC:** causam diarreia frequentemente persistente em crianças e adultos em países em desenvolvimento e desenvolvidos e diarreia dos viajantes. Os sintomas da infecção EAEC são frequentemente diarreia aquosa com muco e são acompanhados por febre, vômito e dor abdominal.

Na Figura 5, é possível observar o mecanismo de infecção das células mucoides do intestino pela EAEC.



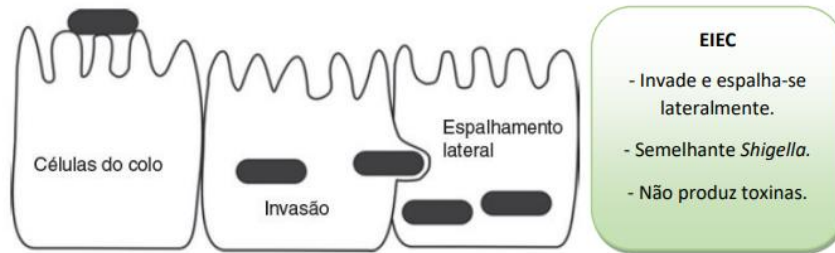
Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

***E. coli* Enteroinvasiva – EIEC:** os sintomas da infecção por Shigella / EIEC variam de diarreia aquosa leve a disenteria bacilar inflamatória grave caracterizada por fortes cólicas abdominais, febre, calafrios e fezes contendo sangue e muco. Os sintomas graves podem até ser fatais e complicações graves com risco de vida, incluindo megacólon, perfuração intestinal, peritonite, pneumonia e Síndrome Hemolítica Urêmica. O período de incubação varia, em geral de 16 a 48 horas.

Na Figura 6, é possível observar o mecanismo de infecção das células mucoides do intestino pela EAEC.



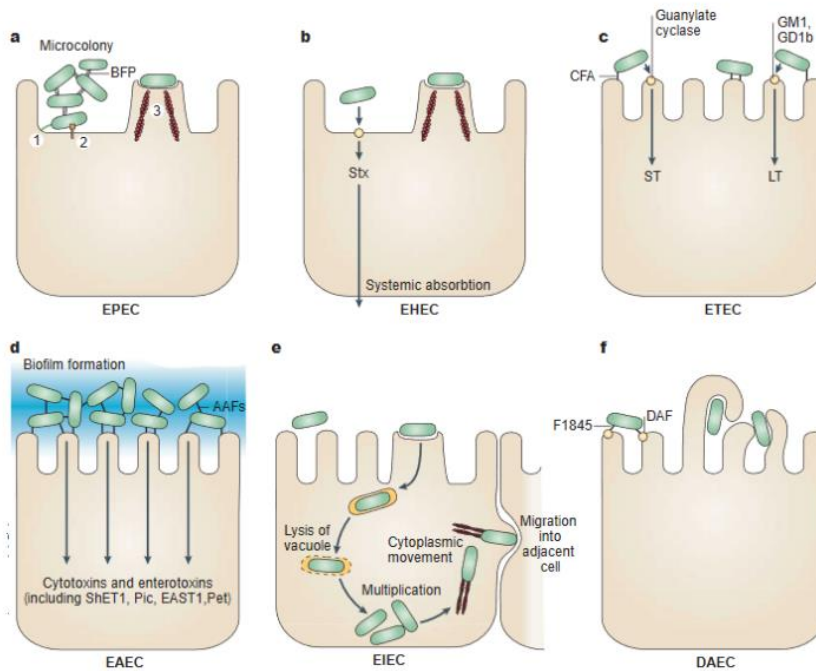
Infeção das células mucoides do intestino pela EIEC:



Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

Na Figura 7, é possível observar um resumo dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* diarreio gênicas:

Mecanismos de patogenicidade das *E. coli* diarreio gênicas:



Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.



Interação de cada categoria com uma célula-alvo típica representada esquematicamente:

a) A EPEC adere aos enterócitos do intestino delgado, mas destrói a arquitetura microvilar normal, induzindo a fixação característica e apagamento da lesão. Os distúrbios do citoesqueleto são acompanhados por uma resposta inflamatória e diarreia. Adesão inicial, 2. Translocação de proteínas por secreção de tipo III 3. Formação de pedestal.

b) A EHEC também induz a inserção e apagamento, mas no cólon. A característica distintiva da EHEC é a elaboração da toxina Shiga (Stx), cuja absorção sistêmica leva a complicações potencialmente fatais.

c) Da mesma forma, a ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado e induz diarreia aquosa pela secreção de enterotoxinas termolábeis (LT) e / ou estáveis ao calor (ST).

d) A EAEC adere aos epitélios do intestino delgado e grosso em um biofilme espesso e elabora enterotoxinas e citotoxinas secretoras.

e) A EIEC invade a célula epitelial do cólon, lisa o fagossoma e se move através da célula por nucleação de microfilamentos de actina. A bactéria pode mover-se lateralmente através do epitélio por propagação direta célula a célula, podendo sair e reentrar na membrana plasmática basolateral. f) A DAEC induz um efeito de transdução de sinal característico em enterócitos do intestino delgado que se manifesta como o crescimento de longas projeções celulares semelhantes a dedos, que envolvem a bactéria.

### **3.2. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são cocos gram-positivos, em forma de cachos de uva, aeróbios facultativos e não formadores de esporos. Estafilococos coagulase positiva são as mais conhecidas bactérias e mais importantes para ocorrência de doenças veiculadas por alimentos, dentre os Estafilococos em geral (FORSYTHE *et al.*, 2013).

São microrganismos mesófilos sua temperatura ótima de crescimento fica entre 40 e 47,8°C, sendo capazes de se multiplicar em alimentos com 7,5% a 20% de cloreto de sódio (NaCl) e pH ótimo entre 6 e 7. São capazes de produzir enzimas e exotoxinas e estão entre os patógenos mais relacionados a surtos de intoxicação alimentar, sendo o leite e os derivados lácteos, os alimentos mais associados à ocorrência de casos de intoxicação alimentar estafilocócica (FRANCO *et al.*,2008).

Estima-se que cerca de 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *S. aureus*. É comum nas mucosas nasal e oral, pele, pelo e feridas no homem e na maioria das espécies animais, assim como está presente no ar, água, solo, leite, esgoto e utensílios e superfícies. As falhas de higiene pessoal durante a manipulação dos alimentos são consideradas as grandes causas de intoxicação estafilocócica, que constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DVA) em muitos países. A intoxicação ocorre logo após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas, principalmente nas épocas mais quentes do ano, já que para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias  $10^5$  a  $10^6$  células de *S. aureus* por grama de alimento (DINGES *et al.*, 2000).

Algumas enterotoxinas são termorresistentes, o que é especialmente importante para a indústria de alimentos, pois os tratamentos térmicos empregados não são capazes de inativar as enterotoxinas, somente eliminar o microrganismo. A pasteurização do leite é um exemplo, sendo que *S. aureus* tem importância destacada nos produtos lácteos, já que surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica atribuída ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países.

Os sintomas dessa enfermidade incluem principalmente náusea, vômitos e cólicas, prostração, hipotensão e hipotermia, no entanto, a intensidade dos sintomas pode variar de acordo com o grau de suscetibilidade do indivíduo, com a concentração da enterotoxina presente no alimento e a quantidade de alimento ingerida (FRANCO *et al.*, 2008). A ANVISA traz em sua Instrução Normativa 161 (2022) a obrigatoriedade de pesquisa de toxina estafilocócica em alguns grupos

de alimentos: leites e derivados, suplementos e alimentos semielaborados e prontos para o consumo (BRASIL, 2022).

### 3.3 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram positiva, ubíqua, que tem capacidade de sobrevivência em condições adversas e, por isso, tem se tornado um dos patógenos mais preocupantes da indústria de alimentos. Sua capacidade de formação de biofilmes dificulta bastante seu controle nos ambientes de abate e produção. Costuma ser encontrada em superfícies frias e até geladas, em “cantos” de difícil higienização (GANDHI *et al.*, 2007)

A contaminação causada por *L. monocytogenes* tem sido motivo frequente de recalls na área de alimentos e a bactéria tem sido isolada a partir de uma variedade de produtos, incluindo alimentos prontos para o consumo e alimentos contaminados no ambiente de processamento, principalmente em carne, frango frutos do mar e derivados do leite (HAGE *et al.*, 2014). A pasteurização é suficiente para destruir o organismo.

A presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos de origem animal é indicativo de condição higiênica deficiente em alguma etapa do processamento industrial, distribuição e ou armazenamento, mas a Comissão do Codex para Higiene dos Alimentos tem estabelecido que uma concentração de *L. monocytogenes* não excedendo 100 células por grama de alimento consumido é de baixo risco ao consumidor.

Os sinais clínicos associados a alimentos contaminados com *L. monocytogenes* são geralmente similares à gripe (febre, cefaleia, vômito, náusea), e sintomas crônicos incluem aborto, nascimento de feto morto ou prematuro quando a mulher grávida é infectada no segundo e terceiro trimestres, abscessos, meningite, encefalite, septicemia, com um valor aproximado de taxa de letalidade de 20%, o que aumenta até 75% em grupos de alto risco, como as mulheres grávidas, idosos e adultos imunocomprometidos (FRETZ, *et al.*, 2009). O período de incubação da gastroenterite causada por *L. monocytogenes* pode ser relativamente curto, de poucas horas a 2 ou 3 dias, mas a forma grave da

doença pode ter um período de incubação extremamente longo, de 3 dias a 3 meses (FDA,2012).

### 3.4 *Salmonella sp.*

*Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. Classificada como uma bactéria ambiental e está amplamente difundida na natureza, no entanto, seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e animais. É considerada uma das maiores preocupações da saúde pública em todo mundo, em especial associada ao consumo de alimentos de origem animal (FRANCO *et al.*, 2008). No Brasil já foi a principal causa de doenças transmitidas por alimentos, liderando o ranking de agentes etiológicos responsáveis pelos surtos notificados de DVAs há anos.

São bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, que produzem gás a partir de glicose (*exceto S. Typhi*), não formam endósporos e têm forma de bastonetes curtos (1 a 2 µm). A maioria é movimentada por flagelos, exceto a *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* (FORSYTHE *et al.*, 2013).

Até o momento mais, de 2.500 variantes (sorovares ou sorotipos) com diferentes caracterizações de seus antígenos foram catalogadas, sendo cada uma tratada como uma espécie por suas particularidades. A maior parte dos sorovares do gênero são bactérias patogênicas para o homem e muitas espécies animais, apesar das diferenças quanto às características e gravidade da doença que provocam.

Entre as doenças mais comuns envolvidas estão a febre tifoide (causada por *S. Typhi*), as febres entéricas (causada por *S. Paratyphi*), enterocolites ou salmoneloses (causadas pelas demais bactérias do gênero). Os sorovares como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são considerados os patógenos de DVA associados ao maior número de mortes por doenças transmitidas por alimentos (HAVELAAR *et al.*, 2010). Além destas citadas acima, temos outras que estão gerando surtos de DVA, como, por exemplo: *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Montevideo* e *S. Saint Paul* (MALDONADO *et al.*, 2008). As espécies *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* citadas acima são importantes dentro da produção de aves, mas são sorovares sem potencial zoonótico.

Os animais e o homem muitas vezes não apresentam sintomatologia, carregando o agente como portadores assintomáticos ou portadores convalescentes, ajudando a distribuir e disseminar de forma incontrolada. Nesses casos, o número de salmonelas nas fezes decresce, mas pode persistir por até três meses, e aproximadamente 1% dos casos se tornam portadores crônicos. Para que a infecção ocorra, é necessário que o indivíduo sadio ingira aproximadamente  $10^5$  bactérias em alimentos ou água contaminados com fezes.

Por ser um microrganismo considerado ambiental, *Salmonella* está especialmente presente nos locais de produção primária de alimentos de origem animal, circulando entre aves, répteis, mamíferos e peixes, o que dificulta bastante seu controle. Aviários de criações comerciais de aves de corte e postura sofrem prejuízos no mundo todo devido a contaminações por esse microrganismo. Além disso, a ocorrência de contaminação cruzada nos locais de produção industrial e manipulação de alimentos é frequente. Muitas vezes, os produtos de origem animal que trazem a contaminação da produção primária serão cozidos (temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  inativa a bactéria) mas acabam sendo a fonte de contaminação na cozinha, levando a contaminação de vegetais e outros alimentos que serão consumidos.

O tempo de sobrevivência desses microrganismos no ambiente é de 28 meses em fezes secas de aves, 30 meses em estrume bovino, 280 dias em solo de cultivo e até 120 no pasto. Há a possibilidade de os efluentes de esgoto carregarem o agente, logo, a contaminação de hortaliças pela água é possível. Fontes de infecção incluem água, solo contaminado, vegetação, componentes de ração de animais (tais como farinha de carne e osso, peixe).

As de carnes de aves, ovos, leite, suínos são as principais fontes de contaminação alimentar por *Salmonella* spp. As condições ideais de multiplicação envolvem a temperatura de  $35$  a  $37^{\circ}\text{C}$  e um pH em torno de 7,0.

Os sintomas da Salmonelose são dores abdominais, febre, diarreia (em algumas situações com presença de sangue), calafrios, desidratação, exaustão, febre, cefaleia e vômito, podendo evoluir em casos mais severos para septicemia, febre entérica, meningites, artrite reativa, Síndrome de Reiter, osteomielite e até a morte.

Os sintomas se manifestam de 12 a 36 horas, com duração de 1-4 dias, após o consumo de alimentos ou bebidas contaminadas. A taxa de fatalidade da febre tifoide é de 10%, enquanto a de outras Salmoneloses é de menos de 1%. Dentre as pessoas que se recuperam da febre, um pequeno número continua a excretar as bactérias nas fezes.

### 3.5 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus*, é um bacilo gram positivo, aeróbio ou anaeróbico facultativo, mesófilo, com flagelos peritríquios e produtor de esporos. Apresenta um ótimo crescimento em temperatura entre 28 e 35°C, o tempo de geração no organismo humano varia de 18 a 27 min., tolera uma ampla faixa de pH que vai de 4,9 a 9,3 e cresce em concentrações salinas de até 7,5% e em alimentos com atividade de água ( $a_w$ )  $\geq$  0,95 (FORSYTHE *et al.*, 2013).

Encontra-se amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural, por esta razão contamina facilmente a vegetação, cereais e derivados, alimentos, águas naturais, leite, produtos lácteos, e condimentos. São transmitidos através de alimentos contaminados sendo seus esporos bacterianos altamente resistentes ao calor, à radiação ultravioleta (UV), à dessecação, a valores de pH altos ou baixos, a produtos químicos tóxicos e a outras tensões ambientais desafiadoras. A resistência dos esporos constitui um problema importante para a indústria de alimentos, considerando que o *B. cereus* pode se aderir fortemente a diversos materiais, incluindo as superfícies de aço inoxidável, resistindo aos procedimentos de limpeza (DOMINGUES *et al.*, 2011).

O *Bacillus cereus* causa grandes preocupações quanto ao consumo de alimentos ligeiramente aquecidos e subsequentes refrigerados. O microrganismo se desenvolve bem em alimentos cozidos devido a inativação da microflora competidora pela cocção, e são bastante resistentes ao calor. Ao serem reidratados obtêm as condições para que sua germinação ocorra, provocando degradação dos alimentos bem como uma intoxicação alimentar.

Duas diferentes formas de gastroenterite podem ser causadas por *B. cereus*: a síndrome diarréica e a síndrome emética. Essas síndromes só ocorrem se houver a produção das toxinas, o que, segundo vários autores, ocorre quando

o microrganismo possui boas condições de multiplicação, atingindo entre  $10^7$  e  $10^9$  células. As principais diferenças entre as síndromes estão no tempo de incubação, nos sintomas e nos alimentos envolvidos.

A **síndrome diarreica** é causada pela ingestão de células vegetativas e possui um período de incubação variando entre 8 a 16 horas (devido ao fato da toxina ser produzida durante a multiplicação do agente no trato gastrointestinal, no período de crescimento exponencial) e inclui diarreia intensa. Os principais alimentos envolvidos descritos na literatura incluem vegetais, produtos cárneos, pescado, massa, leite, sorvete, entre outros (ARNESEN *et al.*, 2008).

Já a **síndrome emética** é causada pela toxina pré-formada no alimento e, por isso, possui um período de incubação de 1 a 5 horas, sendo que a toxina é produzida ao fim do período de crescimento exponencial do microrganismo (BHUNIA *et al.*, 2008.) Os sintomas mais comuns são vômito, náuseas e mal-estar geral. Uma grande variedade de alimentos, incluindo carnes, leites, vegetais e peixes, foi associada ao tipo diarreico de toxinfecção. Os surtos do tipo emético estão fortemente associados a ingestão de alimentos farináceos, contendo cereais, em especial o arroz, sendo que a toxina emética é termoestável, resistindo a  $126^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos, dificultando sua eliminação (FRANCO *et al.*, 2008).

### 3.6. *Clostridium botulinum*

O *Clostridium botulinum* é um bacilo gram-positivo, anaeróbio estrito, esporulado que se encontra naturalmente em diversos ambientes, como solo, água, mel, pólen, legumes frescos e especiarias. Em condições de anaerobiose, elevada atividade de água (0,94-0,98) e pH superior a 4,5. A forma vegetativa produz 8 tipos de toxinas (A, B, C1, C2, D, E, F e G), das quais as do tipo A, B, E e F são patogênicas para o homem e C e D para animais. A maior parte dos casos no Brasil, a toxina identificada foi a do tipo A (BRASIL, 2006).

Na Figura 8, é demonstrado as principais toxinas relacionadas ao *C. botulinum*.

Toxinas da *Clostridium botulinum*

Toxina	Fonte	Espécies suscetíveis
Tipo A	Carne, produtos enlatados Toxi-infecções Carne, carcaças	Humanos Crianças Visom, cães, suínos
Tipo B	Carne, produtos enlatados Toxi-infecções Toxi-infecções	Humanos Crianças Potros (até dois meses de idade)
Tipo C	Invertebrados mortos, larvas, vegetação e carcaças de aves em decomposição Forragem ensilada da "cama" de aves domésticas, fardos de silagem (de qualidade pobre), feno ou silagem contaminada com carcaças de roedores Carne, principalmente carcaças de frango	Aves aquáticas, aves domésticas Bovinos, ovinos, eqüinos Cães, visom, leões, macacos
Tipo D	Carcaças, ossos Alimentos contaminados com carcaças	Bovinos, ovinos Eqüinos
Tipo E	Invertebrados mortos, lodo do fundo dos açudes Peixes	Peixes cultivados Aves que se alimentam de peixes, humanos
Tipo F	Carne, peixe	Humanos
Tipo G	Alimentos contaminados com terra	Humanos (na Argentina)

Fonte: QUINN *et al* (2005)

É importante salientar que existe três formas comuns de botulismo que são conhecidas: botulismo clássico (alimentar) que resulta da ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas; botulismo de lesão, causado pela proliferação e liberação de toxina em lesões infectadas com *Clostridium botulinum* (não é DVA); e o botulismo intestinal (ou infantil), e tem sido associado principalmente ao consumo de mel contendo esporos botulínicos que germinam no intestino grosso e produz a toxina in vivo. O tipo de toxina e a quantidade de esporos ingeridos pela criança determinam a gravidade do quadro clínico, devendo-se evitar o consumo de mel no primeiro ano de vida.



Já o botulismo clássico é uma doença grave, de alta letalidade e a distribuição da doença é mundial, que ocorre por ingestão de toxinas pré-formadas em alimentos previamente contaminados e que foram produzidos ou conservados de maneira inadequada. Muitos são os alimentos descritos como responsáveis pelo botulismo, tais como: conservas de vegetais, principalmente as artesanais (palmito, picles, pequi); produtos cárneos cozidos, curados e defumados de forma artesanal (salsicha, presunto, carne frita conservada em gordura – “carne de lata”), queijos e pasta de queijos, peixes, frutos do mar, e outros, especialmente acondicionados em embalagens a vácuo, sem oxigênio, sem o tratamento adequado, que favorecem o desenvolvimento da bactéria, e assim, a produção da toxina (BRASIL,2006).

As condições ideais para que a bactéria assuma a sua forma vegetativa, produtora de toxina pode variar entre os tipos, mas em geral são: anaerobiose estrita, pH alcalino ou próximo do neutro (aproximadamente 4,6 a 9,0) e elevada atividade de água (0,94-0,98). Para impedir a multiplicação de *C. botulinum* nos alimentos e, assim, a produção de toxina, a indústria de alimentos se utiliza de algumas estratégias, dentre elas: tratamento térmico, controle do pH, além do uso de sais de cura, como sal (NaCl), glicerol, nitrito (NO<sub>2</sub>) e nitrato (NO<sub>3</sub>). Os dois últimos são conservadores químicos muito utilizados principalmente na preparação de produtos cárneos por sua ação bactericida, atuando como fator antibotulínico (BRASIL,2006; FRANCO *et al.*,2008).

Para impedir a multiplicação de *C. botulinum* nos alimentos e, assim, a produção de toxina, a indústria de alimentos se utiliza de algumas estratégias, dentre elas: tratamento térmico, controle do pH, além do uso de sais de cura, como sal (NaCl), glicerol, nitrito (NO<sub>2</sub>) e nitrato 33 03 (NO<sub>3</sub>) (conservadores químicos muito utilizados principalmente na preparação de produtos cárneos por sua ação bactericida, atuando como fator antibotulínico) (FRANCO *et al.*,2008).

O período de incubação é geralmente curto (de duas horas a dez dias, com média de 12 a 36 horas) e a doença se manifesta rapidamente, levando a uma paralisia flácida e progressiva dos músculos do paciente, considerando que quanto maior a concentração de toxina no alimento ingerido, menor o período de incubação e maior a letalidade, sendo a dose mínima letal 0,12 microgramas. Quando o mecanismo de transmissão envolvido é a ingestão direta de toxina já

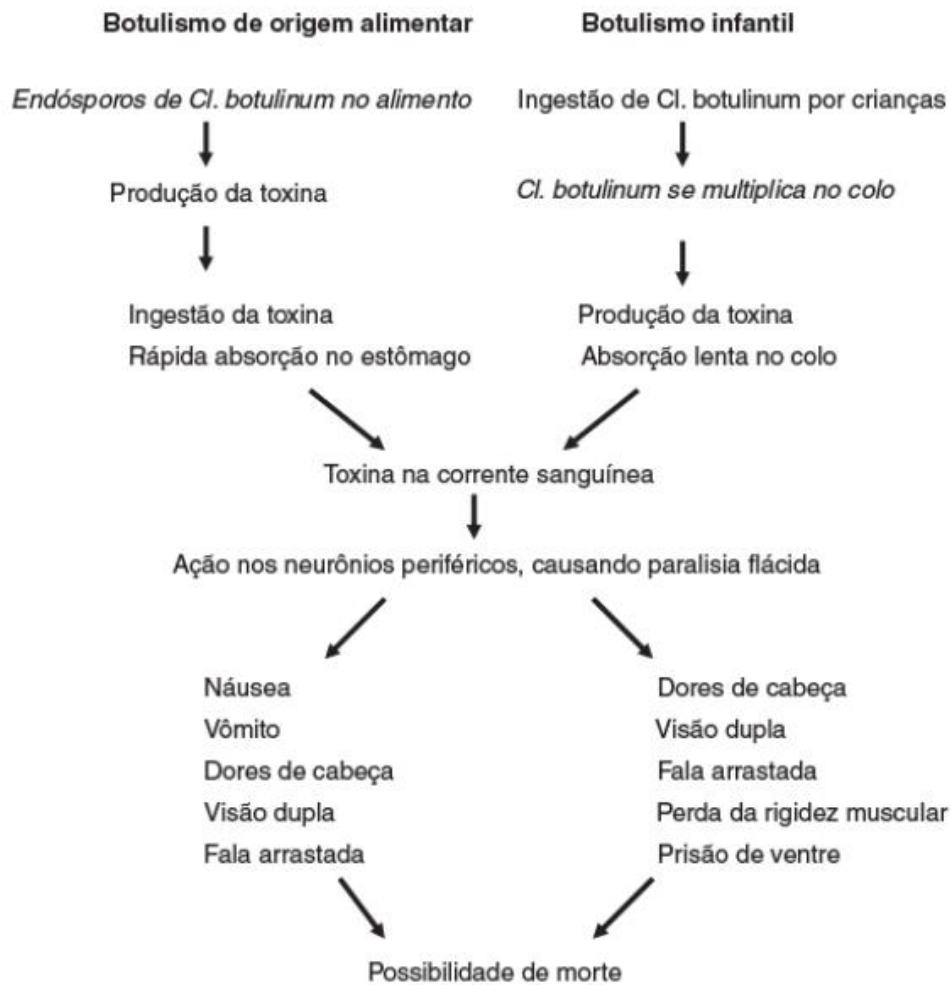
presente no alimento, o período de incubação é menor e a doença se manifesta mais rapidamente. Quando ocorre a ingestão de esporos ou a contaminação de ferimentos, o período de incubação é maior, porque a doença só se inicia após a transformação do *C. botulinum* da forma esporulada para a vegetativa, que se multiplica e libera toxina. Períodos de incubação curtos sugerem maior gravidade e maior risco de letalidade.

Os sinais e sintomas iniciais podem ser gastrintestinais e/ou neurológicos. As manifestações gastrintestinais mais comuns são: náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal, podendo anteceder ou coincidir com os sinais e sintomas neurológicos. O quadro neurológico se caracteriza por paralisia flácida aguda motora. Os principais sinais e sintomas neurológicos são visão turva, ptose palpebral, diplopia, disfagia, disartria e boca seca. A paralisia flácida pode ocasionar dispneia, insuficiência respiratória e tetraplegia flácida. A fraqueza muscular nos membros é tipicamente simétrica, acometendo com maior intensidade os membros superiores. Uma característica importante no quadro clínico é a preservação da consciência.

Nas crianças, o aspecto clínico do Botulismo intestinal varia de quadros com constipação leve à síndrome de morte súbita. Manifesta-se, inicialmente, por constipação e irritabilidade, seguidas de sintomas neurológicos, caracterizados por dificuldade de controle dos movimentos da cabeça, sucção fraca, disfagia, choro fraco, hipoatividade e paralisias bilaterais descendentes, que podem progredir para comprometimento respiratório. Casos leves, caracterizados apenas por dificuldade alimentar e fraqueza muscular discreta, têm sido descritos.

Na Figura 9, é possível observar a fisiopatologia do *C. botulinum* no organismo humano:

Intoxicação por *Cl. botulinum*:



Toxina produzida durante esporulação

Intestinal: Nas placas motoras, HC se liga ao receptor (deixando impedido/ocupado para a acetilcolina ser liberada) e LC tem a ação neurotrópica

Infantil: Multiplicação (e produção de toxinas) intestinal

A toxina é termossensível. mas o esporo é termoresistente

Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

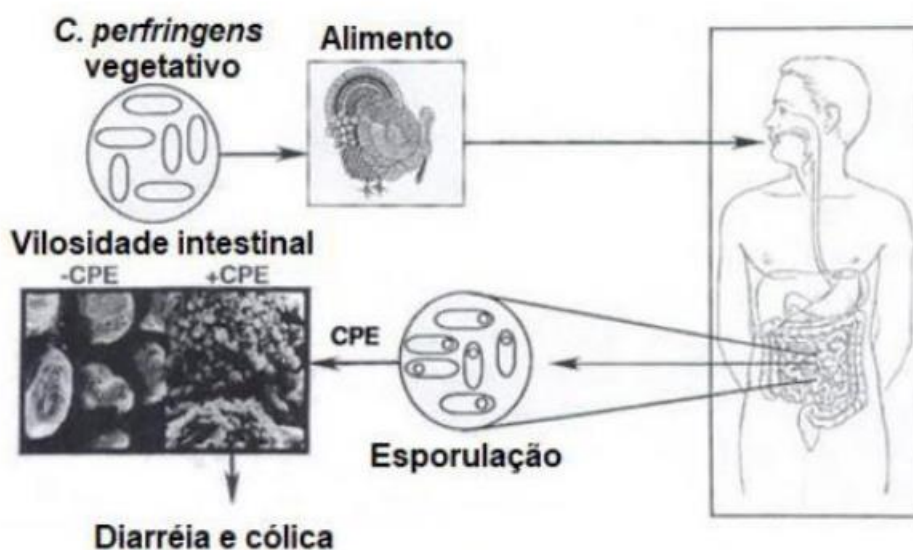
### 3.7. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* é um bacilo gram-positivo, anaeróbico, imóvel e formador de esporos, o que garante sua longa sobrevivência no ambiente. Está bastante associado à superfície de carcaças animais, entre eles, carcaças bovinas. Produtos de carne bovina são bastante associados a surtos causados por este patógeno (FRANCO *et al.*,2008).

É classificado em cinco tipos toxigênicos, de A a E, de acordo com a toxina produzida, no entanto, o tipo A, especial em cepas capazes de produzir a enterotoxina (CPE), o que é comumente associado a toxinfecção alimentar em seres humanos. A dose contaminante é superior a  $10^6$  células/g de alimento.

A toxina é formada durante o processo de esporulação, que ocorre geralmente no intestino e excepcionalmente no alimento.

Na Figura 10, é possível observar a fisiopatologia do *C. perfringens* no organismo humano:



Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

Este microrganismo é facilmente isolado de alimentos, tanto cru quanto processados, mas alimentos à base de carne bovina e de carne de frango têm sido os principais causadores de surtos, que são bastante frequentes e relatados no mundo todo. *C. perfringens* possui capacidade de multiplicação em temperaturas altas, sendo que sua temperatura ideal é de 40 a 45°C, com um tempo de geração baixo, o que torna o patógeno ainda mais perigoso em alimentos que ficam armazenados sob temperaturas inadequadas. A temperatura de 60°C inativa as células germinativas do microrganismo, mas pode não eliminar os esporos do alimento (FRANCO *et al.*,2008).

Os sintomas mais comuns desse tipo de contaminação incluem diarreia e dores abdominais, que têm início de 8 a 16 horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo persistir por até 24 horas antes de serem interrompidas naturalmente em indivíduos saudáveis. Apesar de não ser considerado um quadro especialmente grave, em idosos e pessoas com imunidade comprometida pode chegar a ser fatal.

### **3.8. *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter jejuni* (*C. Jejuni*), é uma bactéria gram negativa, em forma de bacilos curvos, espiralados, muito finos e compridos e móveis por um único flagelo (responsável pelo seu movimento característico em forma de saca-rolha ou vaivém) (TALL *et al.*, 2013).

Atualmente, *C. Jejuni* é considerado a principal causa de doenças bacterianas transmitidas por alimentos na Europa e nos Estados Unidos, sendo que a Food and Agriculture Organization of the United Nations afirma que existe uma carência de notificações de campilobacteriose e estima-se que a taxa real de infecção seja entre 7,6 a 100 vezes superior à relatada (FAO,2019). No Brasil, apesar da subnotificação, o Ministério da Saúde afirma (BRASIL, 2011) que *C. jejuni* é também um importante agente da gastroenterite aguda e crônica, afetando principalmente crianças.

Estudos reportam o isolamento do microrganismo como comensal no trato gastrointestinal de diversos animais, principalmente em aves de criação, o

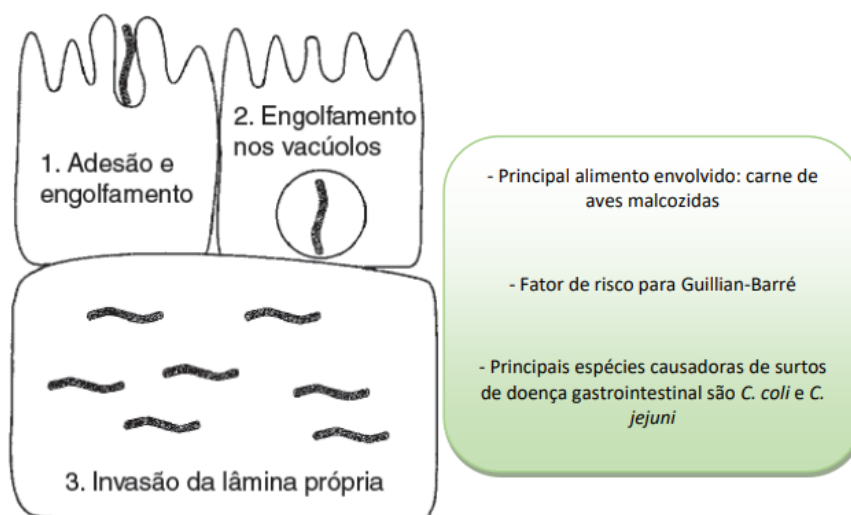
que pode contribuir para a contaminação de alimentos de origem animal, representando um risco potencial para a saúde pública (HUGHES *et al.*, 2005).

O principal fator de risco para a infecção humana é a ingestão e a manipulação de carne de aves, principalmente de frango, crua ou mal processada, mas outros alimentos também são implicados, como carnes de suínos, leite cru, água contaminada.

A doença é caracterizada por diarreia acompanhada de febre baixa e dores abdominais. A doença diarreica persistente e a bacteremia podem ocorrer em hospedeiros imunocomprometidos, bem como em pacientes portadores do HIV. Além disso, existe uma associação clara com a ocorrência da Síndrome de Guillain-Barré sendo que estudos demonstram que, aproximadamente 32% dos pacientes com essa síndrome apresentaram a infecção por *C. jejuni* (WEST *et al.*, 2013).

Na Figura 11, é possível observar o mecanismo de invasão da parede do intestino por *C. jejuni*.

Invasão da parede do intestino por *Campylobacter*:



Fonte: Forsythe (2013). Adaptada.

### 3.9. *Cronobacter*

*Enterobacter sakazakii* é um patógeno oportunista que nos últimos anos vem ganhando a atenção de autoridades de Saúde Pública, em diversos países, pelo crescente número de surtos de infecções. Este patógeno foi recentemente reclassificado como um novo gênero denominado *Cronobacter* spp., que inclui seis espécies: *C. sakazakii*; *C. turicensis*; *C. muytjensii*; *C. malonaticus*; *C. dublinensis*; e *Cronobacter genomospecies* (FAO,2008).

Este gênero vem sendo associado a infecções em indivíduos imunocomprometidos, em especial recém-nascidos, assim como adultos com doenças subjacentes (alta taxa de mortalidade). A forma clínica mais frequente da infecção por *Cronobacter* spp. é a meningite que ocorre em 70% dos casos (CDC,2002). São bactérias gram negativas, que pode sobreviver em alimentos desidratados por até 2 anos. A presença desta bactéria em fórmulas infantis, mesmo em baixa quantidade, pode estar associada ao grande potencial de multiplicação e à elevada resistência térmica desse microrganismo (WHO,2004).

### 3.10. *Shigella*

A *Shigella* (Sh) é uma bactéria gram negativa, não formadora de esporo, altamente contagiosa e que coloniza o trato intestinal. Resistentes a acidez do estômago, estes microrganismos se proliferam no intestino, destruindo o tecido da mucosa intestinal e causando diarreia intensa com sangue e muco (CUNHA *et al.*, 2013).

Em geral, o período de incubação é de 1 a 7 dias. A ocorrência de Shigelose está geralmente associada a higiene pessoal e condições sanitárias deficientes (FRANCO *et al.*, 2018). O gênero da *Shigella* inclui quatro espécies, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* (BASTOS *et al.*, 2010). A *S. sonnei* e *S. boydii* geralmente estão relacionadas às enfermidades mais brandas. A mais comum em países em desenvolvimento é a *S. flexneri*. A *S. dysenteriae* está relacionada à forma mais grave da doença, sendo produtora da toxina Shiga, associada com serias doenças, incluindo a síndrome urêmica hemolítica. Nos Estados Unidos, alguns surtos com *S. sonnei* em salsas frescas mexicanas

foram relatados, sendo que a falta de higiene na colheita e no processo de preparo destes produtos são considerados os responsáveis por estes surtos.

#### 4. Considerações finais

A prevenção de Doenças Veiculadas por Alimentos é uma responsabilidade que deve ser compartilhada por governos, indústrias de alimentos e consumidores. É essencial adotar práticas de higiene adequadas desde a matéria-prima, transporte, manuseio, preparo e armazenamento dos alimentos. Isso inclui lavar as mãos com frequência, evitar a contaminação cruzada entre alimentos crus e cozidos, cozinhar alimentos completamente e refrigerar adequadamente os alimentos perecíveis. Garantir a qualidade e segurança dos alimentos por parte das indústrias, serviços de alimentação e conscientizar a população sobre os riscos associados as DVAs e disseminar informações sobre boas práticas alimentares, são passos cruciais para proteger a saúde pública e reduzir a incidência de novos surtos.

