

## Artigo de revisão

# Esporos e impacto clínico de *Clostridium botulinum*: uma revisão integrativa

*Spores and clinical impact of Clostridium botulinum: an integrative review*

Alessandra Gomes Chagas Oliveira<sup>1</sup>, Beatriz do Carmo Dias<sup>2</sup>, Douglas Terra Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Discente do curso de Licenciatura em Biologia pelo Consórcio CEDERJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup> Pesquisadora de Pós-Doutorado, Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Discente de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Bioinformática, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil.

**Autor correspondente:** Douglas Terra Machado

**Contato:** dougterra@gmail.com

## RESUMO

### Palavras-chave:

*Clostridium botulinum*.  
Eспорos Bacterianos.  
Segurança Alimentar.  
Toxinas Botulínicas.

### Keywords:

Bacterial Spores.  
*Botulinum Toxins*.  
*Clostridium botulinum*.  
Food Safety.

Recebido em:

18/07/2025

Aprovado em:

23/10/2025

Publicado em:

31/12/2025

## ABSTRACT

*Clostridium botulinum* é um patógeno de relevância para a saúde pública devido à sua capacidade de produzir neurotoxinas potentes e formar esporos altamente resistentes. Este estudo consiste em uma revisão integrativa das estratégias para a inativação de esporos, identificação e controle de *C. botulinum* em alimentos, com base na análise de 11 artigos publicados entre 2022 e 2024. Foram abordados métodos como irradiação UV-C, dióxido de carbono supercrítico, qPCR e o desenvolvimento de cepas substitutas não tóxicas. A radiação UV-C mostrou-se eficaz na inativação de esporos, porém com limitações em alimentos líquidos. Técnicas moleculares, como a qPCR direcionada ao gene 16S rRNA, demonstraram alta sensibilidade na detecção de *C. botulinum* em diferentes matrizes alimentares. Além disso, cepas substitutas não tóxicas facilitaram a realização de testes sem riscos à saúde. O impacto clínico do botulismo foi evidenciado em surtos relacionados a alimentos contaminados, reforçando a necessidade de métodos eficazes de controle. Conclui-se que a integração de técnicas físicas, moleculares e genéticas, aliada a boas práticas de higiene, é fundamental para garantir a segurança alimentar e prevenir surtos de botulismo.



Esta obra está licenciada sob uma Licença Creative Commons. Os usuários têm permissão para copiar redistribuir os trabalhos por qualquer meio ou formato, e também para, tendo como base seu conteúdo, reutilizar, transformar ou criar, com, propósitos legais, até comerciais, desde que citada a fonte.

## INTRODUÇÃO

A espécie bacteriana *Clostridium botulinum* apresenta relevante importância para a saúde pública e para a segurança alimentar, devido à sua capacidade de produzir neurotoxinas potentes, responsáveis pelo botulismo, uma doença neuroparalítica grave e potencialmente fatal<sup>1</sup>. A formação de esporos altamente resistentes por *C. botulinum* representa um desafio significativo para a indústria alimentícia, uma vez que esses esporos podem sobreviver a processos de conservação e germinar em condições favoráveis, permitindo que a bactéria retorne à sua fase vegetativa, com metabolismo ativo, e produza toxinas<sup>2</sup>. O botulismo está frequentemente associado ao consumo de alimentos contaminados, especialmente aqueles conservados de forma inadequada, como enlatados, embutidos e produtos refrigerados<sup>3,4</sup>.

Clinicamente, o botulismo caracteriza-se por um quadro de paralisia flácida simétrica descendente, que pode evoluir para insuficiência respiratória, sendo considerado uma emergência médica<sup>5</sup>. Os principais tipos clínicos incluem o botulismo alimentar, o botulismo infantil e o botulismo por ferimentos, variando conforme a via de exposição à toxina<sup>5</sup>. O tratamento é baseado na administração precoce de soro antitoxínico e no suporte ventilatório, e o prognóstico depende do diagnóstico rápido e da disponibilidade do antitoxínico. Entretanto, o manejo ainda apresenta desafios, sobretudo devido à inespecificidade dos sintomas iniciais e à limitação de antitoxinas em algumas regiões<sup>5</sup>.

O botulismo ocorre em todo o mundo, com variações na prevalência dos tipos clínicos conforme a região. Nos Estados Unidos, por exemplo, o botulismo infantil é o mais prevalente, representando cerca de 70% dos casos registrados entre 2001 e 2017, período em que também foram observados 326 casos de origem alimentar<sup>6</sup>. Diversos surtos têm sido relatados em diferentes países como, por exemplo, em 2023, na França, um surto associado a sardinhas em

conserva resultou em 15 casos e um óbito<sup>7</sup>; em 2015, nos Estados Unidos, 29 pessoas adoeceram e uma pessoa morreu após o consumo de batatas enlatadas em um evento comunitário<sup>8</sup>; e em 2024, na Arábia Saudita, oito pessoas foram acometidas após o consumo de maionese contaminada<sup>9</sup>. Mais recentemente, um surto incomum ocorreu em 2023 na Alemanha, Suíça, Áustria, França e Turquia, relacionado à aplicação de toxina botulínica em procedimentos estéticos, resultando em 34 casos confirmados<sup>10</sup>.

A morbimortalidade associada ao botulismo é significativa, especialmente quando há atraso no diagnóstico e no tratamento. As principais fontes de contaminação incluem solos contaminados, alimentos em conserva e