#### 5. Referências

ARNESEN L.P.S; FAGERLUND A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **Microbiol Rev.** 2008. 32:579-606.

BASTOS, F.C.; LOUREIRO, E.C.B. Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp. isoladas em Belém, estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Rev Pan-Amazônica de Saúde.** 2010. v.1, n.4, p.71-74.

BHUNIA, A.K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: Bhunia, A.K. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. **West Lafayette.** 2008. Springer. p.135-147.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **American Journal of Veterinary Research,** v.54, p.1446-1451, 1993.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília, 2012.

BRASIL, Resolução RDC 724, de 01 de Julho de 2022. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. Órgão Emissor: ANVISA –**Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Disponível em:



<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/re-solucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413364812> 22.

BRASIL, Resolução RDC 724, de 01 de Julho de 2022. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. Órgão Emissor: ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/re45-05-solucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413364812>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Módulos de Princípios de Epidemiologia para o Controle de Enfermidades. Módulo 2: Saúde e doença na população / Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília, 2010. 48 p.: il. 7 volumes. ISBN 978-85-7967-020-6. 1<sup>st</sup> den of foodborne disease in 2010. **PLoS Med.** 2015 Dec 3;12(12):e1001923. doi: 10.1371/journal.pmed.1001923.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde**. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília, 2006b. 210p. Disponível em: [http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/guia\\_alimentar\\_conteudo.pdf](http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/guia_alimentar_conteudo.pdf). Acesso em 01 de fevereiro de 2023. 13.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/d-tha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022>. Acesso em: 05 de março de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006a. 88 p. 12.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylo bacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular. Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília, 2011. 40 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>. Acesso em: 01 de março de 2023.

CDC, Centers For Diseases Control And Prevention. Enteric 48 05 bacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 2002;51(14):297-300.

CUNHA, F. P. L.; VILELA, M. L. A. S.; MAXIMIANO, T.; BARBOSA, T. M. M.; GUIMARÃES, D. A. L.; TOLEDO, R. C. C. *Shigella* sp: um problema de saúde pública. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - Campus Ituiutaba, Ituiutaba – MG. **Higiene Alimentar.** 2013 Vol.31 - nº 264/265.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, 2000, v. 13, n. 1, p. 16-34.

DOMINGUES, APARECIDA SÍLVIA. Biofilme de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável: ação bactericida e esporicida de óleos essenciais. 2011. **Dissertação. Universidade Federal de Lavras**, Minas Gerais.

EFSA. (2019). The European union one health 2018 zoonoses report, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **The EFSA Journal (European Food Safety Authority)**, 17 (12), 5926.

FAO, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Risk Assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. in broiler chickens. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/y8145e/y8145e07.htm>. Acesso em 01 de março de 2023.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization/World Health Organization**. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series, 2008]. Disponível em: [[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra\\_followup/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_followup/en/index.html)]. Acesso em: 10 de março de 2023.

FORSYTHE, S. J. (2013). **Microbiologia da segurança dos alimentos** (2. ed.). Porto Alegre: Artmed. 607p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRETZ, R.; SAGEL, U.; RUPPITSCH, W.; PIETZKA, A.; STOGER, A.; HUHULESCU, S.; Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. **Euro Surveillance**, 15, 19477. 3

Food and Drug Administration (FDA). n. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. Second Edition. 2012. 292 p. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>. Acesso em: 10 de março de 2023.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L.; Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int. Journal. 2007. **Food Microbiology**, v.113, p.1-15. 35.

HAGE, E.; MPAMUGO, O.; OHAI, C.; SAPKOTA, S.; SWIFT, C.; WOOLDRIDGE, D.; AMAR, C.F.L.; Identification of six Listeria species by real-time PCR assay. 2014. **Applied Microbiology**. doi:10.1111/lam.12223.

HANCOCK, D.D. BESSER, T.E.; KINSEL, M.L.; TARR, P.I.; RICE, D.H.; PAROS, M.G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, v.113, p.199-207, 1994.

HAVELAAR, A.H., KIRK, M.D., TORGERSON, P.R., GIBB, H.J., HALD, T., LAKE, R.J., PRAET, N., BELLINGER, D.C., DE SILVA, N.R., GARGOURI, N.,

SPEYBROECK, N., CAWTHORNE, A., MATHERS, C. **World Health Organization** global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010.

HUGHES RA, CORNBLATH DR. Guillain-Barré syndrome. **Lancet**. 2005;366(9497):1653-66.

JAY JM. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., & MOBLEY, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2(2), 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.

LUNA, EJA.; Silva JR. Doenças transmissíveis, endemias, epidemias e pandemias. In Fundação Oswaldo Cruz. A saúde no Brasil em 2030 - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]. Rio de Janeiro: **Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República**, 2013. Vol. 2. p.123-176. ISBN 978-85-8110- -016-6.

MALDONADO, A. G. Ocorrência de Salmonella spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. 2008. 75 p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MELO, Eveny, et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão. **PUBVET** v.12, n.10, p.1-9, 2018. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/2602/0f3de0ebab767ca267faa51838f1b223693f.pdf>.

MITTEESTAEDT, S. CARVALHO, V. M., E. coli enterohemorrágica (EHEC) O157H7: uma revisão. **Revista Instituto Ciência da Saúde**, 2016. Jul-set, 24(3). 175-82.

OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. 2004. **RPCV.99** (552) 211-214.

QUINN, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, 2005.

TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; BOISSET-HELBERT, C.; DELESMONT, R.; BODILIS, J.; TOURON-BODILI, A. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. **Journal of applied microbiology**. 2013.v. 114, n. 6, p. 1713-1724

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S. M.C; MACHADO, E. C. 44 05 L.; DUTRA, R.A.F; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2008.13(5): p. 1675-1683.

WEST, C.K.G.; KLEIN, S.L.; LOVELL, C.R. High Frequency of Virulence Factor Genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from a Pristine Estuary. **Applied and Environmental Microbiology**. 2013. v. 79, n. 7, p. 2247-2252.

WHO, **World Health Organization** Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, who estimates of the global burden of foodborne diseases, 2015. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1). Acesso em 01 de fevereiro de 2023.

WHO, **World Health Organization**. (2017). The burden of foodborne diseases in the who european region. World Health Organization. [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publication-V4\\_Web.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publication-V4_Web.pdf).

WHO, **World Health Organization**. Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula. In: JointFAO/WHO Workshop; 2004; Geneva, Sz. Disponível em [<http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/fe-b2004/en/>]. Acesso em 01 de fevereiro de 2023.

## **Autores**

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht, Liris Kindlein

Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Endereço: Avenida Bento Gonçalves, 8834 - Porto Alegre, RS, CEP: 90540-000.

\* Autor para correspondência: [marciamgorodicht@gmail.com](mailto:marciamgorodicht@gmail.com)

---

## Modelagem matemática da inativação da microbiota natural do leite cru em diferentes condições não-isotérmicas

Vanessa Carolina Martins Prina, Daniel Angelo Longhi

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c3>

### Resumo

O tratamento térmico do leite cru é uma operação que tem por objetivo a redução da sua microbiota natural, promovendo a diminuição do risco de veiculação de patógenos. A aplicação de um binômio de tempo-temperatura assertivo pode contribuir para a obtenção de benefícios tecnológicos aos derivados do leite tratado termicamente. O objetivo do presente trabalho foi quantificar e modelar a inativação da microbiota natural do leite cru em diferentes condições não-isotérmicas. Quatro amostras de leite cru foram submetidas a diferentes taxas médias de aquecimento (0,23 °C/min seguida de 0,73 °C/min, 0,80 °C/min, 1,31 °C/min, e 1,74 °C/min) até atingir 90 °C. A enumeração das bactérias viáveis no leite foi realizada com Ágar Padrão para Contagem (PCA) em função do tempo dos tratamentos. Um modelo cinético de primeira ordem e dois modelos secundários (adaptado de Rosso e colaboradores e empírico proposto neste estudo) foram ajustados aos dados experimentais de sobrevivência. Os modelos ajustados aos dados resultaram em índices estatísticos satisfatórios e semelhantes entre si. Os modelos foram validados com dados da literatura, com valores dos percentuais de tendência e discrepância dependentes das taxas de aquecimento dos perfis de temperatura analisados. Portanto, os modelos sugeridos podem ser úteis na análise de processos de inativação térmica da microbiota natural do leite cru.

**Palavras-chave:** microbiologia preditiva, qualidade de alimentos, segurança de alimentos, tratamento térmico.

## 1. Introdução

Leite é o produto da secreção mamária das fêmeas de mamíferos, obtida através da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite obtido dos demais animais devem ser designados conforme sua procedência (BRASIL, 2017). O gado de leite é o principal animal explorado no setor leiteiro, a qual corresponde a cerca de 81,6% da produção global; o restante das parcelas se divide entre os leites de búfala (14,5%), de cabra (2,3%), de ovelha (1,3%) e de camela (0,3%), estes por sua vez mais utilizados para o processamento de derivados lácteos (FAO, 2013; CRUZ et al., 2016; EMBRAPA, 2019).

Devido a seu elevado valor biológico, o leite é tido como o alimento *in natura* mais completo, fonte de proteínas, gorduras, carboidratos e demais componentes essenciais, sobretudo o cálcio, sendo uma das fontes mais adequadas deste nutriente (TRONCO, 2013). Suas características particulares, atreladas à versatilidade de aplicações tecnológicas, culminam na importância deste alimento na dieta humana, em especial nos primeiros estágios da vida (FAO, 2013; TRONCO, 2013; CRUZ et al., 2016).

A elevada quantidade e qualidade de nutrientes presentes, além da alta atividade de água e pH próximo ao neutro, fazem do leite cru um excelente meio de cultura para uma grande variedade de gêneros de micro-organismos. Além disso, más condições de higiene, desde a ordenha até o transporte à indústria, além de desrespeito aos binômios de temperatura e tempo de resfriamento e armazenamento definidos por legislação (resfriamento após a ordenha até 4 °C em até 3 horas, com armazenamento até 4 °C por até 48 horas – BRASIL, 2018), propiciam múltiplas fontes de contaminação ao leite, seja por microrganismos deteriorantes como patogênicos (TATINI et al., 1991).

Tanto o leite destinado ao consumo quanto o leite usado para a fabricação de produtos lácteos devem ser de boa qualidade e passar por pré-tratamentos pertinentes, como a filtração, a padronização e a homogeneização (FAO, 2013; BRASIL; 2017; CRUZ et al., 2017). A qualidade microbiológica do leite recepcionado é um aspecto fundamental a ser observado pelos laticínios, considerando que quanto menores as concentrações microbianas iniciais menores também são as perdas relacionadas a degradação da matéria-prima,

além de abrir a possibilidade de redução da intensidade do tratamento térmico utilizado, sujeitando o leite a tratamentos mais brandos.

O tratamento térmico é uma etapa que normalmente tem por objetivo a eliminação ou redução dos micro-organismos presentes no leite cru. Esse tratamento diminui o risco em potencial de veiculação de doenças transmitidas por alimentos e aumenta a vida útil do leite, já que é proibido pela legislação brasileira o uso de conservantes químicos no leite (TRONCO, 2013; BRASIL, 2017). A diminuição da microbiota presente é essencial para a fabricação de leites fermentados, como no caso do iogurte, já que diminui os riscos de micro-organismos presentes no meio competirem com as culturas iniciadoras, responsáveis pela fermentação. A aplicação do tratamento térmico diminui também a susceptibilidade à sinérese dos géis lácteos, o que é desejável na produção de iogurte, visto que é considerada como um defeito e afeta na percepção da aparência do produto pelos consumidores (SAVELLO, DARGAN, 1997; DAVANÇO et al., 2009). Não obstante, o tratamento térmico favorece o início do crescimento da cultura láctica devido a redução da concentração de oxigênio no leite e da desnaturação proteica, o que influencia no aumento da viscosidade do iogurte e na obtenção de uma textura adequada ao produto (DAVANÇO et al., 2009; TRONCO, 2013).

Os principais tratamentos térmicos aplicados ao leite cru e seus respectivos binômios de temperatura e tempo são a pasteurização lenta (processo *low temperature long time* – *LTLT*), que ocorre entre 63 °C e 65 °C por 30 min; a pasteurização rápida (processo *high temperature short time* – *HTST*), que ocorre entre 72 °C e 75 °C por 15 a 20 segundos; e o processo de ultra alta temperatura (*ultra high temperature* – *UHT*), que ocorre entre 130 °C e 150 °C por 2 a 4 segundos (BRASIL, 2017).

As temperaturas e tempos de pasteurização, rápida ou lenta, são suficientes para inativar os micro-organismos patogênicos, bem como reduzir o número de leveduras, fungos, bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas. De acordo com o artigo nº 255 do RIISPOA, a pasteurização é designada como o tratamento térmico aplicado ao leite com objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de micro-organismos patogênicos

eventualmente presentes, e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais (BRASIL, 2017).

Os tratamentos térmicos de inativação da microbiota presente no leite que são eficazes, entretanto, não consideram o histórico de temperatura do leite até o atingimento da temperatura do processo (taxas de aquecimento). Em tratamentos térmicos lentos (como o *LTLT*) pode ocorrer o crescimento de micro-organismos no início do fornecimento de calor, pois estes são submetidos primeiro a temperaturas favoráveis ao desenvolvimento e, só em seguida, com o aumento da temperatura, são inativados. O crescimento microbiano pode afetar a qualidade da matéria-prima devido, por exemplo, ao aumento da concentração de ácido láctico resultante da fermentação da lactose e pela excreção de enzimas lipolíticas e/ou proteolíticas normalmente indesejáveis na matéria-prima. Portanto, considerar o histórico de temperatura para quantificar o comportamento dos micro-organismos presentes no meio pode levar a um processo mais eficaz que os binômios utilizados atualmente pelos laticínios, isso em conformidade com a legislação, que permite novas combinações de tempo e temperatura de aquecimento, desde que seja comprovada a equivalência aos processos já estabelecidos (BRASIL, 2017).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta capaz de descrever e prever o comportamento microbiano, sendo uma grande aliada no estudo, simulação e otimização de processos, fornecendo precisão e exatidão na tomada de decisões sobre aspectos relacionados à qualidade do produto (McMEEKIN et al., 1997). Estudos como Van Impe et al. (1992) e Dalgaard (1995) já apontavam a microbiologia preditiva como recurso para a predição da vida útil dos alimentos. Chandler e McMeekin (1985) e Griffiths (1994) já recomendavam o uso de modelos preditivos em produtos lácteos, como ferramenta eficaz tanto para determinação do prazo de validade, quanto como indicador da eficácia do tratamento térmico do leite.

Particularmente no processamento de alimentos, a microbiologia preditiva unifica conhecimentos da engenharia, da microbiologia, da ciência de alimentos, da matemática e da estatística para prever o comportamento dos micro-organismos, seja o crescimento, a sobrevivência ou a inativação, através de modelos matemáticos que descrevem, quantitativamente, os efeitos de fatores



intrínsecos (como composição, atividade de água, pH e acidez) e extrínsecos (como temperatura e umidade relativa) sobre o comportamento da microbiota presente no alimento (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

Os modelos preditivos, segundo Whiting e Buchanan (1993), podem ser classificados em níveis de modelagem em modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem as respostas microbianas (crescimento ou inativação) em função do tempo para um único conjunto de condições. A quantificação do comportamento dos micro-organismos em líquidos normalmente é expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

Os modelos secundários descrevem a dependência dos parâmetros cinéticos em função dos fatores de análise (intrínsecos e/ou extrínsecos) (WHITING; BUCHANAN, 1993). Embora o principal fator que controle o comportamento microbiano em um tratamento térmico seja a temperatura, esses modelos podem ser expandidos para incluir demais condições, como, por exemplo, o pH e atividade de água, já que também influenciam na estabilidade microbiana (VAN IMPE et al., 1992; JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003). Exemplos clássicos destes modelos preditivos são os baseados nas equações de Arrhenius (DAVEY, 1991), da Raiz Quadrada (RATKOWSKY et al., 1982) e dos parâmetros cardinais (ROSSO et al., 1995).

Os modelos terciários, por sua vez, são incorporados a *softwares* e programas com interfaces simples, desenvolvidos com o intuito de fornecer previsões para pessoas não familiarizadas com as técnicas de modelagem (WHITING; BUCHANAN, 1993). Estes utilizam combinações de um ou mais modelos primários e secundários para quantificar as respostas dos micro-organismos frente a uma condição ambiental, comparam o efeito de diferentes condições sobre os micro-organismos ou ainda comparam o comportamento de diversos micro-organismos (WHITING; BUCHANAN, 1993).

Uma etapa crucial do desenvolvimento de novos modelos preditivos é a validação, de forma a comprovar o seu desempenho em prever o comportamento dos micro-organismos. A validação é um processo complexo; segundo Baranyi e Roberts (1995), é um grande dilema modelar as respostas do comportamento microbiano em alimentos e gerar modelos que possam fornecer

predições aplicáveis na prática. Isto ocorre devido a variabilidade e complexidade de estruturas presentes nos alimentos e ao fato das respostas serem variadas e facilmente mutáveis de acordo com as circunstâncias intrínsecas e extrínsecas ao meio (BARANYI; ROBERTS, 1995). Além disso, cada etapa da construção do modelo introduz erros, o que torna impossível que as predições do modelo correspondam perfeitamente às observações, o que torna o processo de validação tão complexo (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003). Em suma, no processo de validação deve-se comparar o comportamento predito pelo modelo para o micro-organismo em relação ao comportamento do mesmo micro-organismo observado em alimentos (McCLURE et al., 1994; JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003) e utilizar índices estatísticos para mensurar os desvios entre as predições e as observações experimentais.

Duh e Schaffner (1993) utilizaram índices estatísticos, como a raiz quadrada do erro-quadrático-médio (*RMSE*, do inglês *root mean-squared-error*) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para avaliar a confiabilidade de seu modelo. Ross (1996) propôs os fatores de tendência ( $B_f$ , do inglês *bias fator*) e de exatidão ( $A_f$ , do inglês *accuracy factor*), como índices para a avaliação de desempenho, que fornecem respostas simples e quantitativas em relação a confiabilidade dos modelos. Baranyi et al. (1999), por sua vez, baseados nos fatores *bias* e *accuracy*, propuseram os percentuais de tendência ( $\%B_f$ , do inglês *percent bias*) e de discrepância ( $\%D_f$ , do inglês *percent discrepancy*). O  $\%B_f$  trata-se de uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos pelo modelo, enquanto o  $\%D_f$  é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados (BARANYI et al., 1999).

O conhecimento dos conceitos de microbiologia do leite e microbiologia preditiva são essenciais para estudos relacionados à inativação térmica do leite, já que através deles pode-se desenvolver e estudar modelos que descrevam o comportamento microbiano, e garantir a eficácia e otimização dos processos térmicos aplicados. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi quantificar e modelar o comportamento dos micro-organismos na microbiota natural do leite cru pela aplicação de diferentes taxas de aquecimento.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Obtenção da amostra**

As amostras de leite cru foram obtidas de produtores rurais da cidade de Jandaia do Sul – Paraná e transportadas em recipiente com isolamento térmico ao Laboratório de Microbiologia da UFPR – Campus Jandaia do Sul, onde foram submetidas ao tratamento térmico em diferentes taxas de aquecimento e passaram por análises laboratoriais. As amostras de leite utilizadas para cada um dos quatro experimentos de aquecimento foram coletadas em quatro dias diferentes.

### **2.2. Tratamento térmico**

Os tratamentos térmicos foram realizados em banho térmico encamisado com circulação de água (Nova Técnica/NT 249, 1100 W) contendo 12 L de água destilada. A amostra de 2 L de leite cru foi submetida ao aquecimento em um béquer de vidro de 2 L até que atingisse a temperatura de 90 °C. Para a obtenção de diferentes taxas de aquecimento foram inseridas no banho térmico resistências térmicas adicionais de 500 W e 1000 W. Foram realizados quatro experimentos, cada qual com uma taxa de aquecimento: (i) 0,23 °C/min por uma hora, seguido por 0,73 °C/min; (ii) 0,80 °C/min, (iii) 1,31 °C/min, e (iv) 1,74 °C/min. No experimento com duas taxas de aquecimento diferentes, o leite foi aquecido lentamente a taxa de 0,23 °C/min até 42 °C para permitir o crescimento dos micro-organismos e, em seguida, o leite foi aquecido a taxa de 0,73 °C/min para causar a inativação térmica dos micro-organismos.

Os dados de temperaturas dos processos de aquecimento foram registrados por quatro sensores de temperatura do tipo bastão (PS-2143, Pasco Capstone) posicionados no centro da amostra, na água do banho térmico e nas paredes interna e externa do béquer.

### **2.3. Análises microbiológicas**

#### **2.3.1. Contagem padrão em placas**

Em cada tratamento foram coletadas alíquotas das amostras em temperatura pré-determinados a partir de 25 °C. O método de referência, conforme

recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2022), para enumeração de mesófilos aeróbios viáveis é o de contagem padrão em placas, o qual foi utilizado neste estudo a fim de enumerar a concentração de bactérias totais (CBT) presentes no leite cru. Para o procedimento, uma alíquota de 1 mL da amostra foi pipetada utilizando uma micropipeta automática com ponteira estéril (1000 µL) e adicionada ao tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% esterilizada. Então, a mistura foi homogeneizada em vórtex (modelo 772, Fisatom) por 60 segundos. A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ) foram feitas as demais diluições necessárias.

Para a inoculação, foi semeada 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis e, em seguida, adicionado cerca de 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) fundido e mantido em banho térmico a 46-48 °C. O inóculo foi homogeneizado e posteriormente deixado para solidificar em superfície plana. Para a incubação, as placas foram levadas a estufa incubadora tipo BOD (Caltech) e mantidas invertidas a  $\pm 36$  °C por 48 h. Os micro-organismos que desenvolveram colônias foram enumerados manualmente, sendo o resultado expresso em UFC/mL de leite, levando-se em conta a diluição empregada.

#### 2.4. Modelagem matemática

O modelo primário cinético de primeira ordem, apresentado na Equação (1), foi ajustado aos dados experimentais do estudo, em que  $y = \log N$  (log UFC/mL) é o logaritmo da concentração microbiana em função do tempo  $t$  (min) e  $k$  (1/min) é a velocidade específica.

$$\frac{dy}{dt} = k \quad (1)$$

Em condições ambientais constantes, a velocidade específica, seja de crescimento ou de inativação, é constante. Entretanto, a velocidade específica é função de vários fatores, sendo que a temperatura é um dos fatores que tem maior impacto no crescimento e na inativação microbiana. Os modelos secundários podem descrever a dependência da velocidade específica em função da temperatura. Na literatura, normalmente são apresentados modelos que possuem dependência quadrática entre estas duas variáveis para a faixa de

temperaturas sub-ótimas (RATKOWSKY et al., 1982; WHITING; BUCHANAN, 1993). Para toda a faixa de temperaturas, modelos cúbicos podem ser utilizados. Dois modelos cúbicos foram testados neste estudo com o intuito de descrever a influência da temperatura ( $T$ ) na velocidade específica dos micro-organismos presentes no leite cru.

Um dos modelos utilizados foi adaptado do modelo sugerido por Rosso et al. (1995), apresentado na Equação (2), onde  $k_{ótimo}$  (1/min) é a velocidade específica na temperatura ótima de crescimento ( $T_{ótima}$ , °C), e  $T_{zero}$  (°C) é a temperatura em que a velocidade específica é zero.

$$k = k_{ótimo} \frac{(T - T_{zero})T^2}{T_{ótimo}(T_{ótimo}(T - T_{ótimo}) - (T_{ótimo} - T_{zero})(T_{ótimo} - 2T))} \quad (2)$$

Um modelo secundário empírico cúbico foi proposto neste estudo, apresentado na Equação (3), em que os parâmetros apresentam a mesma interpretação dos parâmetros apresentados na Equação (2).

$$k = k_{ótimo} \frac{(T_{zero} - T)(T - 2T_{ótimo} + T_{zero})}{T_{ótimo}^2 - 2T_{zero}T_{ótimo} + T_{zero}^2} \quad (3)$$

Devido ao caráter dos dados experimentais obtidos em condições não-isotérmicas, utiliza-se a Equação (1) (modelo primário) em conjunto com a Equação (2) ou (3) (modelo secundário) para descrever tanto o crescimento quanto a inativação microbiana sob condições variáveis de temperatura (VAN IMPE et al., 1992; FUJIKAWA et al., 2004).

## 2.5. Dados experimentais da literatura

Dados experimentais obtidos por Abduh e Setiani (2015) foram cedidos pelos autores por meio de comunicação pessoal (*e-mail*). Os dados foram utilizados para a validação dos modelos e parâmetros estimados neste estudo.

Abduh e Setiani (2015) quantificaram a redução das concentrações bacterianas de amostras de leite bovino em tratamentos térmicos que consideraram temperatura e tempo de pasteurização convencionais. Vinte amostras de leite de três produtores distintos foram submetidas ao aquecimento em diferentes taxas seguidas do binômio tempo-temperatura de 72° C por 15 s. Os dados experimentais foram agrupados em quatro diferentes conjuntos de dados (1 a 4), com base nas áreas sob as curvas de tempo-temperatura (*Under Curve Area – UCA*) para o cálculo dos índices estatísticos. Os conjuntos compreendem as seguintes amostras: conjunto 1 (3 amostras – Salatiga 1, 2 e 3), conjunto 2 (3 amostras – Salatiga 4 e Semarang L e K), conjunto 3 (4 amostras – Semarang 6D, 8D, 9D e 14D) e conjunto 4 (10 amostras – Boyolali 21 a 25, 27 a 31). Cada um dos conjuntos foi agrupado considerando o perfil similar de temperatura do tratamento térmico aplicado (taxas de aquecimento seguido de pasteurização e resfriamento das amostras).

## 2.6. Ajustes dos modelos e cálculo dos índices estatísticos

Os ajustes dos modelos aos dados experimentais e as análises estatísticas deste estudo foram realizados no *Microsoft Office Excel* com a ferramenta *solver*. O *solver* é um suplemento de análise de dados do *Excel* usado para a minimização de resíduos a partir de uma fórmula em uma célula, conforme restrições ou limites estabelecidos, sobre os valores de outras células variáveis da planilha (parâmetros do modelo a serem estimados). Os resultados dos ajustes do modelo proposto – Equação (3) e do modelo adaptado de Rosso et al. (1995) – Equação (2) foram comparados.

A capacidade dos modelos em descrever o comportamento microbiano no leite foi avaliada através de índices estatísticos, como a Raiz do Erro Quadrático Médio (*RMSE* – Equação (4)), o coeficiente de determinação ( $R^2$  – Equação (5)), bem como os percentuais de tendência ( $\%B_f$  – Equação (8)) e de discrepância ( $\%D_f$  – Equação (10)) (BARANYI et al., 1999), baseados nos fatores *bias* ( $B_f$  – Equação (6)) e *accuracy* ( $A_f$  – Equação (9)) (ROSS, 1996). Nas Equações (4) a (10),  $pd_i$  e  $ob_i$  são os valores preditos pelo modelo e observados

experimentalmente, respectivamente;  $n$  é o número de observações,  $p$  é o número de parâmetros, e  $\overline{ob}$  é a média da variável de resposta observada.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (pd_i - ob_i)}{n - p}} \quad (4)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (ob_i - pd_i)^2}{\sum_{i=1}^n (ob_i - \overline{ob})^2} \quad (5)$$

$$B_f = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n (\ln pd_i - \ln ob_i)}{n}\right) \quad (6)$$

$$\text{sgn}(\ln B_f) = \begin{cases} +1, & \text{se } \ln B_f > 0 \\ 0, & \text{se } \ln B_f = 0 \\ -1, & \text{se } \ln B_f < 0 \end{cases} \quad (7)$$

$$\%B_f = \text{sgn}(\ln B_f)(\exp|\ln B_f| - 1)100\% \quad (8)$$

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\ln pd_i - \ln ob_i)^2}{n}}\right) \quad (9)$$

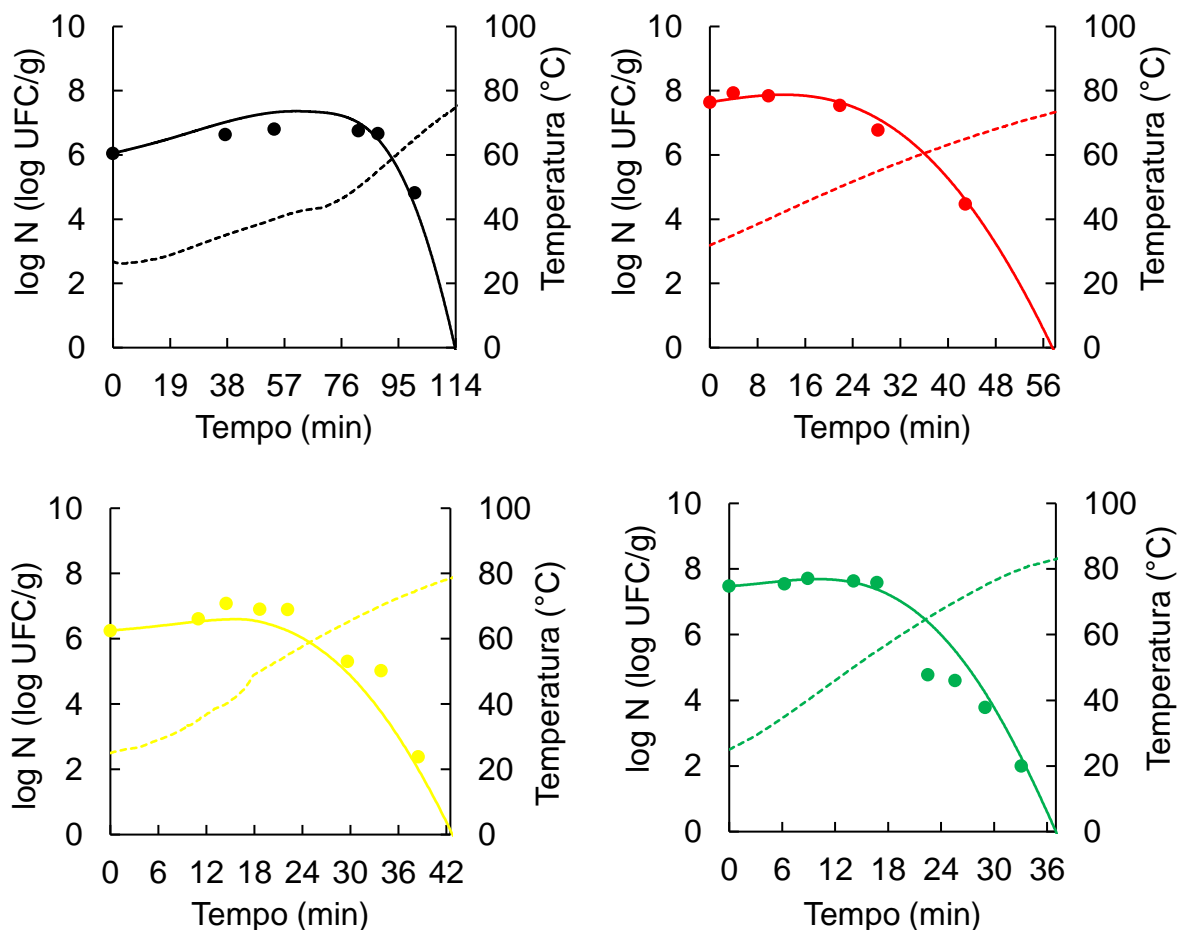
$$\%D_f = (A_f - 1)100\% \quad (10)$$

Sobre a interpretação dos valores dos índices estatísticos, é possível observar que o coeficiente  $R^2$  obtido deve ser positivo e quanto mais próximo da unidade for, tanto maior será a validade da regressão (ALEXANDER et al., 2015). Os resultados de  $RMSE$  devem ser positivos e quanto mais próximo de zero for, maior a capacidade do modelo em representar os valores experimentais. Para a inativação microbiana, um valor de  $\%B_f$  maior que 0% expressa uma falha segura do modelo, pois a inativação predita é menor que a observada, enquanto um valor de  $\%B_f$  menor que 0% indica uma falha perigosa do modelo, pois a inativação predita é maior do que a observada (ROSS, 1996; BARANYI et al., 1999). Os resultados de  $\%D_f$  são sempre maiores ou igual a 0%; quanto maior o valor, mais discrepante é a média das estimativas (BARANYI et al., 1999).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Modelagem do comportamento microbiano durante o tratamento térmico

O modelo matemático empírico proposto neste estudo foi ajustado aos dados dos quatro experimentos em diferentes taxas de aquecimento, conforme apresentado na Figura 1. O modelo ajustado foi apto a descrever a resposta dos micro-organismos em função do tempo nas diferentes taxas de aquecimento. A concentração inicial de bactérias totais presentes nos leites crus nos quatro experimentos de aquecimento variou entre 6,0 log UFC/mL e 7,5 log UFC/mL.



**Figura 1.** Modelo matemático empírico proposto neste estudo (linhas contínuas) ajustado aos dados experimentais (símbolos) do comportamento microbiano em experimentos com diferentes taxas de aquecimento (linhas tracejadas – preta: 0,23 °C/min e 0,73 °C/min; vermelha: 0,80 °C/min, amarela: 1,31 °C/min, verde: 1,74 °C/min).

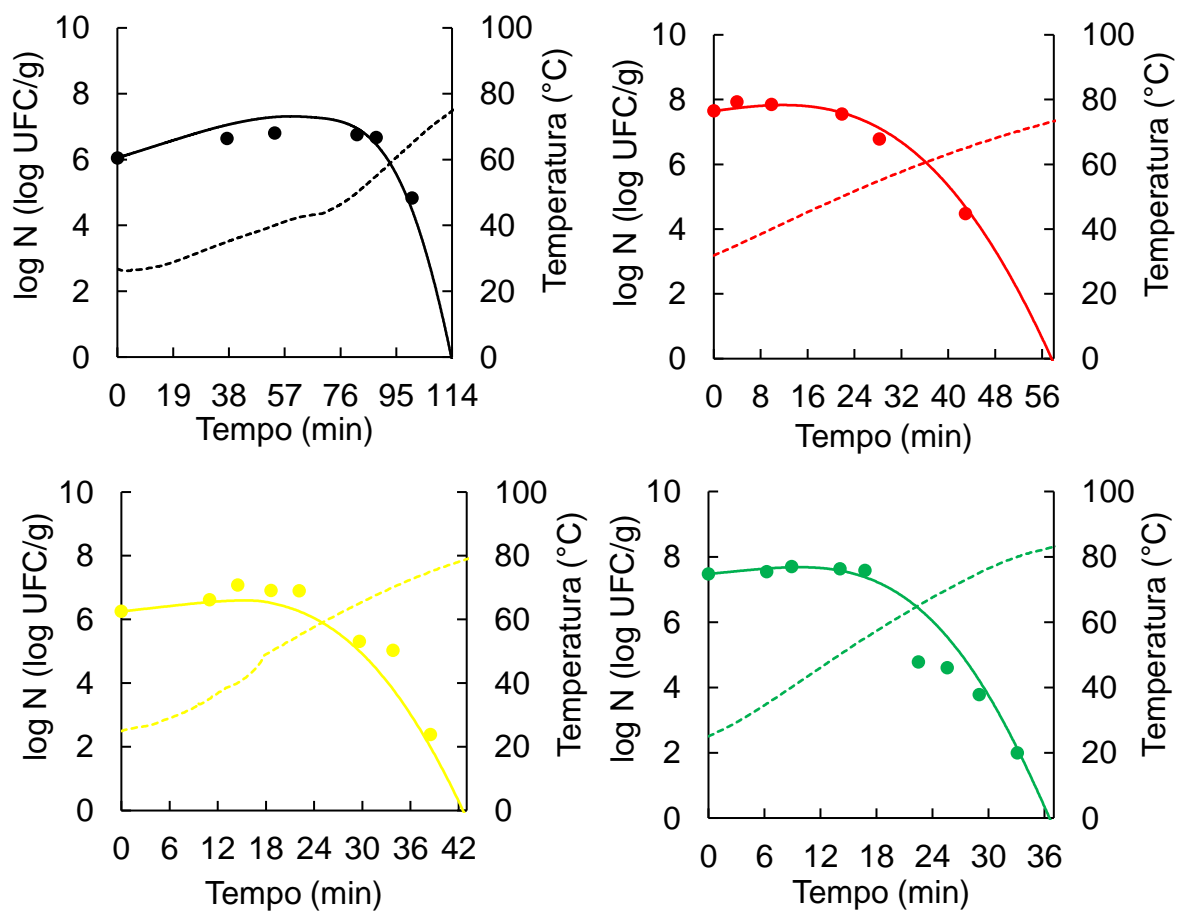


Em geral, os dados experimentais e as curvas obtidas pelo ajuste do modelo empírico proposto neste estudo apresentaram aumentos na concentração de micro-organismos após o início dos experimentos, seguidos por inativações. O experimento com a menor taxa de aquecimento apresentou aumento teórico (descrito pelo modelo) de mais de um ciclo logarítmico (1,26 log UFC/mL) em relação à concentração inicial, o maior aumento quando comparado aos outros tratamentos. O aumento ocorreu após 59 minutos de tratamento. Nas outras taxas de aquecimento, os aumentos teóricos de concentração registrados nas populações foram de 0,19 log UFC/mL (após 12 minutos), 0,21 log UFC/mL (após 9,75 minutos) e 0,35 log UFC/mL (após 15,50 minutos). O modelo preditivo dinâmico, que descreve o crescimento seguido da inativação microbiana, foi aplicado devido ao tratamento térmico lento empregado, onde as amostras de leite foram expostas durante um tempo razoável às temperaturas não-letais aos micro-organismos. Além de não-letais, as temperaturas observadas durante o aquecimento são favoráveis ou ótimas para a proliferação de bactérias, sobretudo mesófilas, que se multiplicam rapidamente na faixa de 30 °C à 40 °C (MAIESKI, 2011), causando o aumento na concentração em relação ao início da inativação.

O tempo necessário para que cada tratamento térmico inative toda a população de bactérias do leite depende da taxa de aquecimento aplicada, conforme já era esperado. O modelo empírico proposto prediz que o tempo necessário para a inativação dos micro-organismos viáveis até a concentração menor que 1 UFC/mL (ou  $< 0$  log UFC/mL) é de 113,8 min, 57,5 min, 42,7 min e 37,0 min nas taxas de aquecimento de 0,23 °C/min, 0,80 °C/min, 1,31 °C/min e 1,74 °C/min, respectivamente. É importante lembrar que as concentrações iniciais das diferentes amostras eram diferentes (variaram entre 6,0 log UFC/mL e 7,5 log UFC/mL), o que interfere no tempo necessário para inativar toda a população de bactérias.

O modelo matemático adaptado de Rosso et al. (1995) também foi ajustado aos dados dos quatro experimentos em diferentes taxas de aquecimento, conforme apresentado na Figura 2. O modelo adaptado de Rosso, assim como o modelo empírico proposto neste estudo, também foi apto a descrever a resposta dos micro-organismos em função do tempo nas diferentes taxas de

aquecimento. As curvas obtidas pelo ajuste do modelo adaptado de Rosso também apresentaram aumentos na concentração de micro-organismos após o início dos experimentos, seguidos por inativações. O modelo adaptado de Rosso prediz que o tempo necessário para a inativação dos micro-organismos viáveis até a concentração menor que 1 UFC/mL (ou  $< 0 \log \text{UFC/mL}$ ) é de 113,7 min, 57,7 min, 42,6 min e 36,5 min nas taxas de aquecimento de  $0,23 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ,  $0,80 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ,  $1,31 \text{ }^\circ\text{C/min}$  e  $1,74 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , respectivamente. Esses valores preditos foram muito próximos dos valores preditos com o modelo empírico proposto neste estudo.



**Figura 2.** Modelo matemático adaptado de Rosso et al. (1995) (linhas contínuas) ajustado aos dados experimentais (símbolos) do comportamento microbiano em experimentos com diferentes taxas de aquecimento (linhas tracejadas – preta:  $0,23 \text{ }^\circ\text{C/min}$  e  $0,73 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , vermelha:  $0,80 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , amarela:  $1,31 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , verde:  $1,74 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ).

Os parâmetros cinéticos  $k_{ótimo}$ ,  $T_{ótimo}$  e  $T_{zero}$  estimados no ajuste de cada modelo aos dados experimentais são apresentados na Tabela 1. É possível observar que os valores dos parâmetros estimados dos modelos foram diferentes, embora razoavelmente próximos. O valor recíproco do parâmetro  $k_{máx}$  pode fornecer uma estimativa do tempo médio de duplicação  $t_d$  (min) das células das bactérias presentes na microbiota natural do leite na temperatura ótima (ou seja,  $t_d = 1/k_{máx}$ ). Desta forma, o tempo médio de duplicação estimado na temperatura ótima (27,5 °C para o modelo adaptado de Rosso e 31,2°C para o modelo empírico proposto) é em torno de 35 min.

**Tabela 1.** Parâmetros estimados no ajuste dos modelos empírico proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995).

<b>Modelo</b>	$k_{ótimo}$ (1/min)	$T_{ótimo}$ (°C)	$T_{zero}$ (°C)
Empírico	0,0286	31,2	42,2
Rosso	0,0282	27,5	41,7

### 3.2. Índices estatísticos do ajuste dos modelos aos dados experimentais

A qualidade do ajuste dos modelos matemáticos a cada um dos quatro conjuntos de dados experimentais nas diferentes taxas de aquecimento foi avaliada por meio dos índices estatísticos  $R^2$ ,  $RMSE$ , percentuais de tendência ( $\%B_f$ ) e de discrepância ( $\%D_f$ ). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Índices estatísticos ( $R^2$ ,  $RMSE$ ,  $\%B_f$  e  $\%D_f$ ) resultantes dos ajustes dos modelos adaptado de Rosso et al. (1995) e empírico proposto neste estudo.

Taxas de aquecimento	$R^2$		$RMSE$		$\%B_f$		$\%D_f$	
	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*
0,23 °C/min e 0,73 °C/min	0,949	0,955	0,321	0,335	0,8	0,8	5,4	5,7
0,80 °C/min	0,986	0,985	0,182	0,173	1,2	1,2	3,0	2,6
1,31 °C/min	0,950	0,947	0,564	0,586	-9,9	-10,4	13,7	14,3
1,74 °C/min	0,925	0,933	0,655	0,644	7,2	7,8	13,2	13,5

\*Emp.: modelo empírico proposto neste estudo.

De forma geral, os modelos apresentaram índices estatísticos muito semelhantes. A comparação do modelo empírico que está sendo proposto com um modelo reconhecido na literatura é de suma importância para sua validação. Os valores de  $R^2$  e  $RMSE$  indicam que os modelos demonstraram melhor ajuste aos dados da taxa de aquecimento de 0,80 °C/min. Os percentuais de tendência e de discrepância são importantes indicadores da confiabilidade dos modelos preditivos. A partir da análise desses valores, suas falhas podem ser classificadas entre perigosas (*fail-dangerous*) ou seguras (*fail-safe*) (ROSS, 1996; BARANYI et al., 1999). Falhas na descrição do comportamento dos microorganismos foram observadas nos dois modelos testados, tanto a partir da análise visual das curvas quanto pela avaliação dos valores de  $\%B_f$  e  $\%D_f$ , sendo que os valores desses índices foram semelhantes entre os modelos, assim como foi observado para os índices  $R^2$  e  $RMSE$ .

O experimento a uma taxa de aquecimento de 1,31 °C/min foi o único em que os modelos proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995) apresentam falhas perigosas na predição. Ambos superestimaram o tratamento térmico, apresentando percentuais de tendência de -10,4% e -9,9%,

respectivamente, indicando que a resistência dos micro-organismos ao aquecimento é menor, e assim a inativação é alcançada em um tempo e temperatura inferior ao que realmente se observa na prática.

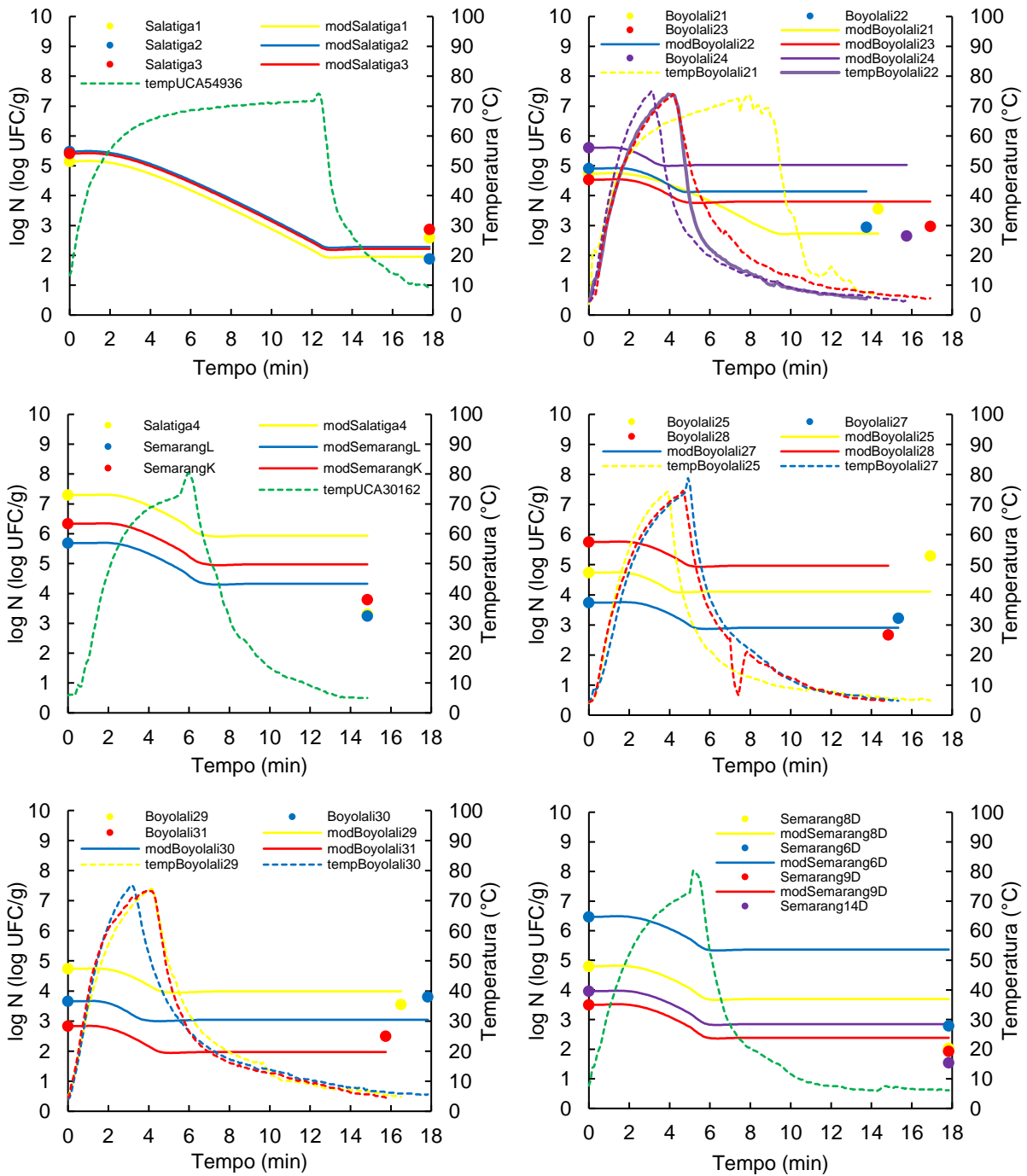
### 3.3. Índices estatísticos da validação dos modelos com dados da literatura

As predições dos modelos proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995) e os dados experimentais de Abduh e Setiani (2015) para as diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras são apresentadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Os valores dos índices estatísticos  $RMSE$ ,  $\%B_f$  e  $\%D_f$  obtidos da comparação dos modelos aos dados experimentais são apresentados na Tabela 3.

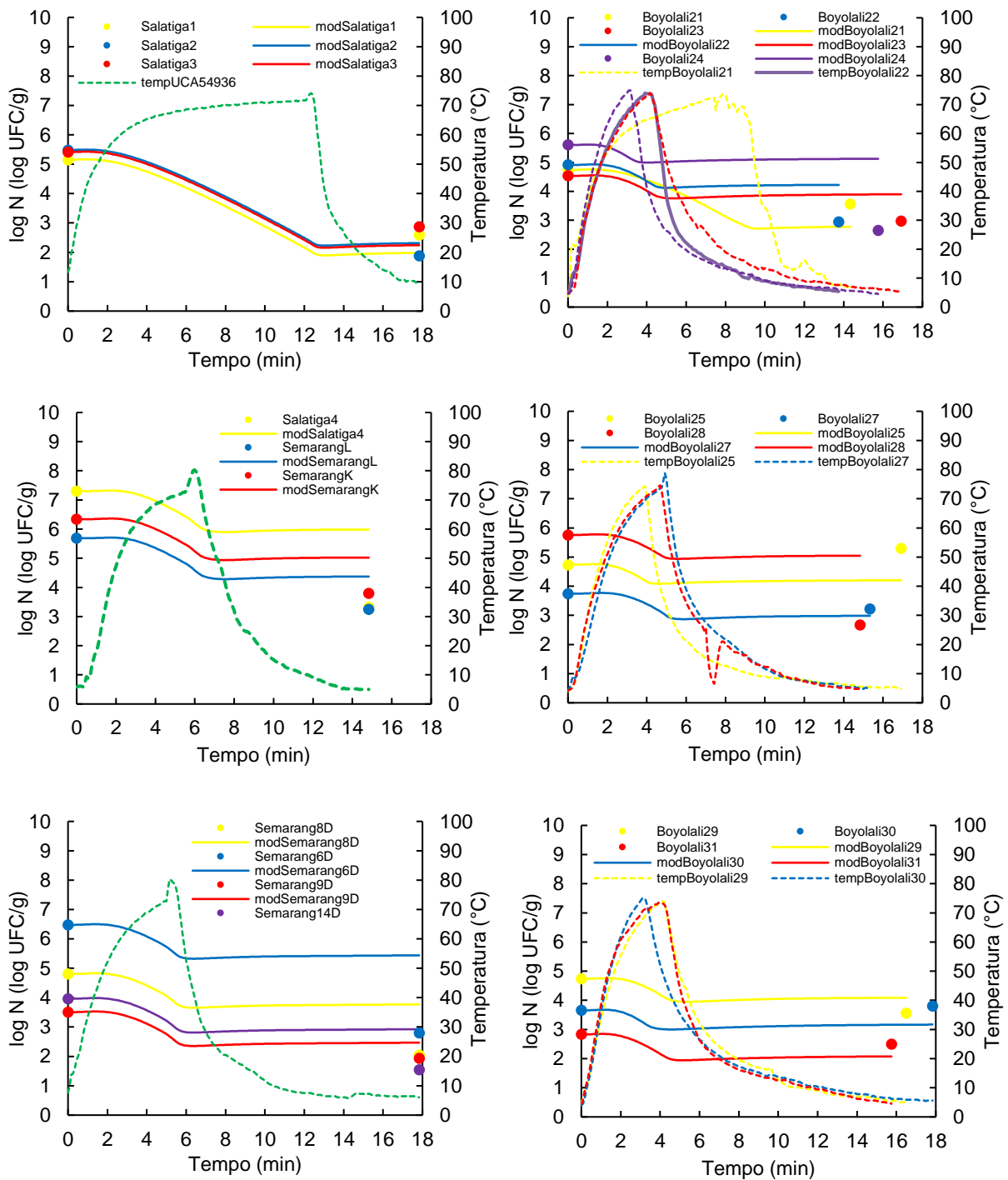
**Tabela 3.** Valores dos índices estatísticos  $RMSE$ ,  $\%B_f$  e  $\%D_f$  obtidos da comparação dos modelos adaptado de Rosso et al. (1995) e empírico proposto neste estudo aos dados experimentais de Abduh e Setiani (2015).

Amostras	$RMSE$		$\%B_f$		$\%D_f$	
	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*
Conjunto 1	0,560	0,580	-10,6	-12,1	27,3	28,1
Conjunto 2	1,820	1,780	47,6	46,3	51,4	50,2
Conjunto 3	1,745	1,674	74,8	67,7	76,4	72,7
Conjunto 4	1,305	1,277	12,1	9,3	42,5	42,2

\*Emp.: modelo empírico proposto neste estudo.



**Figura 3.** Predições do modelo proposto neste estudo (linhas contínuas) e comparação com os dados experimentais (símbolos) de Abduh e Setiani (2015) para diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras (linhas tracejadas).



**Figura 4.** Predições do modelo adaptado de Rosso et al. (1995) (linhas contínuas) e comparação com os dados experimentais (símbolos) de Abduh e Setiani (2015) para diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras (linhas tracejadas).

Os modelos apresentaram índices estatísticos semelhantes entre si para cada conjunto de amostras. Essa similaridade foi observada anteriormente nos ajustes dos modelos aos dados experimentais deste estudo. Analisando os valores de *RMSE*, é possível observar que as predições mais assertivas foram obtidas em relação aos dados do Conjunto 1 (Salatiga 1, 2, 3). Os menores percentuais de discrepância também foram obtidos para o conjunto 1. No entanto, os percentuais de tendência obtidos para o conjunto 1 foram menores que zero, indicando falhas perigosas na predição (BARANYI et al., 1999).

Em geral, quanto maior a *UCA* – área sob a curva de tempo-temperatura, melhores foram as predições do comportamento microbiano pelos modelos matemáticos. Isso ocorre porque os parâmetros do modelo proposto foram estimados para curvas de aquecimento lento, que representam maiores valores de *UCA*, como pode ser observado de forma comparativa nas Figuras 1 e 3, ou Figuras 2 e 4. Por isso, os modelos demonstraram predições com menores discrepância aos perfis de temperatura com menores taxas de aquecimento, como os perfis agrupados no conjunto 1, que são semelhantes aos perfis de temperatura lentos testados neste estudo.

#### 4. Conclusão

As diferentes taxas de aquecimento aplicadas experimentalmente interferiram no comportamento dos micro-organismos. Em temperaturas moderadas (até ~42 °C), observou-se o crescimento microbiano em todos os experimentos. Os modelos matemáticos adaptado de Rosso et al. (1995) e proposto neste estudo foram ajustados aos dados experimentais obtidos neste estudo, obtiveram índices estatísticos semelhantes entre si ( $R^2$ , *RMSE*, % $B_f$  e % $D_f$ ), o mesmo ocorreu para as predições dos modelos aos dados experimentais de Abduh e Setiani (2015). A semelhança observada nas predições de ambos os modelos para um mesmo grupo de dados nos permite concluir a validade do modelo empírico proposto em prever a inativação térmica dos micro-organismos em diferentes condições de aquecimento, visto que a predição deste se compara à obtida por um modelo clássico da literatura.



Portanto, os modelos sugeridos podem ser úteis na análise de processos de inativação térmica da microbiota natural do leite.

## 5. Referências

- ABDUH, S. B. M.; SETIANI, B. E. The reduction of aerobic bacterial counts of bovine milk as influenced by heat-treatments at pasteurization temperatures. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 465-472, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.051>
- ALEXANDER, D. L. J.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R<sup>2</sup>: simple, unambiguous assessment of the prediction accuracy of QSAR and QSPR models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 7, p. 1316-1322, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00206>
- BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 159-166, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00035-5)
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 199-218, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)
- BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 2017. [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm) (acessado 18 abril 2023).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018**. Brasília, 2018. <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/11/2018&jornal=515&pagina=10> (acessado 18 abril 2023).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Oficiais para Análises de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 2022. 1ª ed. [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos\\_oficiais\\_para\\_analise\\_de\\_produtos\\_de\\_origem\\_animal-\\_1a\\_ed-\\_2022\\_assinado.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-_1a_ed-_2022_assinado.pdf) (acessado 18 abril 2023).
- CHANDLER, R. E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 40, n. 1, p. 10-13, 1985.
- CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de leites de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305-317, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00136-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00136-T)

DAVANÇO, F. V.; HARA, E. T.; SATO, R. T.; SIVIERI, K.; REZENDE, C. M.; RENSIS, C. M. V. B. Avaliação do efeito do tratamento térmico na capacidade de retenção de água do iogurte através da metodologia de superfície de resposta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 3-7, 2009.

DAVEY, K. R. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 3, p. 253-257, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02933.x>

DUH, Y.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, v. 56, n. 3, p. 205-210, 1993. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.3.205>

EMBRAPA. **Anuário leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. Embrapa gado de leite. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 104 p. 2019.

FAO. Milk and dairy products in human nutrition. Roma, 2013. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/5067e4f2-53f8-/> (acessado 18 abril 2023).

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 501-509, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.007>

GRIFFITHS, M. W. Predictive modelling: applications in the dairy industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 305-315, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90159-7)

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2003. <https://doi.org/10.4265/bio.8.1>

MAIESKI, L. M. **Os principais microorganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite**. Trabalho de conclusão de Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, 2011.

MCCLURE, P. J.; BLACKBURN, C. W.; COLEA, M.B.; CURTIS, P.S.; JONES, J. E.; LEGAN, J. D.; OGDENE, I. D.; PECKF, M. W.; ROBERTSON, T. A.; SUTHERLAND, J. P.; WALKER, S. J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach.

**International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 265-275, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90156-2)

MCMEEKIN, T. A., BROWN, J., KRIST, K., MILES, D., NEUMEYER, K., NICHOLS, D. S., e SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 541, 1997. <https://doi.org/10.3201/eid0304.970419>

RATKOWSKY, D. A., OLLEY, J., McMEEKIN, T. A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.1-5.1982>

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>

ROSSO, L., LOBRY, J. R., BAJARD, S., & FLANDROIS, J. P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.610-616.1995>

SAVELLO, P. A., DARGAN, R. A. Reduced yogurt syneresis using ultrafiltration and very-high temperature heating. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 573-577, 1997.

TATINI, S. R., MEKALA, P., EL-HABAZ, A., GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 11, p. 861-867, 1991. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.11.861>

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção de qualidade do leite**. 5ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2013.

VAN IMPE, J. F., NICOLAÏ, B. M., MARTENS, T., DE BAERDEMAEKER, J., VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2901-2909.1992>

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, p. 175-177, 1993. <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1017>

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Rosângela Maria Barbosa Gazola e a Gabriela Campaner Salmazo, pelo auxílio na execução dos experimentos; e a Universidade Federal do Paraná – *Campus* Avançado de Jandaia do Sul, pela cessão da estrutura física e materiais de consumo utilizados nos experimentos.

## **Autores**

Vanessa Carolina Martins Prina, Daniel Angelo Longhi\*

Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua Dr. João Maximiano, 426, Vila Operária, 86900-000, Jandaia do Sul, Paraná, Brasil.

\*Autor para correspondência: [ealdaniel@ufpr.br](mailto:ealdaniel@ufpr.br)

## CAPÍTULO 4

---

### Antibióticos – do surgimento ao problema na Saúde Única

Renata Alves Soares, Wania Clelia dos Reis Brito Paranaíba

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c4>

#### Resumo

Apesar de ser um processo natural, é perceptível que o uso indiscriminado de antibióticos acelerou o processo de resistência bacteriana, resultando em uma incapacidade humana de produzir novas drogas eficazes na mesma velocidade e, isso tem demonstrado uma preocupação para a saúde animal e humana. O trabalho buscou revisar a literatura quanto ao uso correto e inadequado de antibióticos na medicina veterinária, bem como explicitar suas consequências para a Saúde Única. Através de levantamento bibliográfico, foram utilizados sites de busca, como PUBMED, PUBVET e SCIELO, e estudado o uso de antibiótico na veterinária e se há impacto na Saúde Única. Como resultado foi possível entender a importância de conhecer o perfil de sensibilidade de espécies bacterianas, a fim de evitar medicamentos obsoletos em razão da resistência e direcionar aos que possuem ação terapêutica, os fatores predisponentes da resistência antimicrobiana e a utilização como estratégia de melhoramento produtivo animal. O conhecimento do patógeno bem como o planejamento e a execução de ações de saúde é fundamental para a escolha do antibiótico ideal e que para evitar resistência podem ser definidas algumas estratégias como a conscientização da população e intensificação de pesquisas para estudo de resistência entre outros. Ademais, o uso profilático de antibióticos não é indicado, exceto em casos cirúrgicos indicados de acordo com a classificação de feridas e, é preciso reavaliar o uso das drogas utilizadas na medicina veterinária, para consequentemente reduzir e evitar complicações na Saúde Única.

**Palavras-chave:** antibióticos; veterinária; resistência; saúde única

## 1. Introdução

Os antibióticos são as substâncias capazes de eliminar ou impedir a multiplicação de bactérias, sendo comumente indicados no tratamento de infecções bacterianas. Porém na medicina veterinária, não ficando restritas apenas ao uso clínico, sendo frequentemente utilizadas de maneira inadequada como forma de profilaxia, metafilaxia e aditivos de desempenho por exemplo, de forma indiscriminada, ao contrário da maneira adequada na qual estas aplicações deveriam ser evitadas (GUARDABASSI et al 2010).

Esta prática promove problemas à saúde humana, devido à presença dos fármacos em produtos de origem animal destinados ao consumo humano (GOTTARDO et al., 2021, MOTA et al, 2005; SPINOSA, 2017), e, associado a isto, a pressão de seleção permite o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos trazendo complicações nos tratamentos de infecções.

Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura visando esclarecer o uso correto de antibióticos na medicina veterinária bem como os fatores que propiciam a ocorrência de microrganismos resistentes, além de direcionar o uso incorreto dos mesmos.

## 2. Resistência bacteriana e os antibióticos

A primeira molécula antimicrobiana foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, enquanto o médico estudava a bactéria *Staphylococcus aureus*. Durante seus estudos, em uma cultura das bactérias em uma placa de Petri, que acidentalmente foi contaminada pelo fungo *Penicillium sp*, o médico observou que onde havia a disseminação do fungo na placa formava-se um halo que impedia o crescimento das bactérias. Fleming entendeu que o fungo produzira alguma substância capaz de interferir na multiplicação da *S. aureus*. No entanto, a penicilina só foi isolada anos depois e só passou a ser utilizada em pacientes humanos combatendo infecções por volta de 1940 (BARBOSA, 2018; GOTTARDO et al., 2021; VALE, 2021).

No início, extraíam os antibióticos diretamente de plantas e microrganismos, porém atualmente com o desenvolvimento da ciência, eles são sintetizados em laboratório (TAVARES, 2014).

Os antibióticos vão agir contra as bactérias podendo ser divididos entre bacteriostáticos e bactericidas, na qual, o primeiro diz a respeito da diminuição da replicação enquanto o segundo vai matar a bactéria (SPINOSA, 2017).

A ação dos antibióticos sobre as bactérias não é linear, assim não é possível ter um medicamento que seja ideal para todas as infecções. Este antibiótico teria como características ter um curto espectro de ação, seletivo, dessa forma não afetaria a microbiota saprófita ou que prejudique as defesas imunológicas do hospedeiro, ao mesmo tempo ser bactericida, de ação rápida e que tenha fácil absorção pelas diversas vias de administração e boa distribuição. Dentre estas propriedades ter um custo em relação a eficácia boa e não induzir resistência também desejável (COSTA, 2017).

Com o uso dos antibióticos na rotina clínica, começou-se a notar que algumas bactérias que não respondiam mais às doses recomendadas, sendo então identificadas como bactérias resistentes. Desta forma entende-se por bactérias resistentes àquelas capazes de crescer “in vitro” nas concentrações médias que os antimicrobianos normalmente atingem no sangue, quando administrados por via enteral (MALVEZZI, 2021; QUINN et al., 2005; VALE, 2021).

Apesar de antibióticos terem sido criados para acabarem ou diminuir com as bactérias, muitas delas têm alta resistência a antibióticos específicos devido a suas características de adaptação (TORTORA et al., 1995).

A resistência é algo natural e inevitável, fazendo parte da biologia natural das bactérias, conformes elas são desafiadas com as moléculas antimicrobianas, naturalmente aparecerão algumas que se tornaram resistentes. Entretanto, o uso indiscriminado das drogas, acelera o processo de resistência, exercendo uma pressão de seleção diferente quando comparada com o uso controlado do fármaco (GOTTARDO et al., 2021; VALE, 2021)

Segundo Quinn et al (2005),

O uso indiscriminado e amplo de antibióticos resulta na seleção de bactérias resistentes, que podem tornar-se predominantes em uma população. Dentre os principais mecanismos que produzem a resistência nas bactérias, estão a produção de enzimas que destroem ou inativam os medicamentos, a redução da permeabilidade das células bacterianas, desenvolvimento de rotas metabólicas alternativas para substituir as que foram inibidas pelas drogas, eliminação da substância da célula e alteração da estrutura do sítio-alvo do antibiótico. (pg. 22)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2019), cerca de 35 mil pessoas morrem por ano por complicações decorrentes de infecções bacterianas resistentes só nos EUA, sendo uma realidade cada vez mais observada no mundo todo, sendo um paralelo com o passado antes do descobrimento dos medicamentos quando as infecções frequentemente eram intratáveis.

Nos estudos de (GOTTARDO, et. al. 2021), é discutida as formas pelas quais as bactérias adquirem resistência. Segundo os autores, pode ser de duas formas: resistência natural, por fatores estruturais das bactérias e a resistência adquirida pelo uso inadequado como:

- dosagens insuficientes ou por tempo prolongado demais
- suspensão do tratamento antes do tempo estipulado pelo médico veterinário
- uso de sobras de antibiótico de um tratamento anterior
- pelo manuseio e descarte de sobras de maneira inadequada

A resistência bacteriana pode ocorrer por alguns mecanismos, entre eles a transferência de genes resistentes, as mutações e a formação de biofilmes. Quando por mutação, pode ocorrer a ativação de bombas de efluxo, produção de enzimas que inativam a molécula, mudanças na estrutura química e desenvolvimento de “barreiras” que impedem a entrada do fármaco na célula, por exemplo. Boothe (2006) afirma que a forma e velocidade de resistência varia para cada microrganismo, a partir de sua classe e gênero, ou seja, alguns desenvolvem mais rapidamente resistência, até mesmo a novas substâncias.

Mota et al. (2005) ainda ressalta a resistência como um problema além da clínica humana e veterinária, sendo uma questão de saúde pública, com estudos



indicando que o uso indiscriminado de antibióticos em animais torna seus produtos uma forma de desencadear resistência a antibióticos para os seres humano. Ainda cita que a capacidade das bactérias de desenvolverem resistência ultrapassa a capacidade humana de produção de novas substâncias para combater estes agentes, aumentando as chances de tratamento não ser mais eficaz em pouco tempo.

### 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Há tantos fatores que influenciam o aparecimento de resistências bacterianas que se faz necessário maior estudo do perfil de sensibilidade de grupos de bactérias com objetivo de evitar medicamentos já obsoletos em questão de eficácia e direcionar o uso de antibióticos que possuam ótima ação terapêutica, principalmente na rotina médica veterinária.

Nesse sentido, em uma comunidade na Bahia-Brasil, Moretto *et al.* (2022) conduziram um experimento para analisar as fontes de microrganismos e a resistência dos mesmos no sistema fluvial da população. Nas amostras de água coletadas, a grande maioria de bactérias encontradas foram as pertencentes dos grupos associados a infecções como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, resistentes a pelo menos um entre os 3 antibióticos testados (CIP, CTX e MPM) e a ciprofloxacina foi o medicamento o qual as *Enterobacteriaceae* obtiveram maior resistência.

Outro patógeno de amplo espectro de resistência é o *Staphylococcus aureus*, comum em mastites, o qual apresentou como taxa de resistência de 99,5% para penicilina, 57% para enrofloxacina e 56% para tetraciclina (NOEL *et al.*, 2016). Também com a finalidade de traçar o perfil de sensibilidade dessa bactéria, Moraes (2020) conduziu um estudo isolando-a em vacas que apresentavam suspeita de mastite e realizando antibiogramas, classificando o halo em três categorias (sensível, intermediária e resistente); a penicilina foi o que apresentou maior resistência enquanto a gentamicina foi o que demonstrou maior sensibilidade, entretanto quando analisadas as amostras de antibiogramas a partir de *Staphylococcus coagulase* positivos a gentamicina teve 100% de sensibilidade e tanto a penicilina quanto oxacilina obtiveram 30% de resistência.

Como o isolamento de agentes em mastites não é popularizado e o custo junto aos testes de sensibilidade é elevado, a definição da droga comumente é realizada de acordo com a manifestação clínica da doença.

É importante verificar o perfil de agentes microbianos e de sensibilidade de patógenos em ambientes hospitalares, uma vez que estes são focos de contaminação com bactérias multirresistentes. No experimento de Sfaciotte *et al.* (2021) em um hospital veterinário, dentre as bactérias multirresistentes selecionadas, as *Staphylococcus* resistentes à metilina (MRS) foram as mais isoladas nas amostras do ambiente seguidas das betalactamase de espectro estendido (ESBL), e estes foram isolados de pontos críticos de contaminação.

Outro estudo testando a contaminação ambiental em pet shops e visando isolar bactérias zoonóticas como as enterobactérias obteve como resultado a tetraciclina sendo o antimicrobiano de maior resistência (44%) com polimixina B em sequência (38%) e somente 19% das cepas isoladas não apresentou resistência aos antibióticos testados (MARQUES *et al.*, 2021).

#### **4. Antimicrobianos na Medicina Veterinária**

Sabemos que a procura por medicamentos sem prescrição veterinária é um fator agravante. A venda irregular de medicamentos de uso veterinário deveria ser mais fiscalizada e possuir normas mais rígidas. Coibir o acesso indiscriminado aos medicamentos é uma medida que pode diminuir o avanço desenfreado da resistência bacteriana

O trabalho realizado por (GOTTARDO, *et al.*, 2021) buscou verificar esta prática entrevistando 22 produtores na Região Noroeste do Rio Grande do Sul. Neste estudo constataram que 90,91% deles possuíam antibióticos guardados na propriedade, e que 82% não obedecem a frequência e o tempo do tratamento indicado na bula. E ainda que 100% dos entrevistados não realizam nenhum tipo de exames para o diagnóstico da enfermidade, sendo que 90% aplicam o antibiótico que possui na propriedade ou consulta o atendente da loja agropecuária.

Como mencionado anteriormente, muitos produtores animais utilizam antibióticos como uma estratégia de melhorar a produtividade e conseqüentemente seus lucros. Basicamente, essa estratégia causa redução das bactérias intestinais e conseqüentemente diminui a competição por nutrientes com o animal. Porém além de desencadear a manutenção de bactérias multirresistentes, reduz a eficácia de cura desses medicamentos sobre as bactérias patogênicas.

Por inconclusão de explicitar esta situação pela dificuldade identificar quais animais foram expostos a antibióticos e a presença de multirresistentes simultaneamente, um estudo em Uberlândia teve como fim analisar o resultado da inclusão de quinoxalínico na ração de frangos em relação a presença de *E. coli* e Enterobacteriaceae lactose negativa (ELN) na flora fecal destes animais, bem como suas resistências.

Nesse estudo, Pessanha e Gontijo Filho (2001) obtiveram como resultado que a prevalência de *E. coli* e ELN resistentes já era observada desde o início das coletas, entretanto ao longo do experimento foi favorecida pela ação do quinoxalínico. O experimento também cita que a resistência para tetraciclina possuía taxas elevadas, provavelmente por ser um antibiótico de uso comum e profilático entre os criadores de frangos de corte.

De modo geral, os grupos de antibióticos mais utilizados para a veterinária, entre seu uso clínico e na alimentação, são as penicilinas, tetraciclina, cefalosporinas, quinolonas, ionóforos, beta-lactâmicos etc. (PERCIO *et al.*, 2019). Em estudo, Van Boeckel *et al.* (2019) relacionaram que entre as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* os antibióticos com maiores quadros de resistência foram sulfonamidas, penicilinas e tetraciclina, e mesmo com essa situação grave, estima-se que o uso e consumo destes produtos na produção animal até 2030 terá aumentado em 67% para suprir a demanda consumidora de proteínas animais (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Além disso, mesmo com a finalidade não terapêutica, estes medicamentos geram um grande impacto ambiental, isto porque não são metabolizados completamente e seus restos são eliminados nas fezes e urina.

No estudo publicado por (FREITAS, et al, 2016), com queijos produzidos com leite cru, encontrou *E. Coli* em aproximadamente 63% das amostras. Nestas amostras encontrou-se altos níveis de resistência a antibióticos como a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e ciprofloxacina do grupo das fluorquinolonas. Ainda *Staphylococcus spp.*, foi encontrada em diferentes amostras de requeijão e foi descrito no trabalho de (HACHIYA, et. al., 2017), inclusive a coagulase-negativa que apresenta resistência à metilicina.

Uma vez que são eliminados, podem se acumular e se espalhar pelo solo, além de serem absorvidos por plantas e colocarem em perigo o consumo alimentar humano. A quantidade a ser eliminada é variável, sendo dependente do tipo de substância, a dose, o tipo e a idade do animal etc. segundo Regitano (2010), e conseqüentemente o padrão de contaminação também será variável. Entre os antibióticos com maiores capacidades de disseminação ambiental são citados: algumas lincomicina, tilosina, amoxicilina e sulfadiazina, por usos em criações animais e aquicultura (BOXALL *et al.*, 2003).

## 5. O uso racional de antibióticos

A resistência microbiana é um problema de saúde pública listado como uma das grandes ameaças à saúde humana em World Economic Forum Global Risks (BLAIR et al., 2015) e provável saúde animal também. Toda infecção acontece a partir de um agente biológico invadir o sistema imune e conseguir superar e esquivar de todas as suas defesas e aderindo aos tecidos, comprometendo as funções desse tecido e suas funções fisiológicas, pois obterão nutrientes a partir dele (CUNHA et al, 2008). Por isso, planejamento, organização e execução de ações educativas de saúde, contenção e preventivas da disseminação de patógenos resistentes ou não em qualquer ambiente depende do reconhecimento das doenças para que possa se ter o melhor tratamento para aquela doença específica com o antibiótico ideal.

A fim de evitar novos casos de resistência algumas estratégias podem ser aplicadas, Scaldaferrri *et al.* (2020) citam:

- a conscientização da população, que é fundamental para a terapêutica correta;
- a intensificação de pesquisas, tanto para estudo do mecanismo de resistência quanto para otimizar as doses eficazes;
- o monitoramento de resistências, implementando programas de vigilância para a veterinária a princípio em áreas de produção animal e indústria de alimentos;
- pontos de corte epidemiológicos para determinar o perfil local;
- as medidas sanitárias, como antissepsia e limpezas constantes de ambientes e materiais hospitalares, com protocolos seguidos rigorosamente, já que hospitais são considerados locais de seleção de agentes infecciosos em geral;
- a diminuição de tratamentos empíricos, aguardando o resultado das culturas para decidir o melhor fármaco para o tratamento;
- a regulamentação de venda de antibióticos, que muitas vezes são vendidos sem receita em casas agropecuárias;
- a restrição do uso de antibióticos como fatores de promoção de crescimento, comumente utilizados em animais saudáveis de produção, em subdosagens, para favorecer o crescimento, e muitos produtores ainda resistem ao banimento desta prática.

Antes da prescrição de um antibiótico alguns critérios devem ser avaliados como a comprovação de uma infecção de origem bacteriana (ou suspeita clínica bem fundamentada), excluindo a possibilidade de infecção por outros microrganismos. Ademais, deve-se escolher corretamente o antibiótico, de acordo com sua classificação, para que sua eficácia seja efetiva e o mesmo evite o surgimento de novos casos de resistência. Para isso, o ideal é que seja realizada uma cultura e analisados testes de sensibilidade (VIMIEIRO; OLIVEIRA, 2021).

Entretanto em casos em que não é possível seguir tal protocolo, a escolha deve ser feita de maneira empírica, de acordo com o tipo de agente conhecido previamente, com o tratamento variando de acordo com o grau de imunidade e saúde do animal além de seu histórico, e a sensibilidade dos microrganismos do local às substâncias, sendo recomendada pelo menos uma citologia antes

(HILLIER *et al.*,2014). Dessa forma, é possível escolher dentro de um grupo de ação, os medicamentos que mais se adequam e em caso de necessidade, trocá-lo por outro semelhante com maior eficácia do mesmo grupo.

Além disso, os antibióticos podem ser utilizados em alguns casos profiláticos em cirurgias, para isso deve ser seguida a classificação de feridas cirúrgicas, que é de uso comum para o reconhecimento de infecções, avaliando o potencial de ocorrência, o tipo de ferida etc. (ANVISA, 2017). Segundo essa classificação, feridas categorizadas como limpas, em sua grande maioria, não devem fazer uso de antibióticos como terapia. E no caso de cirurgias de feridas infeccionadas, potencialmente contaminadas ou que por alguma outra razão foi necessária a aplicação profilática, o uso dos antibióticos posteriormente à cirurgia deve ser avaliado caso a infecção seja confirmada e se faz necessária a troca por outro que não tenha sido utilizado como forma profilática (ARIAS *et al.*, 2013).

## **6. Considerações finais**

Os antibióticos estão sendo utilizados de maneiras incorretas, principalmente na medicina veterinária, o que afeta tanto a chance de tratamento de animais como a segurança de consumo de derivados de animais de produção, uma vez que os subprodutos metabolizados desses fármacos são muitas vezes consumidos indiretamente pelos seres humanos, desencadeando novas resistências e um problema de saúde única.

O ideal é o uso destas drogas apenas como tratamento e de forma direcionada, pelo isolamento do patógeno e teste de sensibilidade antes de iniciar o tratamento, porém em casos que não é possível deve-se fazer a escolha de maneira empírica com base nas informações que o médico veterinário possui, de forma racional e consciente, portanto, o conhecimento dos grupos de antibióticos bem como das características das bactérias é fundamental para este auxílio.

## 7. Referências bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sítio Cirúrgico – Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. 2ª edição. Março, 2017.

ARIAS, M. V. B. et al. Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 771–779, 2013.

BARBOSA, H.; GOMEZ, J; TORRES, B. **Microbiologia Básica: bacteriologia**. Segunda edição. São Paulo: Atheneu, 2018.

BLAIR, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BOOTHE, D. M. Principles of antimicrobial therapy. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, [online]. 2006; v. 36, n. 5, p. 1003–1047. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.07.002>. Acesso em: 04 mai. 2023.

BOXALL, A. B. A., KOLPIN, D. W., HALLING-SØRENSEN, B., & TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology*, [online]. 2003; v. 37, n. 15, p. 286A-294<sup>a</sup>. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es032519b>. Acesso em: 04 mai. 2023.

COSTA, A. L. P., & Junior, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, UNIFAP, 7(2), 45-57, 2017.

CUNHA, S. et al. **Doenças Infeciosas: O desafio da Clínica**. Coimbra, 2008.

FREITAS, Ronilson Ferreira, et al. "Estudo da Disciplina de Farmacologia Nos Cursos De Graduação em Farmácia da Região Sudeste do Brasil." **Revista da Universidade Vale do Rio Verde** 14.1, p 921-929, 2016.

GOTTARDO, A. TEICHMANN, C. E. ALMEIDA, S. - Uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária e o risco para saúde pública - *GETEC*, v.10, n.26, p.110-118, 2021.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Artmed, Porto Alegre. 268 p, 2010.

HACHIYA, JAMILE DE OLIVEIRA et al. Isolamento de *Staphylococcus* spp. Resistente à meticilina de queijos fundidos requeijão e especialidade láctea tipo requeijão comercializados no Brasil. *Ciência Rural*, [online]. 2017; v. 47, n. 7. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/174708>. Acesso em: 04 mai. 2023.

HILLIER, A. et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 163-e43, 11 abr. 2014.

MALVEZZI, A. O uso excessivo de antibióticos na medicina veterinária associada à resistência bacteriana. UniCEUB. Brasília, 2021.

MARQUES, A. R. et al. Zoonotic bacteria research and analysis of antimicrobial resistance levels in parrot isolates from pet shops in the city of Fortaleza, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 4 out. 2021.

MORAES, M. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. Pubvet, [online]. 2020; v. 14, n. 05. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6>. Acesso em: 04 mai. 2023.

MORETTO, V. T. et al. Microbial source tracking and antimicrobial resistance in one river system of a rural community in Bahia. **Journal of Biology**, Brazilian, Brazil. v. 82, 2022.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C. da; FREITAS, M. F. L. de; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. da. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NOEL, C., MOTTA, F. S., FRANCISCO, N. L. da S. G., DE ALMEIDA, N. R., & SOARES, L. de C. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus* spp. Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. **Revista de Saúde**, v. 7 n. 1, p. 22–26, 2016.

PERCIO, C.; BARRETA, D. A.; SILVA, E. R.; ZOTTI, C. A. Bovinocultura de corte brasileira sem o uso de antibióticos: Consequências e alternativas. **Horizontes Das Ciências Sociais Rurais**, n. 2, p. 306– 321, 2019.

PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 111–115, fev. 2001.

QUINN, B. M. CARTER, WJ D - **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª edição. São Paulo: Artmed. 2005. 511p.

REGITANO, J. B., & Leal, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34, 601-616, 2010.

SCALDAFERRI, L. G. et al. Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. Pubvet [online]. 2020; v. 14, n. 8, p. 1–10, [acesso 04 jun 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n8a621.1-10>. Acesso em: 13 jun. 2023.

SFACIOTTE, R. A. P. et al. Detection of the main multiresistant microorganisms in the environment of a teaching veterinary hospital in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021.



SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TAVARES, Walter. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. Terceira Edição. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2015. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Genebra, 2014. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 02 mar. 2023.

TORTORA, G.J.; FUNKI, B.R.; Case, C.L. **Microbiology an introduction**. 5th edition; ed. Benjamin/Cummings, 1995.

VALE, V. R & MEDEIROS, M. - Resistência aos antimicrobianos na Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, UnB, 2021.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 19 mar. 2015.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. **Science**, v. 365, n. 6459, p. eaaw1944, 19 set. 2019.

VIMIEIRO, P. DE S.; OLIVEIRA, L. L. DE. Antibióticos na clínica cirúrgica de animais de companhia: Revisão. Pubvet, [online]. 2021; v. 15, n. 9, p. 1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n09a918.1-10> . Acesso em: 13 jun. 2023.

## **Autores**

Renata Alves Soares<sup>1</sup>, Wania Clelia dos Reis Brito Paranaíba<sup>2\*</sup>

1. Graduanda em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-010.
2. Docente do Programa de Graduação em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-010.

\* Autor para correspondência: [wania@pucgoias.edu.br](mailto:wania@pucgoias.edu.br)

---

## Verificação dos padrões globais do conhecimento científico sobre a microbiologia forense

Marcos Vinicius Sena de Oliveira, Rodrigo Coelho Silva, Flávia Melo Rodrigues

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c5>

### Resumo

A microbiologia forense é uma área em expansão que tem se beneficiado dos avanços nas tecnologias de biologia molecular e bioinformática. Com esses métodos, a análise microbiana tem se mostrado aplicável em diversos aspectos da investigação criminal, incluindo identificação humana, determinação do intervalo pós-morte e investigação de biocrimes. Este trabalho teve como objetivo analisar quantitativa e descritivamente os padrões globais das publicações sobre microbiologia forense em resoluções de crimes. Para isso, utilizou-se a ferramenta cienciometria, selecionando artigos da base de dados Scopus, por meio da leitura dos títulos e resumos. Foi criada uma planilha de análise, contendo informações como nome do autor, título do artigo, ano de publicação, revista publicada, país de origem, palavras-chave, objetivo de cada trabalho e número de citações. Foram encontrados um total de 53 artigos publicados sobre microbiologia forense, sendo o primeiro em 2016. Os anos de 2019 (n = 7) e 2021 (n = 8) destacaram-se como os anos com maior número de publicações. As palavras-chave mais frequentes foram "microbiologia" (n = 24) e "microbiologia forense" (n = 22). A autora que se destacou com o maior número de publicações foi Javan (n = 8). Apesar de sua relevância, a área da microbiologia forense ainda não é muito difundida no contexto de resolução de crimes e perícia científica, especialmente no Brasil.

**Palavras-chave:** Biologia; Cienciometria; Criminalística; Microbiologia-Forense.

## 1. Introdução

As Ciências Biológicas são compostas por várias ramificações, sendo elas, áreas concentradas de pesquisa, atuações acadêmicas ou técnico-científicas e profissionais. Dentre essas, vale lembrar a Biologia Forense, base referencial em que a temática do presente trabalho se encontra e se sustenta, desenvolvida logo a seguir. Dessa forma, é possível entender a mencionada área como a que se desenvolve e abrange a área investigativa e criminal, que envolve diversas subáreas, como: a entomologia; a genética; a toxicologia; a biologia molecular; a botânica; e a microbiologia, principal cerne desta pesquisa (AZEVEDO, 2009).

Para o desenrolar de suas funções, os biólogos forenses examinam principalmente o sangue, outros fluidos corporais, cabelos, ossos, plantas, insetos e outros animais que possam servir de auxílio na identificação de possíveis suspeitos no processo criminalístico. As tecnologias são de grande apoio na análise laboratorial, de forma que revelam o que a infinidade de elementos encontrados em um espaço investigativo pode indicar sobre o que ali ocorreu. Além da área criminal, a Biologia Forense também pode contribuir na investigação de empresas acerca de crimes ambientais ou que ameacem a qualidade de vida humana e animal (HURLEY et al., 2009).

O avanço dos estudos comparados em Biologia e as contribuições científicas de vários pesquisadores e cientistas ao longo dos séculos, são fatores primordiais que possibilitaram os inúmeros avanços nos estudos biológicos, assim como em suas subdivisões especializadas atualmente conhecidas. Assim como outras recentes ciências nascidas e/ou aprimoradas a partir da aliança com as tecnologias contemporâneas, a Microbiologia Forense é um dos ramos de destaque e renome crescente do século XXI, principalmente pela contribuição judicial e no desfecho adequado nos casos de crimes sexuais ou de bioterrorismo (CARDOSO, 2020).

O desenvolvimento da Biologia e da Genética Forense, antecedentes à Microbiologia Forense, aconteceu fortemente na década de 1980 nos EUA e na Europa Ocidental, para principalmente guiar a justiça na determinação de paternidade. No ano de 1985, o geneticista britânico Alec Jeffreys realizou importantes estudos que puderam indicar além das características únicas de cada indivíduo em nível celular, o que ele chamou pela primeira vez de “impressões digitais do DNA”. Na década de 1990, a técnica PCR - denominada

“reação em cadeia da polimerase”, que amplifica e revela uma ou mais cópias de excertos de um ou mais DNAs -, pôde se difundir e determinar em algumas horas a origem de diversas amostras biológicas, com o foco justamente no ampliar do DNA humano, ainda que seja alterado por outras espécies (LIMA, 2007).

Assim, a ampliação das técnicas advindas com as inovações tecnológicas, intensificadas a partir dos anos 2000, fez cada vez mais evidente a especialização das partes que dizem respeito à Microbiologia, às miudezas dos elementos de uma análise. Dessa forma, a Microbiologia Forense é responsável pelos estudos capazes de identificar e classificar os microrganismos presentes em diferentes ambientes e objetos orgânicos, focados na resolução de uma cena criminal ou acidental a partir de perspectivas investigativas. A partir disso, é possível realizar laudos de autópsias, favorecer na precisão das causas, efeitos e condições dos óbitos analisados, atos imprescindíveis na qualificação detalhada das ocorrências (DE LA SEN et al., 2012).

A importância dessa área está presente toda vez em que já foi e/ou ainda é possível especificar a origem de cada material biológico, de cada vestígio em um ambiente de análise e investigação. As provas materiais têm ganhado atenção excepcional no âmbito criminal nacional e internacional principalmente por estarem mais “detectáveis”, haja vista a popularização de diversas tecnologias de apoio que permitem comparações e contrastes em nível celular. O trabalho dos peritos e dos profissionais forenses e suas contribuições é o que tem possibilitado sua expansão e os intensificados investimentos na área, ainda que no Brasil, caminhe de maneira mais lenta (DOREA, 2003).

A presente pesquisa se faz extremamente relevante atualmente, de maneira que contribui às atividades e pesquisas acadêmicas da atualidade ao realizar um compilado atualizado de informações sobre as pautas da perícia microbiana. Da mesma forma, também pode contribuir à comunidade geral ao fornecer conhecimento simplificado e esmiuçado a respeito dessa nova disciplina, superdesenvolvida sobretudo nas duas últimas décadas. O tema reúne interesses comuns e científicos, pretende expor entre paralelos entre os conteúdos que tangem as áreas da tecnologia, da biologia molecular, além de explorar os diversos conceitos da criminalística e das ciências forenses correlatas (LIMA, 2007).

Ainda sobre a ciência forense e a microbiologia, é possível dizer que são uma relação intrínseca entre a Medicina, a Biologia, as questões de Saúde Pública e a Criminalística. Seja na verificação casos de Bioterrorismo - conceito que será posteriormente desenvolvido -, no processo de investigação de crimes sexuais, ou na decomposição de cadáveres, o dito post-mortem, as Ciências Forenses se mostram cada vez mais conhecidas, ainda que em outras nomenclaturas. Algumas áreas também recentes, como a paleomicrobiologia e a possibilidade de traçar perfis de DNA, são outras aplicações importantes que têm ganhado espaço tanto para a compreensão e retomada histórica, quanto para o mapeamento e estudos genéticos ou o rastreamento de indivíduos específicos (MARTINELLI, 2017).

Objeto ou ferramenta da própria Criminalística, a microbiologia conjunta às técnicas investigativas tem raízes em épocas em que as ciências sequer possuíam fibra metodológica e objetos definidos. Depois de séculos de desenvolvimento científico, da modernização da Medicina, da Física, da Química e do reconhecimento científico formal das Ciências Biológicas no século XVIII, a Ciência Forense como é conhecida e voltada ao campo criminal, teve origem no século XIX, com Hans Gross (BARBOSA; BREITSCHAFT, 2006; GRASSBERGER, 1957).

Diante do exposto o tema possivelmente possui muitas publicações e para averiguar a produção científica sobre microbiologia forense são usadas as ferramentas disponibilizadas pelo método da Cienciometria ou Cientometria, ditos por Chapula (1998), como “[...] o estudo dos aspectos quantitativos da ciência enquanto uma disciplina ou atividade econômica”. Vale lembrar que a Cientometria se difere das relativas Bibliometria e Informetria, de modo que objetiva ratificar os assuntos de interesse, em que local se encontram e o quanto os especialistas de determinada área estão a se comunicar - enquanto as outras se ocupam por relacionar livros, documentos, artigos ou palavras-chave (MACIAS-CHAPULA, 1998).

Os estudos que envolvem a cienciometria, assim, se encarregam de avaliar de forma profunda e consistente as diversas produções científicas, sob a ótica de indicadores numéricos e o uso de análises estatísticas reconhecidas. De forma geral, ela traça perfis entre distintos campos científicos, conseguem estabelecer panoramas de epistemologia ou comportamento de determinado

grupo a partir de suas produções científicas publicadas, entre diversas atividades afins. A maior parte das pesquisas cienciométricas são realizadas na América do Norte, Europa e Japão, e o periódico *Scientometrics* é o representante mais comum entre eles. Adiante, também veremos algumas das razões que explicam o fenômeno, assim como serão demonstrados dados estatísticos que contribuem ao entendimento (RAZERA, 2016).

Afinal, tratando das formas de desenvolvimento da Ciência no Brasil, apesar das crescentes produções ao estilo cienciométrico, é notável que a área de Educação em Ciências ainda não consegue acompanhar a tendência desse crescimento. Nota-se principalmente por conta da falta de dados de divulgação, relatos e periódicos que indiquem e demonstrem justamente o que tem sido feito (ARAÚJO; ALVARENGA, 2011).

Portanto, este estudo teve como objetivo verificar os padrões globais das tendências do conhecimento sobre microbiologia forense em resoluções de crimes, além de levantar o principal objetivo de cada um dos dez estudos mais citados e construir uma nuvem de palavras com termos mais citadas nos artigos.

## **2. Materiais e Métodos**

Primordialmente foi realizada uma análise cienciométrica em artigos, buscando o aprimoramento sobre o tema a fim de compreender, interpretar e fazer observações no decorrer da pesquisa. Para o levantamento retrospectivo de dados foi determinado o uso da base de dados bibliográfica multidisciplinar Scopus (<https://scopus.com/>), observando as publicações que pesquisaram sobre a microbiologia forense na elucidação de crimes contra a vida e fauna microbiológica post-mortem.

A busca dos dados por meio da base de dados Scopus foi realizada em abril de 2022. Para definição dos termos de busca foram lidos na íntegra cinco artigos relacionados ao tema e observados os termos que mais se repetem nos títulos e palavras-chave. Portanto, os termos descritivos utilizados na busca dos dados na base de dados do Scopus, foram as palavras: "forensic microbiology" OR "postmortem bacterial flora" OR "post mortem microbiology" OR "thanatomicrobiome". A pesquisa dos termos foi feita no título, resumo e palavras-chaves dos artigos. Foi utilizado o operador booleano OR para ampliar a busca dos dados e o uso de aspas indica o termo exato de busca.

Após busca inicial dos artigos na base Scopus, eles foram filtrados sendo submetidos a critérios de inclusão e exclusão durante o processo de triagem dos documentos, feito a partir da leitura dos títulos e resumos. Para a Inclusão dos artigos, foram selecionados todos os artigos científicos e que abordam sobre a microbiologia forense na resolução de crimes e fauna microbiológica post-mortem. Além disso, foram selecionados artigos redigidos nas línguas inglesa, portuguesa e espanhola. Para a exclusão de artigos, foram seguidos os seguintes critérios: estudos que não sejam artigos científicos, tais como livros, capítulos de livros, conferências, também artigos em línguas diferentes das estipuladas, artigos que fogem ao tema, artigos duplicados e estudos que o acesso do texto na íntegra não foi possível.

Após a seleção destes artigos foi criada uma planilha no Excel contendo os seguintes dados: o nome do autor, título do artigo, ano de divulgação, revista publicada, país de origem, palavras-chaves, objetivo de cada trabalho e número de citações. Após feita esta planilha, foi realizada uma análise estática descritiva dos resultados em forma de gráficos e planilhas para melhor visualização.

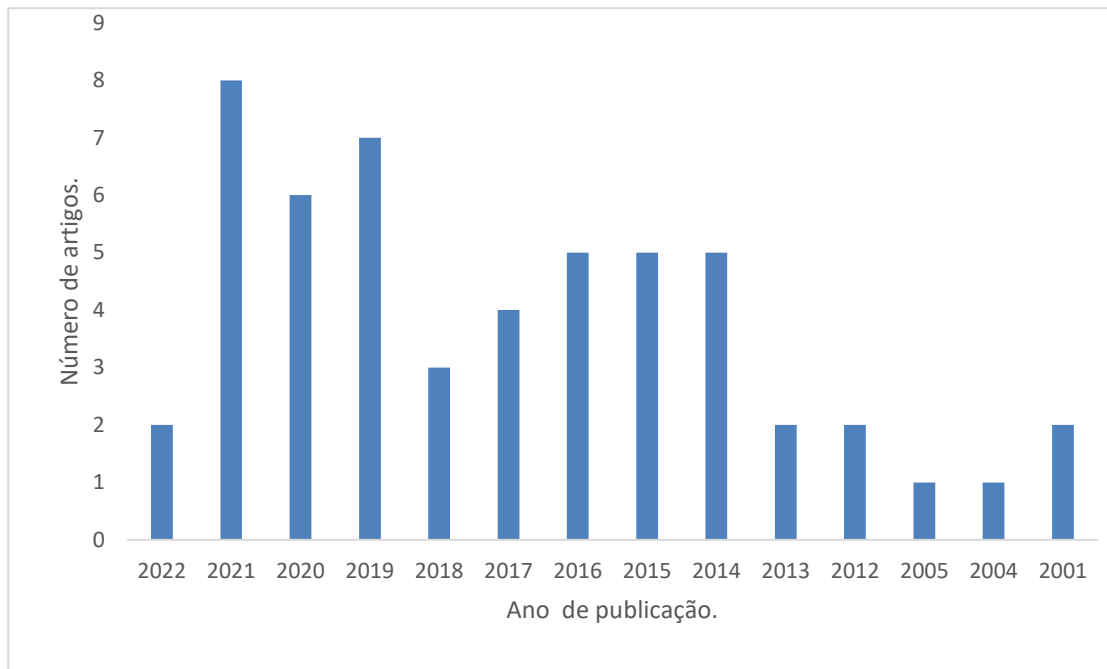
### 3. Resultados e Discussão

Com relação a quantidade de artigos publicados por ano sobre a microbiologia forense, destacaram-se os anos de 2021 ( $n = 8$ ), 2019 ( $n = 7$ ) e 2020 ( $n = 6$ ), portanto estudos recentes (Figura 1).

O termo tanatomiobioma vem da palavra grega “thanatos” cujo significado pode ser descrito como “morte”, este termo é parcialmente novo, explicando a atualidade dos artigos publicados. Fundamenta-se no estudo das comunidades de microrganismos habitam as cavidades e órgãos após a morte de um indivíduo. Com os avanços na área científica, foi constatado que a maior parte dos microrganismos encontrados em um corpo após sua morte são anaeróbios obrigatórios, como o caso do *Costridium spp* (JAVAN; FINLEY, 2018).

Com os avanços no campo de pesquisa sobre a recenticidade é sobre a profusão da quantidade de seres que agem na decomposição cadavérica, é possível notar que existe uma lacuna de esclarecimento sobre tais organismos específicos na decomposição de órgãos internos. Após a morte, o sistema imune para de responder, assim os microrganismos começam a se multiplicar de forma

propícia devido ao ambiente ser rico em nutrientes para seu desenvolvimento (JAVAN *et al.*, 2016b).



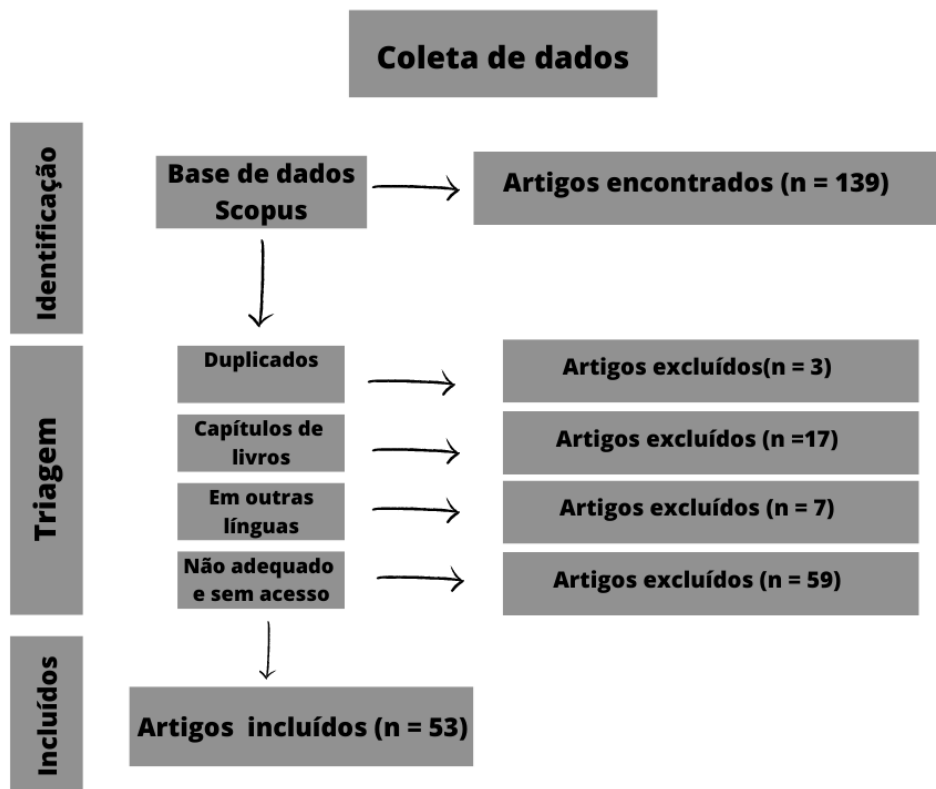
**Figura 1.** –Número de artigos publicados por ano sobre microbiologia forense. Fonte: autor, 2022.

Para a análise quantitativa dos dados sobre a microbiologia forense foi realizada na base bibliográfica Scopus, sendo esta utilizada por sua abrangência no número de artigos, foram encontrados um total de 139 artigos relacionados ao tema. Após a triagem, os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados, de maneira que incluiu 53 artigos (Figura 2).

A base de dados Scopus foi criada em novembro de 2004, contando com mais de 5.000 editoras internacionais, engloba várias áreas de conhecimento, tais elas como a tecnologia, medicina, ciências sociais tecnologias e humanidades. Os tipos de artigos cobertos no Scopus são publicações que possuem número de série padrão internacional, como periódicos, séries de livros e algumas conferências em série, ou publicações não seriadas que tenham um número de livro padrão internacional como única publicação de livros ou conferências pontuais. Para garantir que cobertura, descoberta, perfis e medição



de impacto para pesquisa em todas as áreas temáticas, o Scopus compreende diferentes tipos de fonte de conhecimento (ELSEVIER, 2022).



**Figura 2.** Fluxograma do número de artigos encontrados e selecionados sobre microbiologia forense após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Fonte: autor, 2022.

Após a coleta dos artigos foi desenvolvida uma tabela com os dez estudos mais citados, (Tabela 1). Destaca-se também que entre os dez estudos mais citados sobre o tema, os anos de publicação variaram entre os anos de 2001 e 2018 (Tabela 1).

A pesquisa de Javan *et al.* (2016a) com 104 citações (Tabela1), teve como finalidade aferir o tempo pós-morte com a utilização de microrganismos, assim os resultados obtidos foram constituídos através do sequenciamento de *amplicons* (DNA amplificados) em 66 espécimes microbianas de 27 cadáveres humanos reais com intervalos post mortem entre 3,5 -240 horas foram coletados. Como resultado, foi possível perceber uma diferença significativa dos valores da

diversidade de táxons bacterianos em relação ao sexo, sendo que em cadáveres de mulheres o gênero com maior presença é o *Pseudomonase Clostridiales*, enquanto em homens os gêneros bacterianos mais numerosos são *Clostridium*, *Clostridiales* e *Streptococo*. Além disso, o resultado da pesquisa demonstrou que o sequenciamento em *amplicons* é mais eficaz para classificar o tanatômico bioma humano de cadáveres encontrados em cenas de crime (JAVAN *et al.*, 2016a).

O estudo de revisão de Javan *et al.* (2016b), com 75 citações, fornece um exame crítico da pesquisa emergente relacionada ao tanatômico bioma e comunidades epinecroticas e como cada um é estudado (Tabela 1).

O objetivo central do estudo realizado por Carter em 2015 que recebeu 61 citações (Tabela1) foi validar que as comunidades microbianas post-mortem podem sim, ter uma alteração significativa quando são influenciadas pelos micróbios do solo. Para tal comprovação, foi observado as variações que existe na temperatura no solo em relação ao tempo, sendo que no inverno a temperatura da superfície do solo variou de -18,3 a 25,5 -C e no verão foi de 11,7 a 25,5 -C. Além disso, foi analisado a decomposição bruta da carcaça que, por sua vez, apresentou uma diferença significativa na mudança de estação, onde foi perceptível a análise de que as carcaças encontradas no inverno exibiram melhor conservação e uma decomposição mais visível em comparação ao verão. Sendo assim, os resultados basearam-se em estudar as variações que o filo bacteriano expressa durante a decomposição (CARTER *et al.*, 2015).

A avaliação das comunidades microbianas e identificação das assinaturas taxonômicas correlacionadas aos cadáveres humanos, fazem parte do objetivo central da pesquisa realizada por Finley em 2016 com 56 citações (Tabela1). Dessa forma, os resultados constituíram-se por meio do experimento de colocar cadáveres enterrados em pontos específicos ou na superfície da terra para que fosse analisado o intervalo de decomposição e enterramento. Com isso, foi possível perceber que a comunidade bacteriana encontrada no solo de cadáveres demonstrou uma diminuição significativa na sua diversidade. Além do mais, os cadáveres que foram posicionados na superfície mostraram uma redução nas comunidades de Acidobactérias e Verrucomicrobia (FINLEY, 2016).

**Tabela 1.** Autores seguidos do ano de publicação, número de citações e o objetivo principal de cada trabalho sobre microbiologia forense.

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Número de Citações</b>	<b>Objetivo Principal</b>
Javan et al.	2016a	104	Estimar o tempo pós-morte com auxílio de microrganismos
Javan et al.	2016b	75	Examinar de modo crítico pesquisas emergentes relacionadas a comunidades tanatômicas.
Carter	2015	61	Demonstrar que comunidades microbianas post-mortem mudam de maneira específica e reprodutível influenciadas pelos micróbios do solo.
Finley	2016	56	Avaliar comunidades microbianas e identificar as assinaturas taxonômicas associadas aos cadáveres humanos.
Tsokos; Püschel	2001	51	Avaliar o valor e praticabilidade de culturas bacteriológicas post mortem.
Javan	2017	48	Propor o impacto da seleção da região hipervariável para o gene 16S rRNA na diferenciação de perfis tanato-robômicos.
Oliveira; Amorim	2018	36	Utilizar microrganismos como prova acessória em processos criminais.
Riedel	2014	32	Fornecer uma visão geral das evidências baseadas na literatura sobre utilização dos exames microbiológicos post mortem.
Adserias-Garriga et al	2017	28	Retratar as mudanças sucessionais do tanatômico-microbioma na cavidade oral com destaque para uso em casos e estimar o intervalo post mortem, a partir de uma lógica ecológica.
Adserias-Garriga et al	2017	25	Identificar comunidades da microbiota do solo envolvidas na decomposição humana por meio do sequenciamento de DNA.

Fonte: autor, 2022.

Com base nos artigos selecionados, foi feita uma nuvem de palavras com os termos que estavam citados nos artigos sobre a microbiologia forense da base de dados *Scopus*. Temos em destaque nesta figura de palavras-chaves “*microbiology* (24) e “*forensic microbiology*“ (22) (Figura 3).

A Microbiologia Forense, como já citado, é uma subárea da biologia que tem a finalidade de promover a identificação e classificação dos microrganismos que são encontrados em diversos ambientes (DE LA SEN *et al.*, 2012). Para compreender esse campo de estudo faz-se necessário o entendimento do termo microbiologia, assim o primeiro pressuposto utilizado para descrever o conceito de bactéria foi apresentado por Roger Bacon no século XIII, o qual dizia que as algumas doenças eram originadas de organismos invisíveis, e foi a partir dessa hipótese que ao longo da história foram surgindo novas definições até chegar no conceito atual, que, por sua vez, consiste da descrição do organismo como seres procarióticos que carecem de carioteca (MOLINARO; CAPUTO, AMENDOEIRA, 2009).

Outro termo que deve ser utilizado para justificar o conceito de Microbiologia Forense é o conceito de forense (do inglês, *forensic*). Segundo Barros *et al.*, (2021), as ciências forenses podem ser descritas como práticas científicas para elucidação de crimes, ajudando nos âmbitos legais, tais como, civil, penal e/ou administrativos. Tem como principal finalidade a busca e obtenção de indícios que manifestam práticas delituosas, a fim de corroborar com as autoridades na aplicação da legislação. O papel do perito criminal é de confirmar ou excluir um delito, a fim de evitar uma condenação injusta de um inocente.

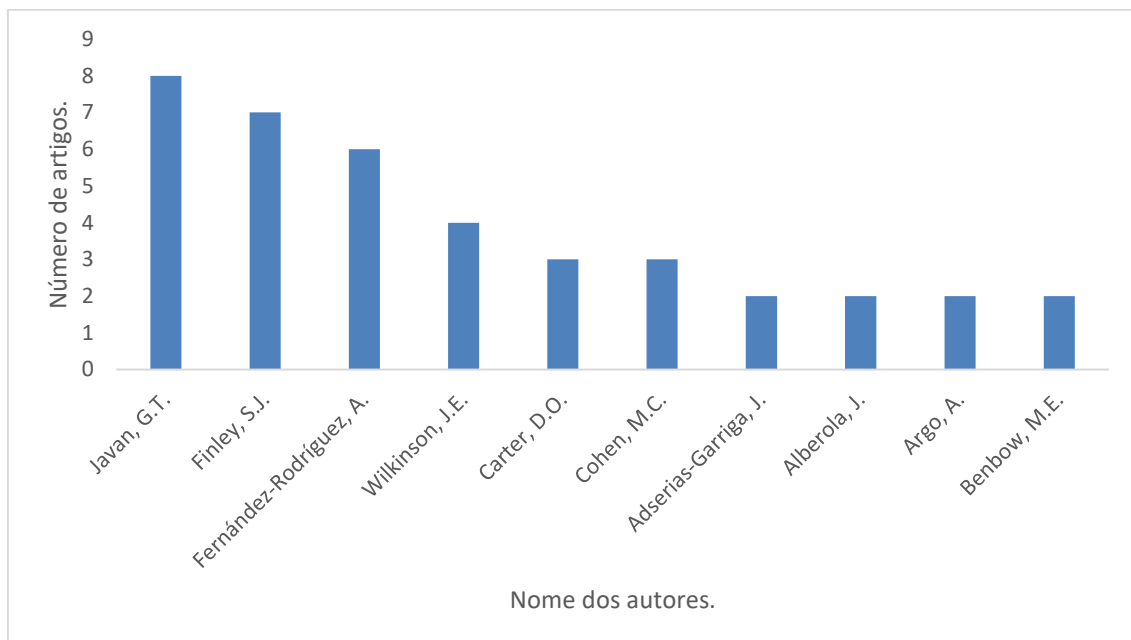
Desta forma, este campo de estudo tem como objetivo levantar hipóteses do crime através dos vestígios encontrados no local, a fim de formalizar o exame de corpo de delito, criando uma prova para o auxílio da justiça (CALAZANS; CALAZANS, 2005).



científica forense e cunhou novos termos no campo forense, como “*the thanatomicrobiome*” (microbioma da morte) e “*Postmortem Clostridium Effect*” (efeito de Clostridium pós morte) para descrever a proliferação de micróbios para a determinação do tempo de morte (RESEARCH GATE, 2022).

Javan foi responsável por introduzir um novo termo nos ramos forenses, “*Thanatomicrobiome*”, na 66ª reunião anual de ciências forenses da academia americana (AAFS) em meados de 2014. Seus atuais projetos utilizam do sequenciamento de próxima geração, citometria em tecidos de cadáveres em decomposição, diversidade microbiana em solos sob decomposição cadavérica e entomologia para determinação do tempo pós-morte. (LOOP, 2022).

Sheree J. Finley é Ph.D. em Microbiologia pela *Alabama State University* desde 2018, é mestra em bioquímica pela *Auburn University* em 2000 e tem bacharelado em Química pela *Tuskegee University* em 1996. Atualmente seu interesse de pesquisa compreendem a microbiologia post mortem envolvendo sequenciamento de *amplicon* de RNA 16S e análises bioinformáticas de tecidos de cadáveres de casos e sepulturas de cadáveres de doação voluntária para desvendar a causa, tempo e possível causa da morte (LOOP, 2022).



**Figura 4.** Lista com os dez autores com pelo menos duas publicações no ramo da microbiologia forense. Fonte: autor, 2022.

Em relação as instituições que mais publicaram artigos sobre a microbiologia forense, destacam-se dez instituições com pelo menos duas publicações. (Figura 5). As instituições que mais publicaram artigos relacionados ao tema foram *Alabama State University*, *Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses* e *Reseach and Testing laboratory*, com oito, sete e três publicações, respectivamente (Figura 5).

A *Alabama State University* (ASU) é uma universidade pública em Montgomery, Alabama que foi fundada em 1867 por William Paterson. A ASU envolve-se em um contexto histórico de perseverança e progresso, uma vez que, a sua criação deu-se a partir da idealização de construir uma escola para os negros do Alabama na década de 80. O fim da Guerra Civil também resultou com o fim da escravidão, e como consequência a possibilidade de negros terem acesso à educação, fato que incentivou nove escravos libertos a instituir uma escola de ensino superior para afro-americanos (ASU, 2018).

O *Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses* (INTCF) é um órgão vinculado ao Ministério da Justiça, cuja função principal é promover dados para o aprimoramento de parâmetros científicos e no desenvolvimento de uma qualificação da perícia analítica. Além disso, o INTCF é encarregado de operar as investigações e análises toxicológicas que são enviadas pelos Médicos Forenses, pelas Autoridades Governamentais, pelas Autoridades Judiciárias e pelo Ministério Público. No cenário histórico, o instituto foi fundado em 1887 a partir do Decreto Real de 11 de julho de 1886, que fundou os Laboratórios de Medicina Legal em Madri, Barcelona e Sevilha, e em 1935, os laboratórios foram consolidados perante o nome do Instituto Nacional de Toxicologia (MINISTERIO DE JUSTICIA, 2022).

O *Reseach and Testing laboratory* (RTL) é um laboratório que trabalha com extração de amostras e com plataformas de sequenciamento de última geração, tais como *Illumina MiSeq*, *Illumina HiSeq*, *Pacific Biosciences (PacBio)*, além disso, a RTL proporciona a organização de bibliotecas de bioestatística e de bioinformática. A RTL foi fundada pelo Dr. Randy Wolcott, médico especialista e precursor de métodos inovadores para o tratamento de feridas. Atualmente a RTL é um laboratório que tem parcerias em 50 estados, 30 países em todo o mundo (RTL, 2022).

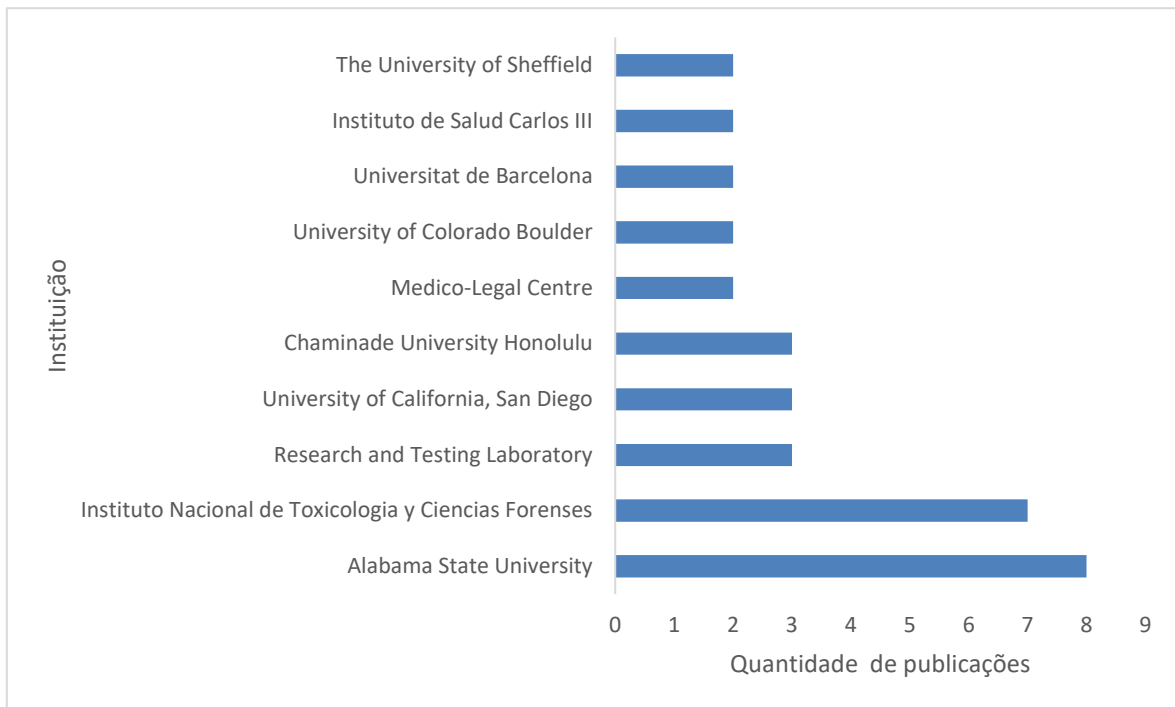


Figura 5 – Dez maiores instituições com pelo menos dois artigos publicados sobre a microbiologia forense. Fonte: autor, 2022.

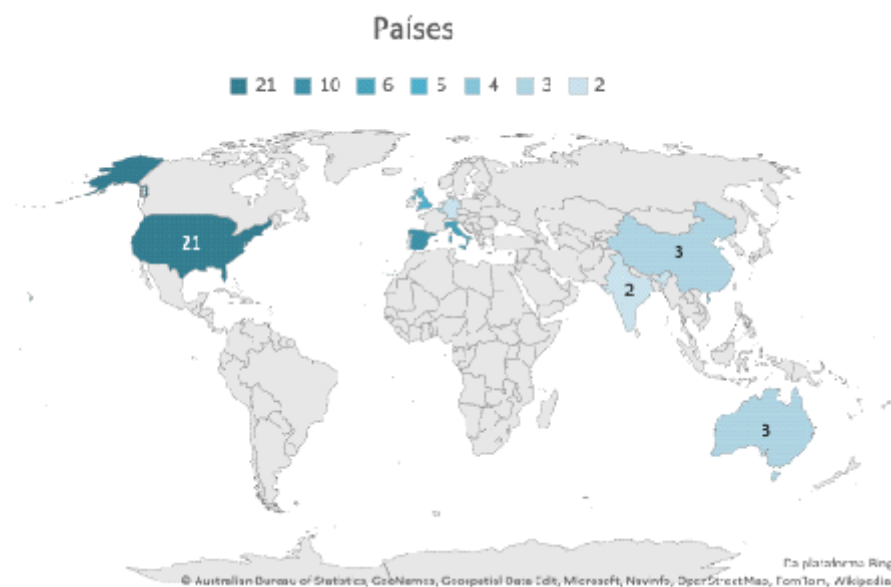
Quando se fala sobre os países com maior número de publicações na área da microbiologia forense, destacam-se: EUA com 21 artigos; França com 10 artigos; Itália com 6 artigos; Inglaterra com 5 artigos; Bélgica com 4 artigos; China e Austrália com 3 artigos; Alemanha e Índia com artigos (Figura 6).

O artigo intitulado “Investimentos em P&D do governo Norte-americano: Evolução e principais características”, por Negri & Squeff (2014) trata justamente de um panorama acerca dos investimentos nas áreas científicas nos EUA após a graduação. O artigo mostra que os investimentos têm se mantido estáveis desde a década de 70, após a alta - que correspondeu a mais de 3% do PIB total, em relação a quase 3% em outros períodos - entre os anos de 1963 e 1968, por conta da Guerra Fria.

Quando falamos do Brasil em relação a ciência, há um recente corte de verbas do Governo Federal nas áreas de Ensino Superior. Faltando menos de 20 dias para a transição entre governos, o contingenciamento é o quinto que ocorreu apenas no ano de 2022. Diversas Universidades Federais já emitiram



notas oficiais, alegando dificuldades ou impossibilidade de arcar até com despesas básicas como energia, pagamentos de terceiros e custeamento de restaurantes universitários. Um dos principais afetados com os cortes são os bolsistas de variados programas que contemplam pesquisadores de todas as áreas, bolsas essas que inclusive não sofrem reajuste desde o ano de 2013. Presidentes e líderes de Sindicatos têm se reunido e condenado os incessantes ataques do governo às áreas da Educação, de modo que além de atrapalhar o andamento de vários projetos e processos consolidados, desestimulam aos que dedicaram e ainda se dedicam à Ciência (SOBREIRA,2022).



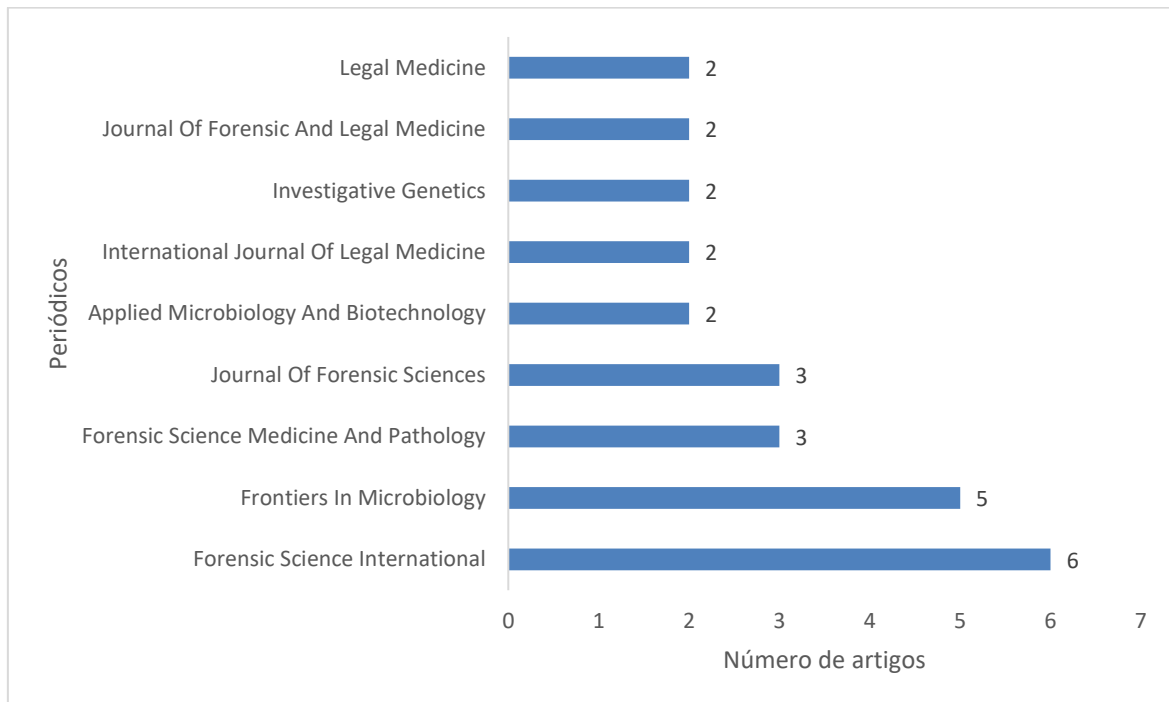
**Figura 6.** Dez maiores países que mais publicam com pelo menos dois artigos no ramo da microbiologia forense. Fonte: autor, 2022.

Em relação a questão dos periódicos que mais publicam artigos na área de microbiologia forense, temos destaque para 2 revistas, sendo elas:” *Forensic Science International* “(FSI) com 6 artigos publicados em seguida da “*Frontiers in Microbiology*”(FIM) com 5 artigos publicados no ramo da microbiologia forense (Figura 7).

A *Forensic Science International* (FSI) é um periódico de grande prestígio, com publicações inovadoras, de ponta e que contribuem de forma preponderante com as ciências forenses. Abrangendo diversas áreas de estudo, tais como: biologia, toxicologia, odontologia antropologia, armas de fogo, psiquiatria, exame

de documentos entre outros. A revista publica também sobre caso relato, comentários, revisão de artigos e notas técnicas. Aderindo a diversas e rigorosas diretrizes de publicação, além de apoiar, de forma ativa, a publicação inclusiva e representativa (ELSEVIER, 2022).

O *Frontiers in Microbiology* (FIM) é um periódico referência em sua área, publicando artigos estritamente revisados por pares em todo o âmbito da microbiologia. Os editores-chefes de campo Martin G. Klotz da *Washington State University* e Paul D. Cotter do *Teagasc Food Research Center* são amparados por um competente conselho editorial de pesquisadores internacionais. Esta revista multidisciplinar de acesso público tem como objetivo a disseminação do conhecimento científico e descobertas significativas no ramo da microbiologia para pesquisadores, clínicos, acadêmicos e o público em geral (COTTER, 2022).



**Figura 7.** Periódicos que mais tem artigos publicados na área da microbiologia forense. Fonte: autor, 2022.

#### 4. Conclusão

Com um número total de 53 trabalhos publicados por ano sobre a microbiologia forense os anos entre 2019 e 2021 destacaram-se como os de maior número de publicações, indicando assim, um tema de grande

recenticidade. As palavras-chave mais citadas nos artigos foram: *microbiology* e *forensic microbiology*.

O estudo mais citado teve como objetivo estimar o tempo pós-morte com auxílio de microrganismos. Já adentrando no campo dos autores, obteve-se grande destaque a Doutora Gulnaz T. Javan, onde ela foi responsável em criar o termo “*Thanatomicrobiome*”. A instituição com maior destaque no ramo foi a *Alabama State University* (ASU), com oito publicações sobre o tema. Sobressaíram-se os periódicos *Forensic Science International* (FSI) e *Frontiers in Microbiology* (FIM). Enfim o país com maior destaque no número de publicações foram os Estados Unidos.

Apesar de ser uma ciência de alta relevância a área da microbiologia forense ainda não é muito difundida nos contextos de resolução de crimes e perícia científica especialmente desenvolvida no Brasil. No que concerne à perspectiva Forense em relação à subárea da Microbiologia, é possível dizer que corresponde a uma relação intrínseca entre a Medicina, a Biologia, as questões de Saúde Pública e a Criminalística. Em contextos mundiais, as Ciências Forenses se mostram cada vez mais conhecidas, ainda que em outras nomenclaturas. Portanto, este estudo foi importante para dar uma visibilidade ampla do que tem sido publicado sobre a temática estudada e auxiliar em futuros estudos.

## 5. Referências

ALABAMA STATE UNIVERSITY (ASU). Home Page. The ASU Legacy: Perseverance, Progress and Promise. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.alasu.edu/about-asu/historytradition/asu-legacy-perseverance-progress-and-promise>. Acesso em: 7 de setembro de 2022.

AZEVEDO, I.L. A aplicação da biologia forense na perícia criminal. (**Monografia de Pós-Graduação**), Faculdade Câmara Cascudo (Unidade do grupo Estácio ensino superior) – Faculdade de Natal, Especialista em Perícia Criminal. 47 f.; il. 2009. Disponível em: [http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/pmrn\\_de/DOC/DOC00000000181131.PDF](http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/pmrn_de/DOC/DOC00000000181131.PDF)

BARBOSA, V. C.; BREITSCHAFT, A. M. S. An experimental apparatus to study the Archimedes principle. **Rev. Bras. Ensino. Fís.** v. 28, n. 1, p. 115-122, 2006.

BARROS, F. *et al.* Ciências forenses: princípios éticos e vieses. **Revista Bioética.** v. 29, n. 1 p. 55-65, 2021.

CALAZANS, C.H.; CALAZANS, S.M. Ciência forense: das origens à ciência forense computacional. Laboratório de Sistemas Integrados – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo. **XV Seminário Regional de Informática**. São Paulo – SP – Brasil, p. 1-14, 2005.

CARDOSO, T. C. Uso da Biologia Forense como ferramenta investigativa para o Ensino de Genética. (**Dissertação de Mestrado Profissional**) Ensino de Biologia em Rede Nacional - PROFBIO, Universidade Estadual do Piauí, 2020. Disponível em: <https://www.profbio.ufmg.br/wp-content/uploads/2021/09/TCM-Thamara.pdf>. Acesso em dezembro de 2022.

CARTER, David O. et al. Seasonal variation of postmortem microbial communities. **Forensic science, medicine, and pathology**, v. 11, n. 2, p. 202-207, 2015.

COTTER, P. D. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S. A. Teagasc Food Research Centre. Ireland, 2022. Disponível em <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/about#about-scope>. Acesso em 07/09/2022.

DE LA SEN, A. S. *et al.* Microbiología forense. **Reduca (Biología)**. v. 5, n. 5, p. 23-45, 2012.

DOREA, L.E. **Criminalística**: uma lacuna nas escolas de direito. Ponto de Vista, v.1, nº 1. Salvador: dez. 2003.

ELSEVIER. Home Page (ciência aberta), 2022. Disponível em: <https://www.elsevier.com/ptbr/open-science>

FINLEY, S.J. *et al.* Microbial Signatures of Cadaver Gravesoil During Decomposition. **Microb Ecol**. v. 71, n. 3, p. 524-529, 2016.

GRASSBERGER, R. Pioneers in Criminology XIII - Hans Gross (1847-1915). **The Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science**. v. 47, n. 4, p. 397–405, 1957.

HURLEY *et al.* Detection of human blood by immunoassay for applications in forensic analysis. **Forensic Sci Int**. v.190, n. 1-3, p. 91-97, 2009.

JAVAN, G. T. *et al.* Cadaver thanatomiobiome signatures: the ubiquitous nature of Clostridium species in human decomposition. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2096, 2017.

JAVAN, G.T. *et al.* Human Thanatomiobiome Succession and Time Since Death. **Nature**. v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016a.

JAVAN, G.T. *et al.* The Thanatomiobiome: A Missing Piece of the Microbial Puzzle of Death. **Front Microbiol**. v. 24, n. 7, p. 225, 2016b.

JAVAN, G. T.; FINLEY, Sheree J. What Is the “Thanatomiobiome” and what is its relevance to forensic investigations? *In*: **Forensic Ecogenomics**. Academic Press, p. 133-143, 2018.

LIMA, H. B. DNA x Criminalidade. **Rev. Peritos Criminais**. n. 26, p. 8-11, 2007. Disponível em: [https://apcf.org.br/wp-content/uploads/2020/06/Revista\\_APCF26.pdf](https://apcf.org.br/wp-content/uploads/2020/06/Revista_APCF26.pdf)

LOOP. S. J. F. Brief Bio. Alabama State University (ASU), Montgomery, United States of America, 2022. Disponível em: <https://loop.frontiersin.org/people/302475/bio>. Acesso em 22/08/22.

MACIAS-CHAPULA, C. A. The role of informetrics and scientometrics in the national and international perspective. **Ci. Inf.** v. 27, n. 2, p. 1-7, 1998.

MARTINELLI, Willian de Falco. O papel da placa bacteriana calcificada na paleomicrobiologia. (**Dissertação de Mestrado**). Medical and Health Sciences, Universidade do Porto, 2017. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10216/107319>.

MINISTERIO DE JUSTICIA. Disponível em: <https://www.mjusticia.gob.es/es/institucional/organismos/instituto-nacional/intcf>. Acesso em: 15 mar. 2022.

RAZERA, J.C.C. Contribuições da cienciometria para a área brasileira de educação em ciências. **Ciênc. Educ.** v. 22, n. 3, p. 1-4, 2016.

RESEARCH GATE. Gulnaz T Javan. Alabama State University. Department of Physical Science Program. Alabama, United States of America. 2022.

RTL. Laboratório Regional de Testes (RTL), Calcutá. Disponível em: <https://cpri.res.in/about-us/department-units/rtl-kolkata>. Acesso em: 02 mai. 2022.

SOBREIRA, A. Novos cortes na educação inviabilizam funcionamento das universidades federais no Ceará. **Brasil de Fato** – Uma visão popular do Brasil e do Mundo. Fortaleza, Ceará. 8 de dezembro de 2022. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2022/12/08/novos-cortes-na-educacao-inviabilizam-funcionamento-das-universidades-federais-no-ceara>. Acesso em 13 de dez. 2022.

## 6. Agradecimentos

Os autores deste trabalho financiaram esta pesquisa que foi realizada na Escola de Ciências Médicas e da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

## Autores

Marcos Vinicius Sena de Oliveira<sup>1</sup>, Rodrigo Coelho Silva<sup>2</sup>, Flávia Melo Rodrigues<sup>3\*</sup>

1. Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética, Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética e Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1.440, Setor Universitário CEP: 74605-010, Goiânia, GO, Brasil. Instituto Acadêmico de Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Estadual de Goiás, BR-153 3105, Fazenda Barreiro do Meio, 75132-903, Anápolis, GO, Brasil.

\* Autor para correspondência: [rflamelo@gmail.com](mailto:rflamelo@gmail.com)

---

## Métodos para detecção e caracterização de biofilmes

Mônica Voss, Sandra Kunde Schlesner, Salah Chaji

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c6>

### Resumo

A detecção de microrganismos, na forma de biofilmes tem sido amplamente discutida principalmente na formação deles nas superfícies de materiais encontrados em ambiente hospitalar e nas indústrias alimentícias. Dessa forma, é de extrema necessidade o uso de técnicas que consigam detectar a presença de biofilmes em quaisquer superfícies de diferentes materiais. Embora sejam utilizadas técnicas não-destrutivas e destrutivas de monitoramento de biofilmes, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referências bioquímicos, químicos, microbiológicos e físicos. O método mais utilizado é o químico de coloração *Live/Dead*, realizado através da utilização de corantes para verificar células vivas e mortas. No método bioquímico, a análise mais empregada é a de EPS, onde ocorre à desestruturação do biofilme, onde é possível verificar a quantidade de carboidratos e proteínas que fazem parte da estrutura do biofilme. No método de parâmetros microbiológicos, o mais utilizado é a coleta da amostra utilizando *swab* com posterior plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia. Diversas técnicas físicas são aplicadas na caracterização de biofilmes em superfícies, entre as técnicas que possuem destaque estão microscópio de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser, microscopia de elétrons, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de refletância. Além da portabilidade, os métodos analíticos utilizados para analisar biofilmes devem ser simples, reprodutíveis, sensíveis e de baixo custo. Sabe-se os equipamentos utilizados na atualidade são rebuscados, alguns possuem elevada sensibilidade e reprodutibilidade, porém possuem elevado custo de aquisição, de manutenção e não são portáteis. Diferentes técnicas estão disponíveis para a detecção de biofilmes, entretanto para a análise *in situ* e no local, onde o biofilme está localizado, é necessário um método que apresente vantagens como a portabilidade, análise *in situ* e não destrutivo. Nesse sentido, recentemente foi desenvolvido um novo método de detecção empregando a termografia ativa no infravermelho que consiste em aplicar um estímulo energético externo e através do gradiente térmico entre o biofilme e a superfície metálica foi possível detectar o biofilme. As imagens capturadas pela termografia no infravermelho são semelhantes as imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura, mas podendo ser executado em poucos minutos. É um método sem contato, não destrutivo, de baixo custo, portátil e de fácil uso.

**Palavras-chave:** Biofilme; detecção; indústrias alimentícias; hospitais; microrganismos; termografia no infravermelho.

## 1. Introdução

Um desafio a ser superado nas indústrias de alimentos e ambiente hospitalar é em relação a contaminação microbiológica causada pela formação de biofilme sobre as superfícies dos equipamentos e utensílios.

A ocorrência de enfermidades de origem alimentar ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos é um problema recorrente no mundo inteiro e que ocorre, em grande parte, devido à elevada facilidade da formação dos biofilmes em ambientes de produção e manipulação de alimentos. Apesar de ser realizada a higienização e sanitização de todas as superfícies de processamento de alimentos, quando há a presença de sujidade ou os microrganismos apresentam-se na forma de biofilme, estes podem ser potencialmente resistentes a sanitizantes e a produtos químicos (ANDRADE, 2008).

A formação de biofilmes envolve múltiplos estágios, que inicia com a adesão microbiana e subsequente produção e acumulação de uma matriz extracelular. A matriz extracelular servirá como proteção para os microrganismos contra agentes químicos e físicos, dessa forma dificultando a remoção dos biofilmes das superfícies em que se estabelecem (FLEMMING; WINGENDER, 2010; COSTERTON, 1999).

Contudo, a avaliação da eficiência da sanitização na formação de biofilmes ainda é considerada um desafio (FERNÁNDEZ, *et al.*, 2019). Embora sejam utilizadas diferentes técnicas de monitoramento de biofilmes e sujidades *in situ*, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referência bioquímicos, químicos, microbiológicos ou físicos (p. ex. microscópio de luz e microscopia eletrônica de varredura). Entretanto, os métodos de referência possuem características limitante para serem aplicados em análises de rotina, tais fatores que limitam o seu uso são a complexidade de operação, o tempo gasto, elevados volumes de reagentes, amostragem invasiva que por consequência degrada o biofilme, além da necessidade de infraestrutura adequada e pessoal especializado. Ademais, alguns equipamentos não são portáteis e não permitem o monitoramento contínuo durante os processos industriais (DOLL *et al.*, 2016; DENKHAUS *et al.*, 2007; CORTIZO; FERNÁNDEZ, 2003; ZHANG; FANG, 2001).



Considerando, que para a avaliação e detecção de biofilmes microbianos em diferentes superfícies são utilizados métodos físico, químicos e bioquímicos, esta revisão visa destacar a importância da detecção dos biofilmes nas indústrias de alimentos bem como no ambiente hospitalar, e dessa forma apresenta os principais aspectos, características, vantagens, limitações e aplicações desses métodos.

## 2. Biofilmes

Os biofilmes são definidos como adjuntos bacterianos sésseis que consistem em grupos multicelulares, compostos por células procarióticas e/ou eucarióticas unidos em uma matriz composta por substância polimérica extracelular (COSTERTON *et al.*, 1999; PANTANELLA *et al.*, 2013; ACHINAS *et al.*, 2020). A formação de biofilmes envolve múltiplos estágios, iniciando com a adesão microbiana com subsequente produção e acumulação de uma matriz extracelular, que é composta por uma ou mais substâncias poliméricas, tais como, proteínas, polissacarídeos, substâncias húmicas e DNA extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Para as bactérias a formação de biofilme promove algumas vantagens como a proteção contra antibióticos, desinfetantes, condições ambientais e a capacidade de sobreviver em condições deficientes de nutrientes (GOLDBERG, 2002; CHEN *et al.*, 1998; PENG; TSAI; CHOU, 2002; KOCH *et al.*, 2001; ACHINAS *et al.*, 2020).

Cerca de 99% da população de bactérias pode ser encontrada na forma de um biofilme em vários estágios de crescimento (DALTON; MARCH, 1998). O surgimento dessas comunidades sésseis e sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão no centro de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas (COSTERTON, 1999).

Os microrganismos que crescem envolvidos no biofilme possuem vários mecanismos que aumentam a sua resistência a tratamentos antimicrobianos externos em comparação com bactérias no estado planctônico. Uma das teorias destinadas a compreender esta recalcitrância envolve a penetração lenta ou

incompleta de agentes antimicrobianos através da substância polimérica extracelular (EPS) do biofilme (FRANCOLINI; DONELLI, 2010).

A barreira da matriz pode também atuar como um mecanismo de defesa contra outros estímulos externos tais como luz ultravioleta e desidratação. A EPS também possui capacidade de neutralizar e diluir substâncias antimicrobianas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). De fato, foi relatado que os biofilmes maduros são mais resistentes aos agentes bactericidas necessários para desestruturar células planctônicas do mesmo organismo no estado livre (KHOURY et al., 1992). Embora, a penetração incompleta da barreira da matriz tenha sido bem registada e revisada, este mecanismo de resistência não é eficaz contra todos os antimicrobianos.

Sendo os biofilmes bacterianos os maiores causadores de problemas nas indústrias de alimentos (KUMAR; ANAND, 1998), sistemas de água (FLEMMING; WINGENDER, 2010; BOTT, 1998), área de odontologia (MAROTTA, *et al.*, 2002) e principalmente no ambiente hospitalar (HALABI *et al.*, 2001), é muito importante saber quais são os microrganismos e identificá-los diretamente na superfície em que estão presentes.

## **2.1. Biofilmes no ambiente hospitalar**

No ambiente hospitalar os biofilmes bacterianos são os principais responsáveis por infecções, e os microrganismos associados mais frequentemente às infecções são as bactérias gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* e as bactérias gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, e leveduras, particularmente espécies de *Candida* (DONLAN, 2001).

Comumente no âmbito hospitalar são utilizados dispositivos, como cateteres, *shunts*, endoscópios, respirador pulmonar que melhoraram significativamente os serviços de saúde e a recuperação do quadro clínico dos pacientes. Entretanto, complicações devido a infecções estão correlacionadas diretamente com os dispositivos médicos, pois os biofilmes são encontrados em

superfícies inertes, nesses dispositivos médicos de uso interno ou externo (BORDI; BENTZMANN, 2011).

As infecções provenientes de biofilmes em implantes ou nas superfícies de outros dispositivos são difíceis de erradicar devido à sua proteção natural, pois como mencionado anteriormente, os biofilmes protegem as bactérias, tornando-as mais resistentes a antibióticos e sanitizantes, em comparação com células vivas livres, levando a graves complicações clínicas. Isso está associado ao aumento dos casos de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos, hospitalizados, idosos que correm maior risco devido a complicações sépticas e pacientes pediátricos. Devido às complicações no estado clínico dos pacientes e das internações ocorre o aumento dos custos de hospitalização (CRUZEIRO; CAMARGOS; MIRANDA, 2006; SRIVASTAVA; BHARGAVA, 2016).

As infecções clínicas estão associadas na maioria das vezes a formação de biofilmes em dispositivos médicos. Os marcapassos, os dialisadores elétricos, as próteses articulares, os cateteres intravenosos e urinários são indispensáveis para o tratamento dos pacientes, uma vez que não existe nenhuma alternativa para a substituição desses dispositivos. Na maioria das vezes, as bactérias das espécies *Staphylococcus* e *Pseudomonas* infectam oportunamente esses dispositivos de intervenção médica e através deles as bactérias entram no sistema do paciente. Sobre isso, observou-se que os *Staphylococcus* podem infectar feridas abertas e implantes (AKIYAMA, *et al.*, 2002), também foi relatado à presença de *Staphylococcus epidermidis* em dispositivos médicos (OTTO, 2009).

Em cateteres venosos centrais, foi relatada a presença de organismos formadores de biofilmes no lúmen e na superfície desses cateteres (DONLAN, 2008), e os principais microrganismos colonizadores são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (KOKARE., *et al.*, 2009).

Já em cateteres urinários, que podem ter sistemas aberto ou fechados, os microrganismos que causam contaminações são *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e algumas bactérias gram-negativas (DONLAN, 2001; KOKARE., *et al.*, 2009).

As implantações de próteses, biopróteses e válvulas mecânicas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; SIHORKAR; VYAS, 2001). são suscetíveis à colonização microbiana e subsequentemente a formação de biofilmes. Os microrganismos mais comuns que formam biofilmes nestes casos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, bacilos gram-negativos, *candida spp*, *Enterococci* e *diphtheroids* (KOKARE., *et al.*, 2009).

A colonização por essas bactérias em corpos estranhos médicos ou dispositivos permanentes é uma das principais causas de infecções associadas à hospitalização (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Além disso, esses organismos ubíquos causam infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos (BOU *et al.*, 2006). As infecções bacterianas são provavelmente as complicações pós-cirúrgicas mais comuns e desafiadoras que afetam os implantes biomédicos. Nesse sentido, a formação de biofilmes em superfícies implantadas é uma das principais causas de falha do implante (DOUGLAS, 2003). Estes microrganismos muitas vezes provocam infecções persistentes e crônicas em pacientes que têm cateteres, próteses ou outros dispositivos semelhantes e aqueles com sistema imunológico comprometido (FOXMAN, 2002).

## **2.2 Impactos causados pela presença de biofilmes na indústria de alimentos**

Os procedimentos de limpeza e higienização são essenciais para uma boa manutenção do ambiente de processamento de alimentos, evitando a contaminação bacteriana. Porém, quando os equipamentos e utensílios são higienizados inadequadamente pode ocorrer a formação de biofilmes bacterianos, que constituem uma importante fonte de problemas sanitários e perdas econômicas nas indústrias de alimentos e podem contribuir para a contaminação cruzada e transmissão de microrganismos patogênicos e deteriorantes para os alimentos. Por consequência, os riscos de surtos alimentares aumentam, podendo causar doenças infecciosas, além de reduzir a

vida útil dos produtos e a perda de credibilidade da indústria (NYACHUBA, 2010; TODD *et al.*, 2009).

A presença de resíduos de alimentos em equipamentos industriais, muitas vezes são oriundos das práticas inadequadas de limpeza, e esses resíduos aderidos podem facilitar a sobrevivência de microrganismos (LEON & ALBRECHT, 2007). Portanto, é necessária uma limpeza frequente para remover e evitar quaisquer adesões de material orgânico, inorgânico e, principalmente de microrganismos. Se a higienização não for adequada, ocorrerá a necessidade de nova higienização que pode exigir procedimentos de limpeza mecânica intensos ou concentrações muito altas de desinfetantes ou ambos, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (WHITEHEAD, SMITH & VERRAN, 2008; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2019).

Além disso, uma vez que os biofilmes estejam instalados nas superfícies dos equipamentos eles agem como camadas isolantes e ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida, assim prejudicando a transferência de calor entre as superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos. Conseqüentemente, há redução da eficiência energética e acréscimo de despesa de relacionadas a manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos.

Na indústria de alimentos os biofilmes podem se acumular em superfícies de diferentes materiais, tais como, aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, polietileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros. Convém ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas que são muito aderentes, protegendo novos microrganismos e dificultando ainda mais os procedimentos de higiene (PARIZZI *et al.*, 2004).

Portanto, o controle da aderência de microrganismos às superfícies é essencial para manutenção da qualidade dos alimentos. As operações de lavagem e sanitização, mesmo que frequentes, não podem garantir a eliminação completa dos biofilmes, pois sabe-se que muitas das superfícies em contato com o alimento assim como as tubulações e equipamentos, apresentam cantos,

sulcos, rugosidades, rachaduras, e zonas de baixo fluxo, onde os biofilmes facilmente se desenvolvem (NITSCHKE, 2006).

### 3. Métodos de detecção para avaliar eficiência de higienização

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a eficiência de higienização das superfícies tanto nas indústrias de alimentos quanto nos hospitais é o teste de bioluminescência de adenosina trifosfato (ATP), que é um método bioquímico rápido que estima o ATP total, em que a amostra é coletada através de *swab*. O ATP total está relacionado à quantidade de resíduos alimentares e/ou microrganismos coletados. O método baseia-se na reação enzimática do ATP com luciferina-luciferase, resultando em emissão de luz que é mensurada por um luminômetro, cuja intensidade é expressa em unidades de luminescência relativa (RLU) (SHAMA; MALIK, 2013).

A bioluminescência de ATP é um bom método para a determinação rápida da eficiência de limpeza, geralmente o resultado é obtido entre 5 e 10 min. Nesse método tanto os resíduos de alimentos quanto os microrganismos são detectados. Como o teste é realizado rapidamente, podem ser tomadas medidas corretivas imediatas (SHAMA; MALIK, 2013). Os métodos de bioluminescência de ATP são uma alternativa atrativa porque fornecem avaliação da limpeza da superfície em tempo real (GRIFFITHS, 1993; VILAR, *et al.*, 2008). Assim, esses métodos são adequados para monitorar a limpeza dentro dos sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (AYCICEK *et al.*, 2006).

A bioluminescência do ATP tem sido utilizada para avaliar a higiene das superfícies de contato com alimentos em diversas situações, incluindo hospitais (AMODIO; DINO, 2014) e equipamentos das indústrias de laticínios (VILAR, *et al.*, 2008). Além disso, este método foi usado para avaliar a contaminação microbiana em alimentos como leite cru (COSTA *et al.*, 2006), carcaças de frango (BAUTISTA *et al.*, 1997), presença de bactérias e para avaliar a eficiência de limpeza de sujidades em diferentes superfícies (KOO *et al.*, 2013; WHITEHEAD; SMITH; VERRAN, 2008). Esse método detecta contaminação bacteriana, mas também fontes não-microbianas de ATP, tais

como resíduos orgânicos (alimentares), a presença destes indica uma limpeza deficiente que beneficia o crescimento microbiano.

As principais vantagens desse método são a rapidez, simplicidade e principalmente a possibilidade de efetuar análises em campo. Entretanto, como limitantes esse método requer que sejam delimitadas áreas antes das análises, dessa forma, não é possível verificar a localização exata das sujidades ou microrganismos presente no local analisado. Além disso, por ser uma reação enzimática, a técnica de ATP bioluminescência é afetada por parâmetros como pH e temperatura. Valores acima ou abaixo destes podem inativar a luciferase ou retardar a velocidade da reação. Além desses parâmetros, a turbidez e a cor, no caso de análise de amostra líquida, podem influenciar diretamente os resultados (SHAMA; MALIK, 2013).

Além desse método rápido e de fácil manuseio, WHITEHEAD *et al.*, (2009) verificaram que com o uso de métodos físicos é possível detectar incrustações residuais nas superfícies, por exemplo, medindo mudanças no ângulo de contato. Contudo, os resultados obtidos pelos autores demonstram que não é possível verificar a distribuição da sujidade sobre a superfície e os dados são de difícil interpretação. Outra técnica empregada para o monitoramento de diferentes tipos de sujidade em superfícies, como por exemplo aço inoxidável, é a microscopia de epifluorescência, que foi utilizada para a identificação do padrão de adesão ou remoção celular. Para tanto, a avaliação foi efetuada através da adição de uma película de proteína sobre o microrganismo *Staphylococcus aureus* em superfícies de titânio. Sobre essa superfície, foi pulverizada uma solução de dodecilsulfato de sódio para simular o processo de higienização. Dessa forma, pôde-se observar que quando as células dos microrganismos estavam protegidas pela película de proteína as mesmas não foram removidas, mostrando *in situ* que a presença de material orgânico nas superfícies altera a sua capacidade de limpeza. Apesar da possibilidade da detecção dos microrganismos o tamanho da área analisada (2  $\mu\text{m}$ ) é um limitante para as análises de rotina nas indústrias, pois não ocorre a amostragem real da superfície analisada, ocasionando erros na análise (VERRAN; WHITEHEAD, 2006).

WHITEHEAD; BENSON; VERRAN (2015) avaliaram sujidades de extrato de peixe e células de *Listeria monocytogenes* depositados sobre placas de aço inoxidável. Os substratos aderidos foram visualizados por microscopia de epifluorescência (510-560 nm), onde a porcentagem da área coberta pelos materiais orgânicos e pelos microrganismos foi determinada. Por sua vez, essa técnica possibilitou a visualização direta da contaminação de superfícies e a área onde havia a presença de células. As imagens das células foram obtidas *in situ*, com resultados imediatos, representando verdadeiramente o número de células e o material orgânico que também pode ser visualizado e quantificado. Porém, essa técnica apresenta limitações como a difícil disponibilidade do equipamento, necessidade de operadores treinados, grande número de replicatas da amostra e, principalmente, não é possível representar toda a superfície, ou seja, esse método não possibilita a visualização de uma grande área de exposição.

Em outro trabalho da literatura a microscopia de epifluorescência e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados para visualizar a distribuição de *Escherichia coli* e de resíduos de alimentos (proteína, gordura e carboidratos) em superfícies de aço inoxidável. A técnica de microscopia de epifluorescência possibilitou a determinação de baixos níveis de sujidade (0,1 % a 1 %), enquanto com MEV foi possível fazer a detecção somente em níveis de 10 % de sujidade, ou seja, com o uso do MEV não foi possível detectar baixos níveis de sujidade (0,1 % e 1%) (WHITEHEAD; SMITH; VERRAN, 2008). Embora o MEV forneça informações sobre a distribuição de materiais e células em uma superfície, é um método que requer manipuladores treinados e especializados, necessita do preparo da amostra e apresenta custo elevado de aquisição e manutenção.

Além dessas técnicas utilizadas para a detecção de sujidades, pode-se ainda citar a espectroscopia de Raios-X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, radiação ultravioleta (UV) e microscopia de força atômica. Mas, esses métodos requerem analistas qualificados, são de alto custo, e não fazem o monitoramento completo de uma superfície, ou seja, somente avaliam pequenas áreas, o que limita sua utilização em análises de rotinas nas indústrias de alimentos (WHITEHEAD; BENSON; VERRAN, 2011; ABBAN; JAKOBSEN; JESPERSEN, 2014; PHINNEY *et al.*, 2017).



## 4. Detecção e caracterização dos biofilmes

Na atualidade, a detecção de microrganismos na forma de biofilmes tem ganhado destaque, devido aos problemas de contaminações associados a eles em ambientes hospitalares e industriais. A presença de biofilme nas superfícies de equipamentos na área alimentícia ou em dispositivos médicos podem causar sérios danos à saúde, pois desencadeia infecções que podem ser letais em pessoas com quadro clínico crítico (DENKHAUS *et al.*, 2007).

Vários métodos são usados para detectar e monitorar a carga microbiana em superfícies nas indústrias de processamento de alimentos e em superfícies em geral. Além do monitoramento *in situ* de biofilmes, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referências bioquímicos, químicos e microbiológicos (AZEREDO *et al.*, 2017). As técnicas são classificadas de acordo com a definição:

- Química: quando utiliza corantes ou fluorocromos que podem se ligar ou adsorver aos componentes do biofilme.
- Física: quando a biomassa total do biofilme pode ser obtida a partir de medidas de peso seco ou úmido.
- Microscópica: quando uma modalidade de imagem é usada para detectar a formação de biofilme (ou seja, sempre que um microscópio é usado).
- Biológica: quando uma técnica utiliza a estimativa da viabilidade celular na medição e detecção da formação de biofilme.

### 4.1. Métodos Químicos

O método químico mais utilizado é o de coloração *Live/Dead*, que é realizado através da utilização de corantes para verificar células vivas e mortas, sendo que as células vivas apresentam coloração azulada, enquanto as células mortas ficam na coloração avermelhada (DOLL *et al.*, 2016).

Porém, segundo RAMAJANI *et al.*, (2019), a coloração de placa de microtitulação é a mais comum, sendo a quantificação de biofilme estático, se baseia principalmente em corantes colorimétricos (mais comumente usados são cristal violeta e safranina) (RAJAMANI *et al.*, 2019). Nesse método, placas de

microtitulação (placa de 96 poços) são cultivadas com uma suspensão bacteriana, a seguir, as placas são cobertas e incubadas por um tempo específico (OJIMA; NUNOGAMI; TAYA, 2016). Depois o tempo de incubação, as placas são lavadas para remover microrganismos não aderentes. O restante microrganismos são fixados na superfície, normalmente pela adição de uma solução de metanol (STEPANOVIC; VUKOVIC; DAKIC, 2000). Depois de adição da solução de metanol, as placas contendo os microrganismos são deixadas para secar. O biofilme pode ser corado para avaliar a atividade metabólica ou obter a biomassa total.

Outro método utilizado e reportado na literatura é a atividade metabólica de uma amostra contendo biofilme que é medida para discriminar entre células vivas e mortas. Dois corantes usados para avaliar a viabilidade de uma amostra são o cianoditolil tetrazólio sal de cloreto e sal de tetrazólio sódico (AZEREDO *et al.*, 2017; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). A mensuração da biomassa da atividade metabólica é principalmente aplicada para a quantificação de células viáveis em culturas planctônicas (GABRIELSON, *et al.*, 2002).

A biomassa total de um biofilme pode ser obtida por coloração, mas dois exemplos de obtenção de biomassa total por coloração são dados em OJIMA *et al.*, (2016) e NGUYEN *et al.*, (2012) onde os autores usaram uma solução de safranina para manchar células de *E. coli*. Após 20 min de repouso à temperatura ambiente, as placas de microtitulação foram lavadas duas vezes. Após a etapa de lavagem, as manchas células foram solubilizadas pela adição de acetona em etanol, a suspensão foi condensada, e o índice do biofilme e o número de células foi medido pela absorção da solução de corante com um leitor de placas (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). Outra possibilidade de medir a biomassa total é aplicar a coloração com cristal violeta (CV) (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2014). MARCOS-ZAMBRANO *et al.* (2014) seguido o mesmo procedimento de OJIMA *et al.* (2016) e NGUYEN *et al.* (2012), utilizou um espectrofotômetro para calcular as medições finais do biofilme total. Ao comparar os diferentes métodos, os resultados variam, portanto, pode-se concluir que MPDS para biomassa total tem baixa reprodutibilidade. Além disso, as leituras colorimétricas são frequentemente prejudicadas por variações que podem ocorrer (RAJAMAN *et al.*, 2019).

A análise de biomassa baseada em fosfolipídios é baseada na medição de fosfolipídios, que são componentes celulares, pois estes são universalmente distribuídos e expressos em um nível constante entre a comunidade microbiana. No entanto, a determinação de fosfolipídios é limitada pela sua taxa de recuperação e pela sensibilidade do equipamento analítico (AZEREDO *et al.*, 2017). Para identificar os diferentes fosfolipídios, pode ser utilizado um cromatógrafo a gás. Esta técnica é aplicada principalmente na diferenciação de microrganismos no solo e fornece informações sobre a viabilidade do microrganismo e estrutura (WU *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2019). No entanto, AZEREDO *et al.*, (2017) descreveu esta técnica como uma possível substituição para unidades formadoras de colônias (CFU). Além disso, um artigo recente de HUANG *et al.*, (2019) foi o primeiro a vincular a atividade respiratória microbiana com o ácido graxo fosfolipídico de biofilmes em escala real em biorreatores. Os microrganismos formam diversos ácidos graxos fosfolipídicos (PFA) por meio de vários processos químicos. Essas reações químicas variam por espécie, portanto, o PFA é específico da espécie e pode ser usado para coletar informações sobre as diferentes espécies de microrganismos que vivem em biofilmes (HUANG *et al.*, 2019). Além disso, como dito, é possível avaliar a viabilidade dos microrganismos presentes no biofilme. O PFA e a taxa de consumo de oxigênio são descobertos apenas em organismos vivos, células e, portanto, podem ser usados como biomarcadores característicos para microrganismos vivos (HUANG *et al.*, 2019). A partir disso, pode-se concluir que a análise de biomassa baseada em fosfolipídios pode ser usada para diferenciar entre microrganismos presentes em um meio específico. Além disso, pode-se estimar a viabilidade das células presentes em um meio.

#### **4.2. Métodos Biológicos/ Bioquímicos**

No método bioquímico a análise mais empregada é a caracterização da EPS. Nesse tipo de análise, ocorre a desestruturação do biofilme, e a verificação da quantidade de carboidratos e proteínas que fazem parte da estrutura dele. Entretanto, nesse método é necessário saber a localização exata do biofilme para que o mesmo possa ser coletado para análise (KARUNAKARAN *et al.*, 2011). Já os métodos baseados em parâmetros microbiológicos mais comuns

utilizam a coleta da amostra com *swab* com posterior plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (DOLL *et al.*, 2016).

Unidades formadoras de colônias é a técnica mais amplamente utilizada para estimar a viabilidade celular do biofilme (AZEREDO *et al.*, 2017). O conceito básico deste ensaio é separar as células individuais em uma placa de ágar e cultivar colônias das células, diferenciando assim as células vivas das células mortas. Se uma célula individual pode proliferar e dividir em células maduras, formará uma colônia individual (WILSON *et al.*, 2017). Células viáveis, mas não cultiváveis (do inglês, *Viable but non-culturable*, VBNC), são caracterizadas por uma perda de cultura em ágar, o que dificulta sua detecção por UFC (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). De acordo com LI *et al.*, (2014), é até possível que todas as bactérias em uma amostra estejam no estado VBNC. Se esse fenômeno ocorrer, a amostra pode ser considerada como livre de germes devido à não detecção (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). O procedimento começa com uma maturidade biofilme que é transferido para um meio líquido por meio de raspagem, vórtex ou sonicação e é, portanto, uma técnica de medição de biofilme destrutiva. Após a incubação no meio líquido, as colônias são contadas nas placas e o número de células da cultura original é calculada usando contagens médias de colônias, o volume amostra utilizado (UFC/mL) de cultura semeado e o fator de diluição do biofilme suspenso (WILSON *et al.*, 2017).

Exceto para medir a viabilidade usando o número de UFC, esta técnica também pode ser usada para outras finalidades, como por exemplo disso é a aplicação para testar se diferentes materiais afetam o crescimento do microrganismo (AKENS *et al.*, 2018). AKENS *et al.*, (2018) aplicou UFC para comparar placas ortopédicas de aço inoxidável e titânio. Outra aplicação do UFC é avaliar o desempenho de vários materiais anti-bioincrustantes (VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2014).

Os métodos microbiológicos em geral, são baratos e de fácil manuseio, além das análises poderem ser realizadas em meios seletivos, onde bactérias específicas podem ser isoladas e identificadas. Entre as principais limitações desse método cabe destacar o elevado tempo para as análises e a pequena área analisada, pois ela deve ser previamente delimitada e durante esse procedimento podem erros de amostragem e conseqüentemente resultados

falso-negativos (CHAE; SCHRAFT 2001; WIRTANEN; MATILLA-SANDHOLM, 1993).

Outro método utilizado para as análises microbiológicas de biofilmes é o contato da superfície a ser analisada diretamente com uma superfície de ágar solidificado depositado em uma placa, chamado de placa de *RODAC*. Este método é mais simples do que o *swab*, mas não é possível amostrar superfícies irregulares, além disso, esse método depende do tempo de contato ágar/superfície e pressão aplicada onde elevadas pressões podem danificar e inutilizar o ágar (OKAMOTO, 2018; NYDER, 2003). Ademais, os microrganismos podem não aderir quantitativamente à superfície do ágar, ocorrendo a subestimação do número de microrganismos presentes na superfície amostrada (OKAMOTO, 2018; NYDER, 2003).

Dessa maneira, pode-se perceber que os métodos microbiológicos incluindo *swab* e métodos de contato em ágar, são amplamente utilizados para avaliar a limpeza das superfícies em indústrias alimentícias, entretanto exigem longos períodos de incubação (24 a 72 h de crescimento), o que não é desejado em análises de rotina, pois nas indústrias de alimentos os resultados devem ser obtidos rapidamente.

### 4.3. Métodos Físicos

KINNER *et al.*, (1983) e MURGA *et al.*, (1995), foram os pesquisadores pioneiros a publicar artigos sobre a análise de biofilmes, sendo essas pesquisas relacionadas aos parâmetros microbiológicos, tais como espessura do biofilme, peso seco total e contagem total de células. Entretanto, essa caracterização foi insuficiente para descrever a atividade do biofilme. Dessa forma, muitos métodos foram aperfeiçoados para que fosse possível realizar a caracterização dos mesmos (LAZAROVA; MANEM, 1995). Assim os métodos podem ser organizados de acordo com o tipo de informação trazida acerca dos biofilmes: (i) formação e estrutura do biofilme, (ii) composição do biofilme, componentes específicos do biofilme e (iii) atividade da biomassa (DENKHAUS *et al.*, 2007).

Outra informação importante é a identificação fenotípica de cepas produtoras de biofilme pode ser realizada pelo método do tubo de ensaio ou pelo

teste de placa de micro titulação (MtP) que é baseado na mensuração da densidade óptica (O.D.) de biofilmes bacterianos corados que estão depositados em microplacas de 96 poços, a leitura é realizada em espectrofotômetro produzindo resultados quantitativos do biofilme total, não distinguindo entre células mortas e vivas (MERINO *et al.*, 2019).

Segundo RAJAMANI *et al.* (2019), a coloração de placa de microtitulação é o método mais utilizado para a quantificação estática de biofilme, que se baseia principalmente em corantes colorimétricos (mais comumente usados são cristal violeta (CV) e safranina) que são extraídos de biofilmes corados.

Outra técnica que é utilizada na detecção de biofilmes é visível (Vis) e infravermelho próximo ((NIR) que é baseado nas propriedades dos materiais em absorver e/ou refletir luz em diferentes bandas espectrais. Foi realizado estudos com biofilmes é o método utilizado obteve várias imagens nas bandas espectrais usando uma câmera fotográfica digital (GRISKIN; IAKUSKIN; STEPENKO, 2017). Essas imagens foram analisadas comparando-as com grupos conhecidos de índices de vegetação, como o índice de vegetação de diferença normalizada e a vegetação de diferença normalizada aprimorada. O processamento de imagens é uma técnica amplamente utilizada e sua aplicação varia. Exemplos de a aplicação desta técnica é a análise da umidade do solo, monitoramento bacteriano em fontes de água potável, indústrias de alimentos e atividade antibacteriana de materiais têxteis (GHEORGHE; DEAC; FILIP, 2019; ANCUTA *et al.*, 2019; FERNANDEZ *et al.*, 2019; SHAMS-NATERI; PIRI; MOKTHARI, 2018). Além disso, existem técnicas que usam luz visível para desencadear uma reação do biofilme em questão.

ZHIQIANG *et al.*, (2019), fabricaram anfifílicos liberadores de óxido nítrico (NO) e aplicou isso ao biofilme, que desencadeou uma reação e, por sua vez, liberou NO quando exposto a luz visível. No entanto, esta última técnica é diferente da técnica VIS&NIR, pois sua implementação requer os anfifílicos liberadores de NO fabricados e um microscópio para visualizar a reação.

### 4.3. Microscópios

Na literatura são relatadas diversas técnicas aplicadas na caracterização de biofilmes em superfícies. Entre as técnicas que possuem destaque, pode-se elencar o microscópio de luz, (CORTIZO; FERNÁNDEZ, 2003) microscopia eletrônica de varredura (MEV) (WOLF; CRESPO; REIS, 2002; CLAYBORN, *et al.*, 2015; PANDE; MCWHORTER; CHOUSALKAR, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; AZEREDO, *et al.*, 2017), microscopia confocal de varredura a laser (ZHANG; FANG, 2001), microscopia de elétrons e microscopia de força atômica (AFM) (OZKAN *et al.*, 2016). Essas técnicas são utilizadas para verificar a morfologia, espessura do biofilme, caracterização das espécies presentes, características estruturais do biofilme e análise detalhada da adesão dos biofilmes na superfície e análise topográfica do biofilme (MOREIRA *et al.*, 2017; ORTEGA *et al.*, 2010; OZKAN *et al.*, 2016).

A microscopia de luz é uma técnica de linha de base útil para fornecer identificação visual do biofilme formação (AZEREDO *et al.*, 2017). A absorção de luz por biofilmes foi correlacionada com a massa celular do biofilme e massa total de biofilme. A microscopia de luz é baseada na relação linear entre a intensidade de um pixel em imagens de biofilme e o número correspondente de células. Esta relação permite o cálculo da espessura do biofilme (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2007). A microscopia de luz requer um preparo simples de amostra, sendo está barata e fácil de executar.

A aplicação de microscopia de luz resulta em uma imagem do biofilme, porém para ocorrer a aquisição da imagem há a necessidade da coloração do biofilme. E para isso primeiramente deve-se selecionar um método de coloração adequado.

No entanto, em comparação com outras técnicas de microscopia, sua resolução é relativamente baixa, não sendo o suficiente para determinar relações intercelulares e diferenciação morfotipo (AZEREDO *et al.*, 2017).

A microscopia confocal de varredura a laser (do inglês, *Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis*, CLSM) é uma microscopia de fluorescência, amplamente utilizada para estudar biofilmes, pois permite a avaliação da

estrutura espacial do biofilme e a visualização da distribuição celular na matriz do biofilme (NEU; LAWRENCE, 2014).

A aplicação da técnica resulta em imagens 3D do biofilme e os parâmetros como espessura e rugosidade do biofilme podem ser obtidos (NEU; LAWRENCE, 2014). Ao contrário de muitas outras técnicas de microscopia, o CLSM não requer fixação e desidratação da amostra de biofilme, portanto, é uma técnica não destrutiva que pode ser realizada *in situ* e em tempo real (PALMER; STERNBER, 1999).

No entanto, a alegação de estar *in situ* só é válida para amostras de biofilme formadas em uma superfície plana que caberá sob o microscópio. Além disso, CLSM tem sido aplicado em muitos domínios diferentes, exemplos dos quais são a detecção de biofilme em membranas de osmose reversa em indústrias processadoras de leite (STOICA, *et al.*, 2018), na validação de propriedades anti-incrustantes de polímeros específicos (BOGUSLAVSKY, *et al.*, 2018), e na identificação de bactérias marinhas e suas características de bioincrustação (JEONG, *et al.*, 2018).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de microscopia baseada na dispersão de superfície e na absorção de elétrons atingindo alta profundidade, produzindo uma aparência 3D da superfície do biofilme, visualização do biofilme, distribuição do biofilme e EPS disperso nos biofilmes (CLAYBORN, *et al.*, 2015). Para visualizar essas características, é necessário secar a amostra e operar sob vácuo (WANG, *et al.*, 2018; CLAYBORN, *et al.*, 2015; CHATTERJEE, *et al.*, 2014). Vários exemplos da aplicação do MEV são para estudar a capacidade das bactérias desenvolver biofilmes em diferentes superfícies em várias condições ambientais, como por exemplo avaliar a formação de biofilmes de *Salmonella spp.*, (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2014), e a distribuição de *Pseudomona aeruginosa* em superfície de aço inoxidável (VOSS, *et al.*, 2020).

Devido às propriedades do MEV para aumentar as amostras até um único nível molecular, as propriedades de adesão de microrganismos individuais podem ser monitoradas (BOGUSLAVSKY, *et al.*, 2018).



De acordo com NORTON *et al.*, (1998), o MEV é capaz de visualizar um biofilme muito fino porque se concentra nas superfícies dos objetos. Isso é favorável quando a formação inicial do biofilme é investigada, no entanto, quando a formação do biofilme está em um estágio de crescimento posterior, como a proliferação dos microrganismos, as imagens obtidas por MEV permanecem focadas na camada superior do biofilme e, portanto, não fornecem informações sobre a espessura do biofilme ou sua estrutura 3D (NORTON *et al.*, 1998).

Apesar da alta resolução, o MEV não é capaz de diferenciar entre diferentes microorganismos, portanto o microorganismo do qual o biofilme consiste deve ser conhecido de antemão. Para qualquer aplicação de MEV, um extenso preparo de amostra é necessário, e isso pode resultar em danos às amostras biológicas (CHATTERJEE, *et al.*, 2014). Assim, se o MEV for aplicado para análise de biofilme em superfícies, uma amostra de biofilme deve ser removida e preparada para posterior análise, o que implicará em danos à amostra, portanto, o MEV pode ser considerado como uma técnica destrutiva.

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica de microscopia baseada na deflexão de uma “ponta” metálica. Esta ponta metálica se move sobre a superfície do alvo, e a deflexão da ponta é registrada (OZKAN, *et al.*, 2016). Utilizando a deflexão registrada, a topologia e as propriedades do material de uma superfície podem ser medidas. MFA é uma técnica não destrutiva e é capaz de obter visualizações topográficas em 3D, detalhes estruturais do biofilme e várias interações, como forças de interação microrganismos de superfície e coesão do biofilme (CHATTERJEE, *et al.*, 2014; MERINO, *et al.*, 2019).

Além disso, em contraste com outras técnicas de microscopia, o MFA pode ser aplicado em condições ambientais e, portanto, torna obsoleto o pré-tratamento das amostras (CHATTERJEE, *et al.*, 2014). AFM também é aplicável em superfícies líquidas, o que geralmente é necessário na imagem *in situ* de biofilmes (HANNIG *et al.*, 2010).

No entanto, para aplicar MFA em amostras líquidas, o procedimento deve ser alterado. Se a ponta passar a superfície, a ponta pode danificar o biofilme. Para superar o dano do biofilme, o modo de varrimento da ponta ao longo da superfície do biofilme é alterado para o modo de toque (*tapping*) (CHATTERJEE,

*et al.*, 2014). A técnica de toque, em vez de mover-se constantemente pela superfície do biofilme, é amplamente utilizada (CHEN *et al.*, 2019). Apesar da afirmação de MERINO *et al.*, (2019) que o MFA é uma técnica não destrutiva de detecção de biofilme, BIRARDA *et al.*, (2019) afirmaram que para avaliar a espessura da matriz, parte da matriz foi riscada e a diferença de espessura entre a área riscada e a área do biofilme foi medida e diferenças foram encontradas.

A aplicação do MFA por Birarda *et al.* (2019) indica que a técnica é destrutiva se o objetivo é obter informações sobre a espessura do biofilme de uma amostra. Além disso, em comparação com outras técnicas de microscopia, o MFA é capaz de oferecer a mais alta resolução de 1–10 nm (MERINO *et al.*, (2019), e de acordo com CHATTERJEE *et al.*, (2014), essa técnica pode fornecer resolução nanométrica quase rotineiramente. Para detectar um biofilme formado em uma superfície de equipamento e/ou utensílio não é necessário um exaustivo preparo de amostra, porém o biofilme deve ser transferido para uma superfície na qual o microscópio possa focalizar.

De acordo com SURMAN *et al.*, (1996), a microscopia eletrônica de varredura ambiental (do inglês, *Environmental Scanning Electron Microscopy*, ESEM) é uma forma modificada de MEV, no entanto, a literatura recente afirmou que ESEM é um instrumento separado e em maioria dos casos não é uma modificação do MEV (FRÁNKOVÁ *et al.*, 2018). A alta pressão da água usada no ESEM permite imagens do espécime hidratado, ao contrário do MEV que só pode gerar imagens de amostras secas (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). Além disso, não há necessidade das análises serem realizadas em alto vácuo como MEV (DOUCET *et al.*, 2005).

O benefício mais importante do ESEM, em comparação com o seu predecessor MEV, é a capacidade de investigação dinâmica *in situ* de mudanças de amostra ou reações sob várias temperaturas e pressões (KRAUSKO *et al.*, 2014).

O preparo de amostra para ESEM é bastante rápida em comparação com a maioria das outras técnicas de microscopia. ESEM não requer coloração, secagem ou revestimento de amostras. Isso torna o ESEM benéfico no que diz respeito ao consumo de tempo do processo de visualização do biofilme e causa significativamente menos interrupção e danos à amostra de biofilme (DOUCET

et al., 2005). O preparo da amostra requer que o biofilme formado na superfície de um equipamento e/ou utensílio seja removido e colocado em uma placa que caiba na câmara do equipamento, e isso pode causar danos ao biofilme, no entanto, devido à ausência de secagem e coloração necessárias da amostra, nenhum dano posterior é causado.

Essas técnicas para a caracterização de biofilmes são amplamente utilizadas, porém a grande maioria possui limitações nos quesitos de rapidez e portabilidade e muitas vezes necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostra, resultando na destruição do biofilme e/ ou a remoção do mesmo do local de origem (PARKER et al., 2017).

## 5. Termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilmes

Como citado anteriormente há técnicas diferentes para a detecção de sujidade e biofilmes, no entanto, para a análise *in situ* e onde a sujidade e o biofilme estão localizados, é necessário utilizar metodologias que ofereçam a vantagem de portabilidade, análise *in situ*, não invasiva, não destrutiva de fácil uso e sem preparo de amostra. Desta forma, recentemente foi publicado na literatura um trabalho utilizando a termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície metálica.

A termografia ativa necessita de um estímulo energético externo sobre a superfície do objeto, para que a temperatura seja determinada. As fontes de energia externa que podem ser utilizadas são ar quente, lâmpadas, radiações eletromagnéticas, flashes, ultrassom, micro-ondas, laser, entre outros. Em todos os casos, o objetivo é a produção de um diferencial térmico no corpo, permitindo a visualização de regiões com diferentes características (GOWEN et al., 2010; USAMENTIAGA et al., 2014).

Neste contexto, algumas aplicações da termografia ativa também são relatadas na área de alimentos, tais como o controle da temperatura de frangos e salsichas durante o aquecimento e cozimento (IBARRA et al., 2000; CISCHOSKI et al., 2015), o monitoramento da temperatura de alimentos durante os processos de secagem (TRAFFANO-SCHIFFO et al., 2014.; CUCCURULLO

et al., 2012; FITO, et al., 2004), o monitoramento de injúrias pós-colheita em frutas e hortaliças (VARITH et al., 2003; VAN LINDEN et al., 2003).

Além disso, a termografia no infravermelho também pode ser empregada na detecção de contaminação microbiológica em alimentos (HAHN, et al., 2006; STOLL et al., 2008), detecção de objetos estranhos em linhas de produção (SENNI, et al., 2014) e infestações em grãos de trigo por insetos em diferentes estádios de vida (MANICKAVASAGAN et al., 2008). Ademais, essa técnica vem sendo utilizada na identificação de defeitos em embalagens e no controle de climatização durante o armazenamento (VADIVAMBAL; JAYAS, 2011).

Para a detecção de biofilme e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície metálica VOSS *et al.*, (2020) desenvolveram um método em que placas de aço inoxidável (1x1 cm<sup>2</sup>) foram utilizadas como superfície para o crescimento e desenvolvimento de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. As diferenças de temperatura de superfície medidas pela câmera infravermelha podem ser causadas pela variação espacial do fluxo de calor devido às diferentes propriedades térmicas dos materiais, obtidas no TA, nesse caso para que ocorresse a detecção do biofilme com a câmera de infravermelho, foi necessário gerar um gradiente térmico entre o biofilme e as placas de aço inoxidável e para isso as placas metálicas foram resfriadas com temperatura de  $-11 \pm 1^\circ\text{C}$ , e com isso foi produzido um gradiente térmico, pois as propriedades termodinâmicas dos materiais são diferentes.

Desta forma, as diferentes propriedades térmicas entre o aço inoxidável e o biofilme revelou a presença de biofilmes nas superfícies metálicas sob resfriamento. No entanto, é difícil afirmar com precisão as propriedades térmicas dos biofilmes devido ao alto número de variáveis relacionadas à sua formação. Por exemplo, o calor específico do aço é 0,50 J/g °C, alguns valores de calor específico foram relatados para biofilmes, tais como 0,21 J/g °C para *Pseudomonas cepacia*, 0,60 J/g °C para matéria seca de *Escherichia coli*.

A variação de temperatura ( $\Delta T$ ) durante o resfriamento foi maior para os biofilmes em relação ao aço inoxidável, com  $\Delta T$  de 8,7 °C e 1,6 °C, respectivamente. Esse comportamento segundo VOSS *et al.*, (2020) pode ser caracterizado pelas diferenças de difusividade térmica e efusividade dos materiais.

A termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilmes foi comparada com MEV e imagens semelhantes foram obtidas, portanto esse método recente pode ser utilizado para detecção de biofilme em superfície metálica, sendo esse um método simples, rápido (3 minutos), não invasivo, não destrutivo, reproduzível, de baixo custo, portátil e principalmente as análises podem ser realizadas *in situ*.

## 6. Conclusão

Com a preocupação com o controle higiênico- sanitário das indústrias de alimentos e ambientes hospitalares vários métodos inovadores estão sendo desenvolvidos para a detecção de biofilmes em diversas superfícies. Os métodos chamados de convencionais estão perdendo espaço para os novos métodos, pois esses são mais rápidos, não destrutivos e não invasivos, e dentre os métodos já elucidados na literatura e que são utilizados rotineiramente surgiu a termografia ativa no infravermelho para ser um novo método portátil de análise *in situ*.

## 7. Referências

ABBAN, S.; JAKOBSEN, M.; JESPERSEN, L. Assessment of interplay between UV wavelengths, material surfaces and food residues in open surface hygiene validation. **Journal Food Science Technology**. v.51, nº. 12, p. 3977-3983, 2014.

ACHINAS, S., et al. A Technological Understanding of Biofilm Detection Techniques: A Review. **Materials**, v. 13, p. 3147, 2020.

AKENS, M., et al. The impact of thermal cycling on *Staphylococcus aureus* biofilm growth on stainless steel and titanium orthopedic plates. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.19, p. 260, 2018.

AKIYAMA, H., et al. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? **British Journal of Dermatology**, 2002. **147**(5): p. 879-85.

AMODIO, E.; DINO, C. Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: A review of the published literature (1990—2012). **Journal of Infection and Public Health**, v. 7, p. 92-98, 2014.

ANCUTA, P., et al. Bacterial monitoring of drinking water sources using immunofluorescence technique, image processing software and web-based data

visualization. **Control Engineering and Applied Informatics**. v. 21, p. 54–63, 2019.

ANDRADE, NÉLIO JOSÉ de. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. Ed. Varela, São Paulo, p.412, 2008.

AYCICEK, H., OGUZ, U., KARCI, K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.3, n. 209, p. 203–206, 2006.

AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, p. 313-351, 2017.

BAUTISTA D.A. et al. A sampling regime based on an ATP bioluminescence assay to assess the quality of poultry carcasses at critical control points during processing. **Food Research International**, v. 30, nº. 10, p. 803-809, 1997.

BIRARDA, G., et al. Multi-technique microscopy investigation on bacterial biofilm matrices: A study on *Klesbsiella pneumoniae* clinical strains. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 411, p. 7315–7325.2019.

BOGUSLAVSKY, Y., et al. Eliminating the need for biocidal agents in anti-biofouling polymers by applying grafted nanosilica instead. **ACS Omega**, v. 3, p.12437–12445, 2018.

BORDI, C.; S. de BENTZMANN, *Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge*. **Annals of Intensive Care**, v. 1, p. 19, 2011.

BOTT, T.R. Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. **Applied Thermal Engineering**, v.18, n.11, p. 1059-1066, 1998.

BOU, R., et al., *Nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa infections related to a flexible bronchoscope*. **Journal of Hospital Infection**, 2006. **64**(2): p. 129-135.

CHAE MS; SCHRAFT H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**. v. 18, p. 103-112, 2001.

CHATTERJEE, S., et al. Atomic force microscopy in biofilm study. **Microscopy**. v. 63, p. 269-278, 2014.

CHEN, D., et al. Characteristics and influencing factors of amyloid fibers in *S. mutans* biofilm. **AMB Express**, v. 9, p. 3, 2019.

CHEN, M.; Z. ZHANG; T. BOTT. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. **Biotechnology Techniques**, v.12, nº. 12, p. 875-880, 1998.

CISCHOSKI, A. J., *et al.*, Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.30, p.132–137, 2015.

CLAYBORN, J., *et al.* Assessment of *Salmonella* spp. Attachment to Reusable Plastic Containers Based on Scanning Electron Microscopy and BAX® PCR. **Journal of Food Research**, v. 4, p. 166, 2015.

CORTIZO, M.; M. FERNÁNDEZ, L. M. Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 805-810, 2003.

COSTA, P.D., *et al.* ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345-349, 2006.

COSTERTON, J.W., Introduction to biofilm. **International journal of antimicrobial agents**, v.11, nº.3, p. 217-221, 1999.

CRUZEIRO, P.C.F., P.A.M. CAMARGOS, and M.E. MIRANDA, *Central venous catheter placement in children: a prospective study of complications in a Brazilian public hospital*. **Pediatric Surgery International**, 2006. **22**(6): p. 536-540.

CUCCURULLO, G. *et al.* Infrared thermography assisted control for apples microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v.112, p.319–325, 2012.

DALTON, H.M.; P.E. MARCH. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, nº 3, p. 252-255, 1998.

DE CARVALHO, C.; DA FONSECA, M. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. **Biotechniques**, v. 42, p. 616–620. 2007.

DE OLIVEIRA, D. *et al.* Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, p. 478-483, 2014.

DENKHAUS, E., *et al.*, Chemical and physical methods for characterization of biofilms. **Microchimica Acta**, v. 158 nº 1-2, p. 1-27, 2007.

DOLL, K., *et al.* Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.130, p. 61-68, 2016.

DONLAN, R., *Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? In Bacterial biofilms*. p. 133-161, 2008.

DONLAN, R.M., *Biofilms and device-associated infections*. **Emerging infectious diseases**, v. **7**(2): p. 277, 2001.

DOUCET, F.J.; LEAD, J.R.; MAGUIRE, L.; ACHTERBERG, E.P.; MILLWARD, G.E. Visualization of natural aquatic colloids and particles- A comparison of

conventional high vacuum and environmental scanning electron microscopy. **J. Environ. Monit.** v. 7, p. 115–121, 2005.

DOUGLAS, L.J., *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, 2003. 11(1): p. 30-36.

EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology**

FERNÁNDEZ, L. et al. Preliminary Assessment of Visible, Near-Infrared, and Short-Wavelength–Infrared Spectroscopy with a Portable Instrument for the Detection of 108 *Staphylococcus aureus* Biofilms on Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 82, n<sup>o</sup>. 8, p. 1314–1319, 2019.

FITO, P.J. et al. Control of citrus surface drying by image analysis of infrared thermography. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p.287–290, 2004.

FLEMMING, H. C.; J. WINGENDER. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n<sup>o</sup> 9, p. 623-633, 2010.

Foodborne Disease. Part 6. Transmission and Survival of Pathogens in the Food Processing and Preparation Environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 202–219, 2009.

FOXMAN, B., *Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs*. **The American Journal of Medicine**, 2002. 113(1): p. 5-13.

FRANCOLINI, I.; G. DONELLI. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **Fems Immunology and medical microbiology**, v. 59, n<sup>o</sup> 3, p. 227-38, 2010.

FRÁNKOVÁ, M., *et al.* The low temperature method for environmental scanning electron microscopy - A new method for observation of diatom assemblages in vivo. **Diatom Res.** v. 33, p. 397–403, 2018.

GABRIELSON, J., *et al.* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal Microbiological Methods**, v. 50, p. 63–73, 2002.

GHEORGHE, C.; DEAC, T.; FILIP, N. Image processing techniques used in soil moisture analysis. **INMATEH - Agricultural Engineering**, v. 58, 147–154, 2019.

GOLDBERG, J. Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. **Trends in Microbiology**, v. 10, n<sup>o</sup> 6, p. 264, 2002.

GOWEN, A. A. *et al.* Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n<sup>o</sup> 4, p. 190-200, 2010.



GRIFFITHS M. V. Applications of Bioluminescence in the Dairy Industry. **Journal of Dairy Science**, v.76, nº. 10, p. 3118-3125, 1993.

GRISKIN, V.; IAKUSKIN, O.; STEPENKO, N. Biofouling detection based on image processing technique. In **Computer Science and Information Techniques (CSIT)**, pp. 158–161, 2017.

HAHN, F., *et al.* Escherichia coli detection using thermal images. **Le Génie Des Biosystèmes Au Canada**, v.48, p. 7–13, 2006.

HALABI, M., *et al.* Non-touch fittings in hospitals: a possible source of Pseudomonas aeruginosa and Legionella spp. **Journal of Hospital Infection**, v.49, nº 2, p. 117-121, 2001.

HALL-STOODLEY, L.; J.W. COSTERTON; P. STOODLEY. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, nº 2, p. 95-108, 2004.

HANNIG, C.; FOLLO, M.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p. 1–7, 2010.

HUANG, H., *et al.* Microbial respiratory activity with phospholipid fatty acid of biofilm from full-scale bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 599–605, 2019.

IBARRA, J. G. *et al.* Combined IR imaging-neural network method for the estimation of internal temperature in cooked chicken meat. **Optical Engineering**, v.39, n.11, p.3032-3038, 2000.

JEONG, S.; KIM, J.; KIM, H.; CHUNG, K.; YOON, H. Identification of preponderant marine bacteria and their biofouling characteristics on adsorbents of different sizes and shapes in seawater. **Journal of Marine Science and Technology**. v. 26, p. 458–464, 2018.

KARUNAKARAN, E., *et al.* “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, nº 6, p. 1869-1881, 2011.

KHOURY, A.E., *et al.* Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. **Asaio journal**, v.38, nº 3, p. 174-178, 1992.

KINNER, N.E.; D.L. BALKWILL; P.L. BISHOP. Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v.45, nº 5, p. 1659-1669, 1983.

KOCH, B., *et al.* Carbon limitation induces  $\zeta$ S-dependent gene expression in pseudomonas fluorescens in soil. **Applied and environmental microbiology**, 2001. v. 67, nº 8, p. 3363-3370, 2001.

KOKARE, C., *et al.*, *Biofilm: Importance and applications*. **Indian Journal of Biotechnology**. Vol 8, pp 159-168, 2009.

KOO O.K *et al.* Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. **Food Control**, v.30, p. 292-297, 2013.

KRAUSKO, J.; RUNSTUK, J.; NEDELA, V.; KLÁN, P.; HEGER, D. Observation of a brine layer on an ice surface with an environmental scanning electron microscope at high temperatures and pressures. **Langmuir**. v. 30, p. 5441–5447, 2014.

KUMAR, C.G.; S.K. ANAND. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, nº 1, p. 9-27, 1998.

LAZAROVA, V.; J. MANEM. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. **Water research**, v. 29, nº 10, p. 2227-2245, 1995.

LEON, M. B.; ALBRECHT, J. A. Comparison of adenosine triphosphate bioluminescence and aerobic plate counts on plastic cutting boards. **Journal of Foodservice**, v.18, p.145-152, 2007.

LISTER, P.D., D.J. WOLTER, and N.D. HANSON, *Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22(4), p. 582-610, 2009.

MANICKAVASAGAN, A., *et al.* Thermal imaging to detect infestation by *Cryptolestes ferrugineus* inside wheat kernels. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 186–192, 2008.

MARCOS-ZAMBRANO, L., *et al.* Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut- off- points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 1192–1198, 2014.

MAROTTA, M., *et al.* Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, v. 38, nº 1, p. 101-108, 2002.

MERINO, L., *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, p. 530-540, 2019.

MOREIRA, J. M. R. Effect of surface conditioning with cellular extracts on *Escherichia coli* adhesion and initial biofilm formation. **Food and Bioproducts processing**, v. 104, p. 1-12 2017.

MURGA, R.; P.S. STEWART; D. DALY. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. **Biotechnology and bioengineering**, v.45, nº 6, p. 503-510, 1995.

NEU, T.; LAWRENCE, J. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. **In Productive Biofilms**, p.1–51, 2014.

NGUYEN, T.; RODDICK, F.; FAN, L. Biofouling of water treatment membranes: A review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures. **Membranes**. v. 2, p. 804–840, 2012.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em

NORTON, T., *et al.* Using confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy and phase contrast light microscopy to examine marine biofilms. **Aquatic Microbial Ecology**. v. 16, 199–204, 1998.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, nº 5, p. 257-269, 2010.

NYDER, P.O. Foodservice HACCP. **Foodservice Research International**. v. 13, p. 227-267, 2003.

OJIMA, Y.; NUNOGAMI, S.; TAYA, M. Antibiofilm effect of warfarin on biofilm formation of *Escherichia coli* promoted by antimicrobial treatment. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.7, p. 102–105, 2016.

OKAMOTO K., *et al.* Flocked nylon swabs versus RODAC plates for detection of multidrug-resistant organisms on environmental surfaces in intensive care units. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, p.105-108, 2018.

ORTEGA, M. P. *et al.* Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 573-578, 2010.

OTTO, M., *Staphylococcus epidermidis*-The 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 2009. 7(8): p. 555-67.

OZKAN, A., *et al.* Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. **Micron**, v. 89, p. 60-76, 2016.

PALMER JR, R.; STERNBER, C. Modern microscopy in biofilm research: Confocal microscopy and other approaches. **Current Opinion in Biotechnology**. 1999, 10, 263–268.

PANDE, V., MCWHORTER, A., & CHOUSALKAR, K. *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. **Biofouling**, v. 32, p. 699-710, 2016.

PANTANELLA, F., *et al.* Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità**, v. 25, nº 1, p. 31-42, 2013.

PARIZZI, S. Q. F., *et al.* Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by

PARKER, C. C., *et al.* Geospatial Mapping of Early Cases in Multistate Foodborne Disease Outbreaks: A Strategy To Expedite Identification of

Contaminated Imported Produce, United States, 2006 to 2013. **Journal of food protection**. v. 80, nº. 11, p. 1821–1831, 2017.

PEETERS, E.; NELIS, H.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal Microbiological Methods**, v. 72, p. 157–165, 2008.

PENG, J. S., TSAI, W. C. & CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77. Cap. 1-2, p. 11-18, 2002.

PHINNEY D. M. Identification of residual nanoscale foulant material on stainless steel using atomic force microscopy after cleaning in place. **Journal of Food Engineering**, v.214, p. 236-244, 2017.

RAJAMANI, S., *et al.* Robust biofilm assay for quantification and high throughput screening applications. *Journal Microbiological Methods*, v. 159, p. 179–185 2019.

SENNI, L., *et al.* On-line automatic detection of foreign bodies in biscuits by infrared thermography and image processing. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 146–156, 2014.

SHAMA G.; MALIK D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v.216, p. 115–125, 2013.

SHAMS-NATERI, A.; PIRI, N.; MOKTHARI, J. A new approach to evaluate antibacterial activity of textile materials using image processing technique. **Indian Journal Fibre & Textile Research**. 2018, 43, 483–487.

SIHORKAR, V. and S.P. VYAS, *Biofilm Consortia on Biomedical and Biological Surfaces: Delivery and Targeting Strategies*. **Pharmaceutical Research**, v. 18(9), p. 1247-1254, 2001.

SRIVASTAVA, S. AND A. BHARGAVA, *Biofilms and human health*. **Biotechnology letters**, v. 38(1): p. 1-22, 2016.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STOICA, I.M., *et al.* Biofouling on RO-membranes used for water recovery in the dairy industry. **Journal of Water Process Engineering**. v. 24, p.1–10. 2018.

STOLL, M., SCHULTZ, H.R., BERKELMANN-LOEHNERTZ, B. Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 281–288., 2008.

superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. **Projeto de Pesquisa**.

SURMAN, S.B. et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal of Microbiology Methods**, v. 25, p. 57–70, 1996.

**Technology**. Mar. 2004, v.47, n.1, p.77-83, 2004.

TODD et al. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of

TRAFFANO-SCHIFFO, M. V. et al. Thermodynamic model of meat drying by infrared thermography. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 103–110, 2014.

USAMENTIAGA, R., et al. Infrared Thermography for Temperature Measurement and Non-Destructive Testing. **Sensors**, v. 14, p. 12305–12348, 2014.

VADIVAMBAL, R.; D. S. JAYAS. Applications of thermal imaging in agriculture and food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 186-199, 2011.

VAN DEN DRIESSE, F.; RIGOLE, P.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. **Journal Microbiological Methods**, v. 98, p. 31–34, 2014.

VAN LINDEN, V., et al. Detection technique for tomato bruise damage by thermal imaging. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 599, p. 389-394, 2003.

VARITH, J. et al. Non-contact bruise detection in apples by thermal imaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, p.211-218, 2003.

VERRAN J.; WHITEHEAD K. A. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. **Food and Bioprocess Technology**. v. 84, p. 260-264, 2006.

VILAR, M.J., RODRÍGUEZ-OTERO, J.L., DIÉGUEZ, F.J., SANJUÁN, M.L., YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. **International Journal of Food Microbiology** v.125, p. 357–361, 2008.

VOSS *et al.* Rapid, Noninvasive, and Nondestructive Method for Biofilm Imaging on Metallic Surfaces Using Active Thermography. **Analytical Chemistry**. V. 92, 8, p. 5682–5687, 2020.

WANG, J., *et al.* In situ monitoring of wastewater biofilm formation process via ultrasonic time domain reflectometry (UTDR). **Chemical Engineering Journal**. v. 334, p. 2134–2141, 2018.

WHITEHEAD K. A. *et al.* The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surface. **Biofouling**. v. 25, n<sup>o</sup>. 8, p. 749–756. 2009.

WHITEHEAD K. A.; BENSON P.S.; VERRAN J. Developing application and detection methods for *Listeria monocytogenes* and fish extract on open surfaces in order to optimize cleaning protocols. **Food and Bioprocess Technology**. v. 93, p. 224-233, 2015.

WHITEHEAD K. A.; BENSON P.S.; VERRAN J. The detection of food soils on stainless steel using energy dispersive X-ray and Fourier transform infrared spectroscopy. **Biofiling**. v. 27, nº. 8, p. 907-917. 2011.

WHITEHEAD K. A.; SMITH L. A.; VERRAN J. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. **International Journal of Food Microbiology**. v. 127, p. 121–128, 2008.

WIRTANEN G.; MATILLA-SANDHOLM T. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. **Journal Food Protection**. v. 56, nº 8, p. 678-683, 1993.

WOLF, G., J.G. CRESPO; M.A. REIS. Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.1, n.3, p. 227-251 2002.

WU, Y., *et al.* Does history matter? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. **Journal Soils Sediments**, v. 10, p.223–230, 2010.

ZHANG, T.; H.H. FANG. Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. **Biotechnology Letters**, v. 23, n.5, p. 405-409 2001.

ZHIQIANG, S.; KEWU, H.; ZHANLING, D.; MENG DAN, Z.; YONGQIANG, Y.; JINMING, H. Visible-light-triggered self-reporting release of Nitric Oxide (NO) for bacterial biofilm dispersal. **Macromolecules**, 2019, 52, 7668–7677.

## Autores

Mônica Voss<sup>1</sup>, Sandra Kunde Schlesner<sup>2</sup>, Salah Chaji<sup>1</sup>

1. Department of Drug Science and Technology, Università Degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria n 9, 10125, Turim, Itália.
2. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima n 1000, 97105-340, Santa Maria, Brasil.

\* Autor para correspondência: monicavoss-tca@hotmail.com

---

## Formigas Vetores Mecânicos de Microbiota em Ambiente Hospitalar

Maxelle Martins Teixeira, Afonso Pelli, Maria das Graças Reis

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c7>

### Resumo

As formigas assumem um papel significativo na interação de microrganismos com o ambiente. Vivem em associação com o homem e sua relação como vetor mecânico de microrganismos é significativa, tendo sido objeto de investigação e interesse na área da saúde. A fauna de formigas encontrada no ambiente hospitalar e as espécies de microrganismos carregadas traz consequências práticas dessas interações. Na identificação da fauna intra hospitalar de formigas foi detectada especificidade de certas espécies, sendo maior parte delas pertencentes ao grupo das formigas andarilhas, e os gêneros que apresentaram maior frequência foram *Brachymyrmex*, *Paratrechina*, *Pheidole* e *Tapinoma melanocephalum*. Dentre a fauna intra hospitalar amostrada em pesquisa e relatada na literatura, há predomínio da espécie *Tapinoma melanocephalum*, conhecida como formiga fantasma por ser transparente e dificilmente visualizada. O unicolonialismo desta espécie permite sua circulação pelos ambientes, aumentando o potencial de contaminação e disseminação de microrganismos patogênicos e infecções. Diferentes autores vêm alertando sobre o papel específico de insetos no transporte de microrganismos associados a ambientes hospitalares e infecções nosocomiais. Na década de 70 foi relatada infestação de *Monomorium pharaonis* em 9 hospitais do Reino Unido, onde foram isoladas cepas de *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. No Brasil, estudos realizados da década de 90 ao tempo atual, identificaram espécies de formigas em hospitais, enfatizando o risco na associação destes insetos com infecções hospitalares. Nesse contexto, os artrópodes passaram a ser considerados vetores mecânicos, pois, podem contaminar quando entram em contato com agentes infectantes, transportando-os pelo ambiente. Estudos de investigação da microbiota carregada por formigas foram realizados em inúmeros hospitais, unidades de saúde nas regiões do Norte, Nordeste, Centroeste, Sudeste e Sul do Brasil, hospitais de ensino; bem como a identificação do padrão de resistência desses microrganismos. A partir das cepas isoladas dos exemplares de *Tapinoma melanocephalum*, os resultados apontaram 59 tipos de microrganismos, dentre os quais 7 eram bacilos Gram positivo, 14 bacilos Gram negativo, 22 cocos Gram positivo e 17 fungos filamentosos. *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* do grupo D foram os microrganismos que apresentaram maior resistência aos antibióticos. Embora não tenha sido definido papel exato das formigas em infecções hospitalares, sabe-se do risco como carregadoras de microrganismos e atenção deve ser dada pelas Comissões de Controle de Infecções Hospitalares e Instituições Reguladoras da Saúde Pública.

**Palavras-chave:** Biofilme; detecção; indústrias alimentícias; hospitais; microrganismos; termografia no infravermelho.

## 1. Introdução

As formigas, *Hymenoptera formicidae*, são insetos eusociais com capacidade para estabelecer em áreas urbanas e viver em íntima associação com o homem em ambientes residenciais e hospitalares (Costa et al 2023, e Lobo et al 2023). Em decorrência, têm se tornando objeto de estudo, principalmente quando presente em hospitais e instituições de saúde. Além do incômodo causado por sua presença, podem ser responsáveis por danificar alimentos, aparelhos eletrônicos além de se apresentarem como vetores de microrganismos. Como as espécies andarilhas vivem adaptadas ao ambiente urbano, conseguem sobreviver em praticamente todos os locais que possuem abrigo, água e comida (Lancellotti et al., 2022).

Os estudos com formigas hospitalares tiveram início na Inglaterra com Beatson (1972) e no Brasil a partir da década de 90 por Fowler et al. (1993), seguindo aos dias atuais, demonstrados em hospitais nas diferentes regiões do país (Almeida et al.; 2019; Carvalho et al., 2011; Garcia et al., 2014; Gonçalves et al., 2011; , Leitão et al., 2022; Menezes et al., 2015; Nunes et al., 2018; Oliveira, 2017; Paulino Cordova, 2021).

Os fatores que favorecem a presença de formigas nos hospitais são as estruturas arquitetônicas, proximidade com as residências, o que estimula a migração desses insetos, embalagens de alguns medicamentos que podem trazer ninhos de formigas para o ambiente interno, circulação de grande número de pessoas com roupas e objetos que podem conter ninhos de formigas, além de alimentos que funcionam como atrativo extra (Zarzuela et al., 2002; Barbosa et al 2023).

Muitos relatos demonstram que as formigas atuam como vetores mecânicos de microrganismos patogênicos, tendo sido isoladas diversas espécies de bactérias e fungos a partir daquelas encontradas nos ambientes hospitalares (Almeida et al., 2019). Nesse caso, atuam como fatores de risco de caráter exógeno ou ambiental das infecções nosocomiais, uma vez que as de caráter endógeno são relativas a fatores de risco do próprio paciente (Rodrigues da Silva et al 2023; Martins et al 2018).

Geralmente, a infecção hospitalar é provocada pela própria flora bacteriana humana, que se desequilibra com os mecanismos de defesa do



indivíduo em decorrência da doença, dos procedimentos invasivos (soros, cateteres e cirurgias) e do contato com a flora hospitalar. Algumas das consequências das infecções hospitalares são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante de disseminação de bactérias multirresistentes.

A infecção hospitalar atinge o mundo todo e representa uma das causas de morte em pacientes hospitalizados. Nesse contexto, os vetores de agentes microbianos desempenham papel significativo para o controle de saúde pública, considerando que predominantemente, a política antimicrobiana tem tipicamente dois principais objetivos: controlar custos e a resistência microbiana.

## **2. Biologia das Formigas**

O termo formiga deriva do ácido fórmico. Esta substância é produzida pela glândula ácida das formigas, particularmente daquelas pertencentes à subfamília Formicinae. Entretanto, a maioria das formigas não tem ácido fórmico e pertencem a subfamília Myrmicinae. Assim, passou-se a chamar de Mirmecologia o campo da Entomologia dedicado ao estudo das formigas.

As formigas atuais e conhecidas até 1993 compreendem 16 subfamílias com 51 tribos, 296 gêneros e 9.536 espécies, além de 408 fósseis. Estima-se que existam cerca de 18.000 a 20.000 espécies de formigas em todo o mundo. No Brasil, já estão catalogadas mais de 2.000 espécies e apenas algumas dezenas podem ser consideradas como pragas (Bueno e Campos - Farinha, 1999).

As formigas apresentam uma grande diversidade de formas e comportamentos chegando a possuir diferenças extremas de tamanho, cor, pilosidade e agressividade dentro de um mesmo gênero. Em tamanho do corpo atingem desde menos de 1 milímetro a mais de 4 cm. Colônias podem reunir desde uma dezena de indivíduos a alguns milhões. Ocupam quase todos os nichos disponíveis no ambiente terrestre e nidificam desde a copa das árvores a alguns metros de profundidade no solo (Hölldobler e Wilson, 1990). O odor da colônia é usado para distinguir companheiras de ninho de outras estranhas, no reconhecimento de castas, no desencadeamento do comportamento como limpeza e lambeduras entre diferentes indivíduos na colônia, bem como nas

secreções que estimulam a troca de alimentos (Shorey, 1973). Os feromônios também são utilizados para forrageamento, marcação de trilha e comunicação entre indivíduos, como aviso de perigo e acasalamento (Pasteels et al., 1987).

Uma colônia de formigas é formada de indivíduos adultos e em desenvolvimento: ovos, larvas e pupas. Os adultos, com raras exceções, são fêmeas e estão divididas em pelo menos duas castas: as fêmeas férteis ou rainhas, cuja função primordial é a postura de ovos e as fêmeas estéreis ou operárias que realizam todas as demais atividades da colônia, tais como: coleta de água e alimento, alimentação da cria e da rainha, construção e defesa do ninho. As operárias, por sua vez, podem apresentar formas diferentes (duas ou mais), fato denominado polimorfismo, relacionado com a realização de tarefas diferentes.

Todas as operárias não apresentam asas e as formas aladas correspondem à sexual: rainhas e machos. Estes, geralmente, aparecem apenas uma vez por ano na época de acasalamento, que se dá através da realização do vôo nupcial. Conseqüentemente, uma colônia de formigas é constituída exclusivamente de fêmeas ápteras.

Todas as formigas são sociais e ocorrem, praticamente, em todos os ambientes terrestres, exceto nos pólos. Como qualquer ambiente natural, os sistemas artificiais, entre eles os centros urbanos, podem ser colonizados e explorados por várias espécies de formigas. Do total existente, cerca de 1% das espécies pode ser considerado praga por causar conflito com os interesses do homem e menos de 50 espécies estão adaptadas ao ambiente urbano (Bueno e Campos - Farinha, 1998).

Como já salientado, todas as formigas, junto com os cupins e algumas vespas e abelhas, são altamente eussociais. As características que definem um comportamento eussocial são: 1. Divisão de trabalho, com indivíduo responsável pela reprodução e indivíduo estéreis que são responsáveis por todos os outros trabalhos; 2. Cuidado com a prole, alimentação e proteção das crias; 3. Sobreposições de gerações, pelo menos 2 gerações coabitando o ninho ao mesmo tempo (Delay et al., 1979).

A formiga assim como outros organismos, tem determinadas exigências nutricionais específicas. De acordo com Fowler et al. (1991); Panizzi e Parra (1991) o padrão alimentar básico das formigas é constituído por proteínas,

carboidratos e lipídios. Segundo esses autores as proteínas seriam adquiridas por meio de predação de outros insetos e pequenos invertebrados, os carboidratos por meio de ingestão de açúcares e polissacarídeos provindo do néctar de plantas e excreção de outros insetos e os lipídeos adquiridos pela ingestão de diferentes tipos de óleos e gorduras. Atualmente, podem ser encontradas desde espécies predadoras ativas a coletadoras de sementes, incluindo as generalistas extremas, como as especialistas em coletar cupins e outras formigas.

Uma maior especialização ocorre nas formigas que cultivam o seu próprio alimento, as cultivadoras de fungo (Tribo Attini), evento raro entre as espécies de animais (Hölldobler e Wilson, 1990).

### **3. Formigas: Espécies que invadem as Cidades**

Problemas associados à urbanização incluem, além da concentração exagerada de pessoas, o aumento da poluição do ar e da água, a redução no controle sanitário e também o aumento nas doenças causadas ou transmitidas pelos Artrópodes. Estes animais são os que mais afetam a qualidade de vida da espécie humana através de sua simples presença, da possibilidade de causar prejuízos à agricultura, no armazenamento de alimentos, de afetar estruturas residenciais ou pela ameaça que podem causar à saúde pública (Silvestre, 2000).

Um caso interessante da ecologia das formigas é a adaptação de várias espécies a ambientes ocupados pelo homem. Através da atividade mercantil mundial estas espécies foram disseminadas para as mais diferentes regiões do planeta. Áreas desfavoráveis sob o ponto de vista climático podem ser colonizadas pela capacidade dessas formigas de acompanharem o homem, sendo, portanto chamadas de espécies vagabundas ou super vagabundas (Chen e Nonacs, 2000; Suarez et al., 2000).

As formigas andarilhas, possuem um conjunto de características que lhes permitem viver em íntima associação com o homem: 1- migram com muita facilidade; 2- espécies unicoloniais, ou seja, não possui agressividade entre indivíduos de colônias diferentes; 4- agressividade interespecífica, possui alta agressividade com indivíduos de espécies diferentes; 5- apresentam poliginia, centenas de rainha podem habitar o mesmo ninho; 6- são monomórficas, seu

reduzido tamanho facilita a construção de ninhos em locais pequenos; 7-reproduz por fragmentação, não há o vôo nupcial e o acasalamento ocorre dentro da colônia; sendo assim, a rainha fecundada migra para outro local com algumas operárias formando um novo ninho (Campos-Farinha e Bueno, 2004).

As principais espécies de formigas vagabundas são: *Monomorium pharaonis* - Formiga faraó; *Linepithema humile* - Formiga argentina; *Paratrechina longicornis* e *P. fulva* - Formiga louca; *Pheidole megacephala* - Formiga cabeçuda; *Tapinoma melanocephalum* - Formiga fantasma; *Wasmannia auropunctata* - Pequena formiga de fogo; *Camponotus* spp. - Formiga carpinteira; *Solenopsis* spp. - Formiga fogo ou lava-pés; *Crematogaster* spp. - Formiga acrobática (Ulloa, 2003; Bueno e Campos-Farinha, 1999).

As formigas urbanas percorrem longas distâncias em busca de alimentos, e nestes ambientes, colônias são encontradas em jardins, vasos, madeiras, sob pedras, em buracos no concreto, sob assoalho, aparelhos eletrodomésticos; praticamente em qualquer local próximo a água e comida. Além do incômodo de sua presença e de causarem prejuízo por danificar alimentos armazenados, aparelhos elétricos e outras estruturas, o principal dano que as formigas podem acarretar é quando ocorrem em Unidades de Saúde sendo vetores de microrganismos, encontradas em alimentos estocados e nos ambientes dos hospitais (Bueno e Campos-Farinha, 1999; Robinson, 1996).

#### **4. Formigas como Vetores de Microrganismos**

As formigas nem sempre foram vistas pela população como insetos nocivos e sua relação com o possível transporte de microrganismos foi investigada a partir da década de 70. Na verdade, elas eram vistas mais como um incômodo já que apareciam em grande número, do que como um vetor mecânico importante (Ipinza-Regla, 1981).

Diferentes autores há algum tempo vêm alertando sobre o papel específico destes insetos no transporte de microrganismos associados a ambientes hospitalares e infecções nosocomiais (Beatson, 1972; Edwards e Backer, 1981; Ipinza-Regla et al., 1981; Eicheler, 1990; Chadee e Maitre, 1990; Sramova et al., 1992; Sawicka, 1993).

Segundo Laser et al. (2000), os artrópodes são considerados vetores mecânicos uma vez que podem se contaminar quando entram em contato com

agentes infectantes, transportando-os pelo ambiente.

Beaston (1972) relatou pela primeira vez a presença de infestação de *Monomorium pharahonis* em 9 hospitais do Reino Unido, onde foram isoladas cepas de *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Clostridium spp.*

Cartwright e Clifford (1973) descreveram a presença de formigas entre a embalagem protetora externa e o frasco de soro fisiológico. Algumas das formigas encontradas foram transferidas para placas de cultura onde se observou crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando o perigo desses insetos em hospitais.

No Brasil esses estudos são relativamente recentes. Fowler et al. (1993) fizeram um levantamento de espécies de formigas em hospitais; foram encontradas 14 espécies cuja predominância variava de uma instituição para outra. Como existe uma variedade de espécies presente em uma única edificação os autores enfatizam um risco maior de associação destes insetos a infecções hospitalares. Além disso, a freqüente utilização e higienização dos hospitais promovem um desgaste dos materiais mais frágeis, especialmente nos revestimentos de frestas e junções de paredes, parede-piso e azulejos. Essas pequenas quebras e rachaduras são o abrigo ideal para inúmeros insetos, dentre eles as formigas, que freqüentam as estruturas urbanas (Schuller, 1999).

O hábito das formigas regurgitarem o alimento que irá servir de fonte nutritiva para os indivíduos jovens, torna o ninho um ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos, pois possui temperatura e umidade ideais (Beadson, 1972).

Outros problemas causados pelas formigas em hospitais incluem vários tipos de irritações e lesões na pele, além de causar rejeição psicológica e poder falsear resultados laboratoriais ao passarem de uma placa para outra (Eicheler, 1990).

Gray et al. (1995) descreveram em seu trabalho que a primeira infestação por *Hypoponera punctatissima* em hospitais, provavelmente ocorreu na Inglaterra. Formigas aladas foram vistas próximo às enfermarias e a mais provável fonte de infestação poderia ser uma cavidade na parede, que era habitado por moscas cujas larvas serviam de presas para as formigas. Num estudo sobre as bactérias presentes no corpo das formigas constatou-se que

eram colonizadas por *Streptococcus lactis*.

Na indústria alimentícia foi descoberta uma fonte muito importante de patógenos nos alimentos. Em um estudo chileno feito por Ipinza – Regla et al. (1984) praticamente todas as amostras de formigas se mostravam contaminadas por diferentes tipos de patógenos e estes eram transmitidos aos alimentos em uma alta porcentagem (46 % das amostras analisadas, todas sem patógenos antes da passagem das formigas). Em outro estudo similar, realizado em hospitais Mexicanos pelos mesmos autores, demonstram que as formigas “Argentinas” (*Iridomyrmex humilis*) constituem um vetor de diferentes espécies de bacilos, representando um perigo como transmissor destes organismos relacionados a quadros patológicos e a infecções hospitalares. Ipinza – Regla et al. (1981)

## 5. Formigas no Ambiente Hospitalar: Espécies Prevalentes

As formigas possuem grande capacidade de mobilidade e adaptação a ambientes urbanos. Quando presentes em ambiente hospitalar podem tornar-se carreadoras de bactérias, principal micro-organismo responsável por infecções hospitalares (Garcia et al. 2014). Por isso, tem sido alvo de trabalhos de investigação em diversos hospitais e pesquisas de identificação e caracterização das espécies encontradas nos diferentes ambientes.

As seguintes espécies de formigas foram registradas *Tapinoma melanocephalum* (Fabricius, 1793), *Monomorium pharaonis* (Linnaeus, 1758), *Paratrechina fulva* (Mayr, 1862), *Pheidole sp.*, *Camponotus atriceps* (Fr.Smith, 1858), *Brachymyrmex sp.*, *Dorymyrmex sp.* (Rando et al 2009).

Inúmeros trabalhos com esse foco de pesquisa, relatam a ocorrência de tal associação em hospitais dentro do Brasil e nos países do hemisfério norte.

Nos meses quando a temperatura é mais elevada ocorre maior abundância e diversidade das formigas. Por outro lado, quando ocorre redução na temperatura, numa faixa entre 32,2 graus celsius e mínima de 21,7 graus celsius as formigas diminuem sua atividade (Rodrigues Carvalho et al., 2011).

Embora, a quantidade e diversidade de formigas variem com a temperatura, as espécies detectadas em hospital de região mais fria apresentaram predominantes a *Tapinoma melanocephalum* em 48% das amostras, seguida da *Paratrechina longicornis*, 23%, a *Monomorium florícola* em

13%, a *Tetramorium bicarinatum* em 10%, e espécies do genero *Camponotus sp. 1 e sp. 2* 3% para cada amostra (Cordova e Rochelle 2021). Pesquisa realizada em área urbana, periférica a um hospital de Uberaba Minas Gerais - Brasil teve como objetivo avaliar os parâmetros ecológicos, riqueza, diversidade e similaridade de formigas. Para tanto, utilizou-se de uma pesquisa quantitativa em que formigas (n = 692) foram coletadas utilizando mel de abelha como isca, mensalmente a partir do verão ao inverno do ano seguinte por 13 meses. Os resultados apontaram que os gêneros mais frequentes foram *Brachymyrmex* (69,2%), seguido por *Paratrechina* (61,5%), *Pheidole* (46,1%) e *Tapinoma* (30,7%). Julho foi o mês com maior riqueza, enquanto março com a maior densidade, concluindo que a semelhança entre o inverno e verão foi a mesma, 50% (Pelli et al, 2013).

Pesquisa realizada em hospital localizado em região quente as espécies encontradas com maior frequência foram a *Tapinoma melanocephalum*, *Paratrechina longicornis* e *Peydole megacephala* (Almeida et al 2019).

Assim, os resultados dos estudos realizados nos hospitais constataram a presença da *Tapinoma melanocephalum* (Fabricius 1793) juntamente com a *Paratrechina longicornis* como as espécies mais comuns (Campos Farinha et al., 1995). Em um hospital de clínicas em Uberaba dados semelhantes foram encontrados, *Tapinoma melanocephalum*, *Pheidole sp.* e *Paratrechina longicornis* (Costa et al. 2006, Pelli et al. 2013).

Vale ressaltar que a *Tapinoma Melanocephalum*, espécie exótica originaria da África ocidental é conhecida por formiga fantasma, seu tamanho e coloração dificultam a visualização, podendo passar despercebida nos ambientes. Adaptada aos ambientes urbanos como hospitais e residências, suas colônias apresentam várias rainhas e grande número de operarias, com pouca organização dos ninhos, construídos em diversos locais como frestas de azulejos e sob vasos (Rodrigues Carvalho et al., 2011).

No cômputo dos resultados, percebe que há predominância das certas espécies de formigas como carreadoras de microorganismos, bacterias e fungos, assumindo assim papel como vetores mecânicos nos hospitais.

## 6. Cepas de Microorganismos Isoladas de Formigas em Hospitais

Nos hospitais, sao encontradas as espécies de bactérias *Staphylococcus*

sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. Partindo do pressuposto, numerosas pesquisas investigando as formigas como carreadoras de bactérias e de fungos tem sido realizadas. As espécies de formigas carreadoras mais prevalentes foram a *Paratrechina longicornis*, *Pheidole megacephala*, *Solenopsis saevissima* e *Tapinonoma melanocephalum* (Almeida et al, 2019).

Das formigas capturadas nos diversos ambientes hospitalares na região de Alfenas, Minas Gerais, a partir do tegumento, foram realizadas análises microbiológicas e isoladas cepas de diversos microorganismos. Os principais gêneros de formigas encontrados foram *Monomorium* e *Paratrechina* e os microorganismos identificados foram *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A presença de bactérias potencialmente patogênicas no tegumento das formigas encontradas no ambiente hospitalar alerta para o fato de esses insetos serem potenciais vetores de doenças. (Menezes et al., 2015).

Dentre as espécies de bactérias isoladas predominaram em 14 % das formigas, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus viridans*, e o *Bacillus spp.* As demais bactérias encontradas, como a *Klebsiella pneumoniae* resultaram em 9% dos espécimes; em seguida a *Enterobacter spp.*, com 5%; e *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella ozaenae* e *Staphylococcus aureus*, em 4% das amostras. O *Staphylococcus coagulase* negativa também esteve presente em 14% das amostras (Córdova e Rochelle, 2021).

A ocorrência de fungos em áreas hospitalares tem sido relatada em diferentes países. No Brasil inclui os gêneros filamentosos *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Curvularia*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* e o gênero levedura como a *Candida*. Nos ambientes hospitalares podem estar associados a várias micotoxicoses, sendo relatados como amplamente envolvidos em infecções oportunistas associadas a imunodeficiência de pacientes com câncer, HIV/AIDS, em tratamento com imunossupressor.

As espécies de formigas coletadas, *Tapinoma melanocephalum*, *Paratrechina longicornis* e *Pheidole megacephala* foram as que carreavam maior diversidade de fungos seguida da *Solenopsis saevissima*. A partir destas, os fungos isolados e identificados foram *Mucor sp.*, *Acremonium sp.*,



*Paecilomyces sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium solani*, *Cladosporium sp* e *Rizhopus sp*. Os setores hospitalares que apresentaram maior diversidade de fungos foram Leitos, Berçário, Banco de Leite e Pediatria SUS (Almeida et al 2019).

Diante das tantas constatações de bactérias e fungos veiculados pelas formigas nos ambientes hospitalares, descritos na literatura, pode-se concluir que estas oferecem riscos aos pacientes suscetíveis internados e atuam como potenciais vetores de doenças. Assim, conhecer as formigas e os patógenos carreados no ambiente hospitalar é importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle das infecções.

## 7. Infecção Hospitalar

Uma das maiores preocupações na área de saúde é a alta incidência de infecção hospitalar (IH) ou nosocomial, isto é, infecção adquirida em ambientes hospitalares durante a internação ou após a alta do paciente, quando este esteve hospitalizado ou passou por procedimentos médicos (Garner, 1998). Geralmente a infecção hospitalar é provocada pela própria flora bacteriana humana, que se desequilibra com os mecanismos de defesa antifecciosa em decorrência da doença, dos procedimentos invasivos (soros, cateteres e cirurgias) e do contato com a flora hospitalar. Algumas das conseqüências das infecções hospitalares são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante de disseminação de bactérias multirresistentes (ANVISA, 2004 a). Estudos realizados nos Estados Unidos pelo Centro para Controle de Doenças (CDC) de Atlanta, através do projeto SENIC - *Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control*, mostram que a infecção hospitalar prolonga a permanência de um paciente no hospital em pelo menos 4 dias, ao custo adicional de U\$ 1.800,00. Para reduzir o problema, a Organização Mundial de Saúde recomenda a adoção de políticas nacionais de prevenção e controle de infecção hospitalar estimulando a constituição de CCIHs - Comissões de Controle de Infecção em todos os Hospitais (OMS, 2000).

As infecções nosocomiais apresentam um caráter endógeno ou exógeno tendo as primeiras como fatores de risco os relativos ao próprio paciente, como a microbiota, faixa etária, estado nutricional e emocional, doença de base, imunossupressão, doença crônica, uso de antimicrobianos e quimioterápicos e

período prolongado de permanência no hospital e outros. As de caráter exógenos estão associadas ao ambiente como: infecção cruzada, procedimentos invasivos, hábito dos profissionais de não lavar as mãos, uso de materiais, equipamentos e soluções tópicas e endovenosas contaminadas, limpeza e higiene do ambiente inadequada, ausência de um planejamento que atenda às normas preconizadas para o processamento dos Resíduos do Serviço de Saúde e de combate aos vetores entre outras (Pereira e Moriya, 1994; Ferraz, 1997).

### **7.1. Histórico do Controle de Infecção Hospitalar**

Embora a infecção hospitalar (IH) seja problema antigo, foi somente a partir dos anos 70 que as instituições hospitalares começaram a fazer estudos mais aprofundados sobre o assunto. Entre 1983 e 1985, a Organização Mundial de Saúde (OMS) deu destaque ao tema promovendo um levantamento em 14 países com o objetivo de quantificar a incidência da Infecção Hospitalar. Ao final do estudo, no entanto, os próprios organizadores reconheceram que a amostra não era representativa, porque a incidência da infecção hospitalar variava de hospital para hospital e de uma região para outra. Baseado nesta constatação, infectologistas do mundo inteiro garantem que não existe um índice aceitável de infecção hospitalar. Neste estudo a média de prevalência de Infecção Hospitalar encontrada foi de 8,7%, variando de 3% a 21% (Mayon-White, 1988).

No Brasil, a década de 80 foi a mais importante até o momento para o desenvolvimento do controle de infecção hospitalar. Começou a ocorrer uma conscientização dos profissionais de saúde a respeito do tema e foram criadas Comissões de Controle de Infecções nos Hospitais (CCIH). O Ministério da Saúde (MS) criou em 31/01/1983 um grupo de trabalho ao lado de membros do Ministério da Educação e da Previdência Social, que elaborou um documento normativo, gerando a Portaria MS 196/83, de 24/06/83 que recomendava aos hospitais a criação de CCIH e dava orientações sob a forma de anexos. Este mesmo grupo elaborou um manual e realizou em 1984, na Capital Federal, com financiamento da Organização Pan-Americana de Saúde, um curso internacional que serviu de base para a elaboração do “Curso de Introdução ao Controle das Infecções Hospitalares”. Atualmente, as diretrizes gerais para o Controle das Infecções em Serviços de Saúde são delineadas pela Agência

Nacional de Vigilância Sanitária, na Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, através da Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde, e novo impulso tem sido dado no sentido de enfrentar a problemática das infecções relacionadas à assistência (ANVISA, 2000).

## 7.2. Epidemiologia, Incidência e Prevalência das Infecções Hospitalares

A infecção hospitalar atinge o mundo todo e representa uma das causas de morte em pacientes hospitalizados. No Brasil, segundo o MS, a taxa média de infecção hospitalar é de cerca 15%, ao passo que nos EUA e na Europa é de 10%. Cabe lembrar, no entanto, que o índice de infecção hospitalar varia significativamente, pois está diretamente relacionada com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital.

Diferentes microrganismos como bactérias, fungos e vírus causam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias que constituem a flora humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis devido sua baixa virulência, mas que podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido – denominadas assim de bactérias oportunistas.

O segundo grupo de importância médica nas infecções hospitalares são os fungos, sendo o *Candida albicans* e o *Aspergillus* sp. os patógenos mais freqüentes. Os fungos são responsáveis por aproximadamente 8% das infecções hospitalares. Dentre as viroses, o vírus da hepatite B e C, enteroviroses e viroses associadas com pneumonia hospitalar são comumente registrados. As viroses representam por volta de 5% das infecções (ANVISA, 2004 b).

A erradicação da infecção hospitalar não é possível, devido a dois fatores principais, um de caráter endógeno relacionada às condições de saúde do hospedeiro e outro de caráter exógeno, relacionado às causas externas, ou seja, do ambiente. Entretanto, é relevante considerar que a IH pode causar a interrupção da vida produtiva do indivíduo, possibilitando que ações judiciais legais sejam impetradas pelo paciente acometido, contra o hospital e o profissional (Zanon, 1990; Pereira e Moriya, 1994; Ferraz, 1997; Morel e Bertussi Filho, 1997; BRASIL. MS, 1998; Dias Ângelo, 1998).

Geralmente os sítios de infecção hospitalar mais freqüentemente atingidos são o trato urinário, feridas cirúrgicas e trato respiratório. Os patógenos

que lideram nas infecções hospitalares são as bactérias Gram negativas, *Escherichia coli*: trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue; *Pseudomonas* sp.: trato urinário, trato respiratório, queimaduras; *Klebsiella* sp.: trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas; *Proteus* sp.: trato urinário, feridas cirúrgicas; *Enterobacter* sp.: trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas; e *Serratia* sp.: trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas. Para as bactérias Gram positivas, *Streptococcus* sp. é incriminado como responsável pelas infecções no trato urinário, trato respiratório e feridas cirúrgicas; *Staphylococcus aureus*: pele, feridas cirúrgicas e sangue e *Staphylococcus epidermidis*: pele, feridas cirúrgicas e sangue. Dentre os fungos o agente mais freqüente é *Candida albicans* sendo responsável pela infecção no trato urinário e sangue (ANVISA, 2004 b).

### 7.3. Fatores de Risco

A presença de comorbidades, neoplasia, neutropenia, uso prévio de antimicrobiano, internação em UTI, transferência de outro hospital, entubação traqueal por mais de 24 horas e estadia prolongada estão independentemente associadas com infecção hospitalar (Sax e Pittet, 2002).

Em estudo feito por Vilas Boas e Ruiz (2004) em que foram investigadas as ocorrências de infecção hospitalar em idosos em um Hospital Universitário isolaram-se agentes microbiológicos em 55,2% dos episódios de infecção hospitalar. Os agentes isolados foram: *Pseudomonas aeruginosa* (35,7%), *Staphylococcus aureus* (21,5%), *Escherichia coli* (14,2%), *Staphylococcus coagulase* negativa (11,9%), bacilo Gram negativo não fermentador (9,5%) e *Candida* sp (7,2%).

## 8. Antimicrobianos

Com o aparecimento dos antimicrobianos, há mais de sessenta anos, mudou o curso da história das enfermidades infecciosas; e assim a taxa de mortalidade diminuiu de 797 por 100.000 em 1900 a 36 por 100.000 em 1980. Logo, na década de 80, houve um aumento de óbito, devido fundamentalmente a aparição da SIDA.

É certo que o desenrolar do uso dos antimicrobianos tem sido uma das medidas mais importantes que conduziram ao controle das infecções

bacterianas no século XX, outros avanços na área da saúde, como as vacinas e os programas de prevenção efetivos, as melhorias em medidas sanitárias como a higiene, nutrição e níveis de qualidade de vida, também contribuíram a diminuir as enfermidades infecciosas.

Por outro lado, a terapia antimicrobiana forneceu ferramentas para prevenir algumas infecções e curar outras, além de interromper a transmissão de algumas delas.

Naturalmente os organismos buscam recursos no ambiente; entretanto essa demanda pode ser conflitante com outros organismos. Ao longo da história evolutiva desses grupos, alguns desenvolveram mecanismos químicos, bioquímicos ou fisiológicos de defesa. A descoberta acidental da penicilina, por Alexander Fleming, marcou o advento da utilização de antimicrobianos. Associada a essa prática vários autores sucessivamente descreveram o desenvolvimento de resistência a esses fármacos (Sánchez et al., 2006).

Apesar dos êxitos alcançados por medidas sanitárias preventivas e pelo uso destes fármacos, a utilização deve sempre partir do princípio da parcimônia, pois a introdução de um antimicrobiano vem seguida da seleção de populações resistentes.

## 9. Cepas de Microrganismos com Resistência Medicamentosa

O primeiro caso de resistência a antimicrobianos começou com a aparição de cepas de *Staphylococcus* resistentes a penicilina, no começo dos anos 50. Posteriormente, a aparição de multirresistência de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Shigella* e *Plasmodium falciparum* se fez presente.

Por outro lado, a resistência de germes nosocomiais aos antimicrobianos representa um grave problema, especialmente relacionado com bacilos Gram-negativos como: enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp, *Serratia marcescens* e cocos Gram-positivos como *Staphylococcus* resistentes a meticilina, *Enterococcus* resistentes a vancomicina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (Martín e Carmona, 2003).

Nas últimas décadas a resistência microbiana vem aumentando rapidamente em todo o mundo, particularmente no ambiente hospitalar, e com

isso o risco de disseminação de agentes patogênicos resistentes também aumenta. Muitos estudos têm demonstrado que a resistência aos antibióticos constitui um problema crescente. Por exemplo, o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) foi, inicialmente, um problema dos hospitais, mas, atualmente, está a ser cada vez mais notificado como uma infecção adquirida na comunidade (ANVISA, 2005; Mato et al., 1998). Segundo a ANVISA (2005) as UTIs são mais propícias a infecções graves, pois, os pacientes são submetidos a vários procedimentos invasivos e geralmente utilizam antibióticos de amplo espectro de ação. O uso indiscriminado dos antimicrobianos na comunidade e também no ambiente hospitalar é um fator de risco importante para aparecimento e disseminação da resistência microbiana.

Apesar da importância deste fato, dados nacionais sobre resistência microbiana no ambiente hospitalar assim como sobre o uso de antimicrobianos de largo espectro de ação ainda são escassos, principalmente no que diz respeito à acurácia dos dados microbiológicos. Para tanto, são adotadas as políticas de antimicrobianos cujos objetivos principais são: controlar custos e a resistência microbiana (ANVISA, 2005). Entretanto, implantá-las sem adesão da equipe de saúde ou sem respaldo de uma criteriosa análise da literatura pode, ao contrário, elevar as despesas e selecionar cepas resistentes

### **9.1. Perfil de Resistência aos antimicrobianos veiculadas por formigas hospitalares**

Trabalhos com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de formigas encontradas nos ambientes hospitalares tem sido realizados, por meio de antibiograma pelos métodos de difusão em ágar com discos de papel contendo antibiótico. Foram analisadas as cepas bacterianas pela medida dos halos de inibição do crescimento do micro-organismo de acordo com CLSI, 2013 / Clinical and Laboratory Standards Institute (Garcia et al., 2014, Teixeira et al., 2007).

Em alguns trabalhos de pesquisa as bactérias isoladas não foram consideradas multirresistentes, as enterobactérias apresentaram sensibilidade a cefalosporinas de terceira geração e o *Staphylococcus* à Oxacilina. (Córdova e Rochelle, 2021). Entretanto, em grande parte deles, os resultados obtidos demonstraram que as cepas bacterianas encontradas nas formigas se

apresentaram multirresistentes a antimicrobianos distintos. Para os experimentos foram utilizadas amostras de *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Shigella* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. Coagulase negativa isolados de formigas capturadas em ambientes hospitalares.

Frente as bactérias gram-negativas, foram testados os antimicrobianos ciprofloxacina, sulfa+trimetoprim, aztreonam, amicacina, gentamicina, ampicilina, ceftriaxona, cefalotina, imipenem, cefazolina, imipenem, nitrofurantoina, norfloxacino.

Para as bactérias gram-positivas foram utilizados clindamicina, ciprofloxacina, sulfa+trimetropin, eritromicina, penicilina, tetraciclina, gentamicina, rifampicina, nitrofurantoina, claritromicina.

Decorrido o período de incubação, realizada a medida dos halos de inibição e interpretados os resultados (CLSI, 2013), as cepas de bactérias gram-negativas apresentaram resistência a pelo menos um tipo de antibiótico, sendo que o aztreonam e a ampicilina foram os antibióticos com menor eficácia *in vitro* para enterobactérias, seguidos de penicilina e eritromicina para cocos gram-positivos (Garcia et al. 2014).

Outra pesquisa realizada em Hospital Universitario foi demonstrado que *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* do grupo D isolados da espécie *Tapinoma melanocephalum* foram os microorganismos que apresentaram maior resistência a antibióticos (Teixeira et al 2007).

Desta forma, fica clara a necessidade de erradicar as formigas do ambiente hospitalar e também traçar adequadamente o protocolo terapêutico da antibioticoterapia, que é um dos fatores que contribui para a prevenção do desenvolvimento de resistência medicamentosa, diminuindo assim o risco de infecção nosocomial por bactérias resistentes.

## 10. Conclusão

As infecções são alvos de preocupação na área da saúde, incluindo a infecção hospitalar ou nosocomial, resultantes do contato dos agentes infectantes bactérias, fungos e vírus presentes no meio ambiente ou carreados por vetores. Os agravantes da infecção hospitalar são a resistência antimicrobiana das cepas, a presença dos pacientes susceptíveis e os



procedimentos invasivos. Como consequência dessas infecções tem o aumento do tempo de internação com os custos decorrentes, a diminuição da produtividade por faixa etária e o risco de morte dos pacientes, constituindo assim um problema de saúde pública. Existe preocupação por parte da Organização Mundial da Saúde, no sentido de reduzir o problema com a adoção de políticas nacionais de prevenção e controle de infecção hospitalar. Nesse contexto, faz-se importante alertar para o controle dos vetores e a consequentemente disseminação de microorganismos patogênicos e oportunistas nos ambientes. Nesse sentido, as formigas oferecem riscos como vetores mecânicos de microrganismos, de cepas resistentes aos antimicrobianos, aos pacientes internados nos hospitais. Conhecer as espécies de formigas no ambiente hospitalar, bem como os patógenos carreados e o perfil de resistência aos antimicrobianos veiculadas por esses vetores, podem subsidiar ações educativas e estratégias de controle das infecções in loco nos hospitais, bem como desenvolver programas governamentais de prevenção.

## 11. Referências

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Curso básico de controle de Infecção hospitalar, caderno A: Epidemiologia para o Controle de Infecção Hospitalar, 2000.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. Revista Saúde Pública, v. 38, n. 3, p. 475-8, 2004 a. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000300022>

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar, 2004 b.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Projeto de Implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Termo de Cooperação ANVISA/OPAS, 2005.

ALMEIDA, E. M. *et al.* ANTS AS BACTERIA AND FUNGI VECTORS INSIDE A HOSPITAL IN SOUTH BAHIA. I Congresso Internacional das Ciencias da Saude COINTER – PDVS, 2019. Apresentação: Comunicação Oral,. <https://doi.org/10.31692/ICOINTERPDVS.2019.0004>

AZEVEDO, F. ET AL., Formigas (hymenoptera: formicidae) em uma paisagem suburbana no noroeste do estado do paraná, Brasil. Artigo Original em Arquivos do Mudi, v. 26, n. 1, p. 23-38, 2022. <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi> (acessado em 24 de agosto de 2023).



BARBOSA JEC, BARROS RP DE, COSTA MD, ARAUJO SFM DE. Observação do comportamento alimentar de formigas em ambiente doméstico. Div Journ [Internet]. 10º de janeiro de 2023 [citado 12º de setembro de 2023];8(1). Disponível em: [https://diversitasjournal.com.br/diversitas\\_journal/article/view/2037](https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/2037)

BEATSON, S. H. Pharaoh's ants as pathogens vectors in hospitals. The lancet, v. 19, n. 1, p. 425-427, 1972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)90869-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)90869-0)

BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas Urbanas: Comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. Revista Vetores & Pragmas, Ano I, v. 12, p. 13- 16, 1998. ISSN 1982-4262

BUENO, O.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas Urbanas: Estratégias de Controle. Revista Vetores & Pragmas, Ano II, v. 5, p. 5–7, 1999. ISSN 1982-4262

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998.

CAMPOS-FARINHA, A. C. C.; BUENO, O. C. Formigas urbanas: comportamento e controle. Biológico, v.16, n.1/2, p. 47 - 48, 2004. ISSN 1980 – 6221.

CARTWRIGHT, R. Y.; CLIFFORD, C. M. Pharaoh's ants. Lancet, v. 2, n. 7843, p. 1455-6, 1973. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)90869-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)90869-0)

CARVALHO, AP; SILVA, C. G.; FONSECA, A. R. Diversidade de formigas em um hospital público no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.11, p. 67-73, 2011. ISSN 1519-5228

CHADEE, D.; MAITRE, A. L. Ants: potential mechanical vectors of hospital infections in Trinidad. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine e Hygiene, v. 84, p. 297, 1990. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90294-O](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90294-O)

CHEN, J. S. C; NONACS, P. Nest mate recognition and intraspecific aggression based on environmental cues in Argentine ants (*Hymenoptera: Formicidae*). Annals of the Entomological Society of America, v. 93, p. 1333-1337, 2000. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[1333:NRAIAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[1333:NRAIAB]2.0.CO;2)

CORDOVA, P., ROCHELLE M. Formigas no ambiente hospitalar Especies prevalentes e bacterias carreadas. TCC de Graduação. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Biologia, 2021. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/223985>

COSTA, S. B.; PELLI, A.; CARVALHO, G. P.; OLIVEIRA, A. G.; SILVA, P. R.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, E.; TERRA, A. P. S.; RESENDE, M. E.; OLIVEIRA, C. C. H. B.; MORAIS, C. A. Formigas como vetores mecânicos de microorganismos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 6, p. 527-529, 2006. ISSN 0037-8682.

COSTA MD, ARAUJO SFM DE, BARBOSA JEC, MENDES G DE L, SANTOS D DE S, LOPES EKS, SILVA KCB DA, BARBOSA KV, GALDINO W DE O. Observation of the feeding behavior of ants (Hymenoptera: Formicidae) in a

domestic environment. RSD [Internet]. 2023 Jan.3 [cited 2023 Sep.12];12(1):e9912139626. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/39626>

DELAY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL, A. H. **An Introduction to Insect Biology and Diversity**. 2. Ed. McGraw-Hill, Co. NY, USA, 1979. 696 p.

DIAS ANGELO, D. A. A manutenção de um ambiente hospitalar biologicamente seguro: avaliação microbiológica dos leitos de um hospital geral antes e depois de sua limpeza terminal. Tese de doutorado. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1998.

EDWARDS J. P.; BAKER L. F. Distribution and importance of Pharaoh's ant *Monomorium pharaonis* (L) in National Health Service hospitals in England. J. Hospital Infection, v. 2, p. 249 - 254, 1981. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(81\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0195-6701(81)90045-1)

EICHELER, W. Health aspects and control of *Monomorium pharaoni*. In: MEER, R. K. V.; JAFFE, K., **Cedeno A (eds) Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder. Westview Press, 1990. p. 671-675.

FERRAZ, E. M., FERRAZ, A. A. B, BACELAR, T.S. A infecção cirúrgica no contexto das infecções hospitalares. In: Ferraz, E. M. **Infecção em Cirurgia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997. pp.7-24.

FOWLER, H.G.; FORTI, L.C.; BRANDÃO, C.R.; DELABIE, J. H.C.; VASCONCELOS, H.L. De. Ecologia nutricional de formigas. In: PANNIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos**, São Paulo: Manole, 1991. p. 141-223.

FOWLER, H. G. *et al.* Ants as Potential Vectors of Pathogens in Hospitals in the state of São Paulo, Brazil. Insect Sci. Applic., v. 14, n. 3, p. 367-370, 1993. <https://doi.org/10.1017/S1742758400014879>

GARCIA, T.I. *et al.* PERFIL DE RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FORMIGAS DE UM HOSPITAL DE CAMPO MOURÃO – PR. Revista Saúde e Pesquisa, v. 7, n. 2, p. 207-211, maio/ago. 2014 - ISSN 1983-1870

GARNER, J. S. *et al.* Definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control, v. 16, p.128-40, 1998. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(88\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0196-6553(88)90053-3)

GONCALVES, M. G. *et. al.* Associação entre formigas (Hymenoptera: Formicidae) e bactérias patogênicas em cinco hospitais do município de Pelotas, RS. Arq. Inst. Biol. v. 78, n.2, p.287-295, 2011. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p2872011>

GRAY, K. J. *et al.* Roger's ants: a new pest in hospital. British Medical Journal Clinical Research Edition, v. 311, n. 129, p. 5-9, 1995. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6997.129b>

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Harvard: University Press, 1990,

732 p.

IPINZA-REGLA, J. *et al.* *Iridomyrmex humilis* 'hormiga argentina' como vector de infecciones intrahospitalarias: in Estudio bacteriologico. Folia Entomológica Mexicana, v. 50, p. 81-96, 1981. ISSN 0430 8603

IPINZA-REGLA J. *et al.* *Iridomyrmex humilis* (Formicidae) y su papel como posible vector de contaminación microbiana en industrias de alimentos. Folia Entomológica Mexicana, v. 62, p. 111-124, 1984. ISSN 0430 8603

LANCELLOTTI IR, MAYHÉ-NUNES AJ, FEITOSA RM, PORTUGAL A DOS S, SANTOS MG. Ants associated with fronds of the tropical bracken fern *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*. *Biota Neotrop* [Internet]. 2022;22(4):e20221416. Available from: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2022-1416>

LASER, W.; BARBOSA, V.; BARUZZI, R. G.; RIBEIRO, M.; FRANCO, L. J. **Elementos de Epidemiologia Geral**, 1. Ed. São Paulo: Ateneu, 2000. 178 p.

LEITÃO, F. N. C.; NEGREIROS, A. P. V.; ALMEIDA NETO, R. S.; DEUS, M. B. B.; SANTOS, J. S. ; LEITAO, J. O. ; RODRIGUES, A. S. ; MENDES, J. E. T. ; FARIAS, A. C. ; MORAIS, M. J. D. Formigas como veiculadoras de microorganismos em ambiente hospitalar. In: **Open Science Research VI**, 2022. São Paulo: Editora Científica Digital, v. 6, p. 2039-2052. <https://doi.org/10.37885/220910035>

LOBO NCR, RIBEIRO LM, PEREIRA JR, ALMEIDA ÂNGELA A DE, ALMEIDA FS. Efeitos de fatores ambientais sobre as assembleias de formigas arborícolas e epigéicas na Floresta Estacional Semidecidual. *Ciênc. Florest.* [Internet]. 3º de abril de 2023 [citado 12º de setembro de 2023];33(1): e 67579. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/67579>

MARTÍN, G.; CARMONA, O. Prevención de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. Aspectos farmacológicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, v.23, n. 1, p. 55-59, 2003. ISSN 1315-2556

MARTINS JS, CORDEIRO NB DE O, PEREIRA EA, CORREIA JR, BARBOSA JC DOS S, SOUZA JTL DE. Avaliação da incidência das infecções hospitalares bacterianas em hospital do sudoeste Baiano no período de fevereiro a dezembro de 2018. *REAMed* [Internet]. 23jan.2023 [citado 12set.2023];23(1):e11050. Available from: <https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/view/11050>

MATO, R. *et al.* Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microb Drug Resist.*, v. 4, p. 107-12, 1998. <https://doi.org/10.1089/mdr.1998.4.107>

MAYON-WHITE, R. T. *et al.* Na. International Survey of the Prevalence of Hospital Infection. *J.Hosp.Infect.*, v. 11 (Sup.A), p. 43-48, 1988. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(88\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0195-6701(88)90164-8)

MENEZES, J. S. *et al.* Análise microbiológica de formigas capturadas em ambiente hospitalar da cidade de alfenas/MG . **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 13, n. 1, p. 589-598, 2015. ISSN1517-0276.

MOREL, M. M. A.; BERTUSSI FILHO, L. A. Resíduos de serviços de saúde. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M B; ALVES FILHO, M. B.; GRINGBAUM, R. S.; RICHTMANN, R. **Infecções Hospitalares: prevenção e controle**, São Paulo: Sarvier, 1997. p. 519-534.

NUNES, S. S.; SOARES, F.M. P.; REIS, J. S. Formigas como vetores de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público do interior do Amazonas. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. v. 13, p. 26–29. 2018. ISSN 1980-0002

OLIVEIRA, B. R. M. *et al.* Ants as Vectors of Bacteria in Hospital Environments. **Journal of Microbiology Research**. v. 7, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20170701.01>

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Infecção hospitalar , 2000, 3 p.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. 1. ed.São Paulo: Manole, 1991, 359p.

PASTEELS, J. *et al.* Self-organization mechanisms in ant societies (I): trail recruitment to newly discovered food sources. *Experientia Suppl.*, v. 54, p. 155-175, 1987. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82573537>

PAULINO CÓRDOVA, M. R. **Formigas no ambiente hospitalar: espécies prevalentes e bactérias carregadas**. (2021). TCC (graduacao) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Biologia. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/223985>

PELLI, A., TEIXEIRA , M.M., REIS, M.G. Ocorrência de formigas em área peri-hospitalar de Uberaba/Brasil. *SaBios-Revista De Saúde E Biologia*, 8(1), 2013. <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/1300>

PEREIRA, M. P.; MORIYA, T. M. **Infecção hospitalar estrutura básica de vigilância e controle**. 1 ed. Goiânia: AB, 1994. 193p.

RANDO, J. S. S. Caracterização da Mirmecofauna em Estabelecimentos Ligados à Área da Saúde no Município de Bandeirantes. **Arq. Inst. Biol.** v.76, p.665-671, 2009. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p6652009>

ROBINSON, W. H. **Urban Entomology - Insect and mite pests in the human environment**. New York: Taylor Francis. 2020. 448 p. ISBN 0 412 60750 6

RODRIGUES DA SILVA AC. *et al.* Estratégias de Prevenção Integradas para Reduzir a Incidência de Infecções Associadas ao trato Urinário e Infecções na Corrente Sanguínea em Ambientes Hospitalares. *Braz. J. Implantol. Health Sci.* [Internet]. 13º de agosto de 2023 [citado 12º de setembro de 2023];5(4):482-91. Disponível em <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/410>

SANCHEZ, M. *et al.* Transferência de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* e outras espécies de enterobactérias. *Rer Méd Chile*, v. 134, p. 415-420, 2006. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000400002>

SAWICKA, B. Insect vector diseases in hospitals. *Przeg. Epid.*, v. 47, n. 4, p.451 – 7, 1993. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8171208/>

SAX H.; PITTET, D. Interhospital differences in nosocomial infection rates: importance of case-mixadjustment. *Arch Intern Med*, v. 162, p. 2437-42, 2002. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.21.2437>.

SCHÜLER, L. Controle de Pragas nos Serviços de Alimentação. In: Silva Jr, E A. **Manual de Controle Higiênico Sanitário em Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 1999. p. 93-102.

SHOREY, H. H. Behavioral responses to insect pheromones. *Annals Review of Entomology*, v. 18, p. 349-380, 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.18.010173.002025>

SILVESTRE, R. Estruturas de comunidades de formigas do cerrado. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto: Faculdade de filosofia ciências e letras de Ribeirão Preto-USP, 2000.

SRAMOVA, H. et al. Bacterial contamination of arthropods in health institutions. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol*, v. 41, n. 4, p. 223 - 32, 1992. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1394473/>

SUAREZ, A. V. *et al.* Prey selection in horned lizards following the invasion of Argentine ants in southern California. *Ecological Applications*, v. 10,p. 711- 725, 2000. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0711:PSIHLF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0711:PSIHLF]2.0.CO;2)

TEIXEIRA, Maxelle Martins et al. Formigas como carreadoras de microrganismos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Tese de Mestrado. Uberaba MG, 2007.

ULLOA, P. C. Hormigas Urbanas. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá: Instituto de Investigacion de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003. p 351-359.

VILLAS BOAS, J. F; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Rev Saúde Pública*, v. 3, p. 372 - 8, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000300006>

ZANON, U. Reflexão sobre os riscos infecção do lixo hospitalar. *Rev. Adm. Saúde*, v. 14, n. 2, p. 61-5, 1990. ISSN 2526-3528.

ZARZUELA, M. F. M. *et al.* Distribuição de formigas urbanas em um hospital da região sudeste do Brasil. *Arq. Inst. Biol*, v. 69, n. 1, p. 85-87, 2002. ISSN 1808-1657.

ZARZUELA, M. F. M. *et al.* Avaliação do potencial das formigas como vetores de bactérias em ambientes residenciais e cozinhas semi-industriais. *Arq. Inst. Biol.*, v. 69 (supl), p. 1-306, 2002. ISSN 1808-1657.

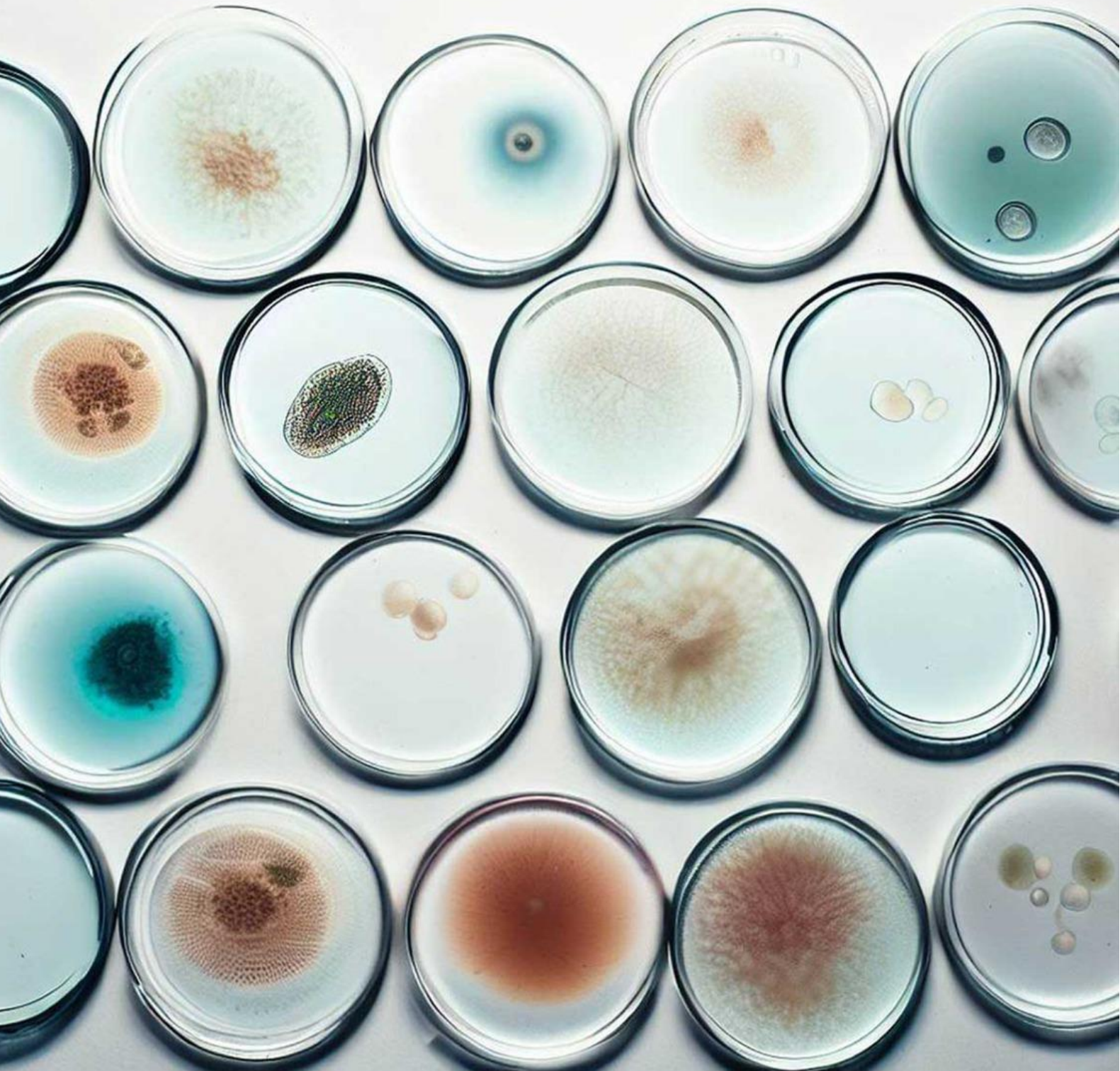
## **Autores**

Maxelle Martins Teixeira, Afonso Pelli, Maria das Graças Reis\*

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, código postal 38025-015, Uberaba – MG, Brasil.

\* Autor para correspondência: [mg.reis@uftm.edu.br](mailto:mg.reis@uftm.edu.br)





[www.meridapublishers.com](http://www.meridapublishers.com)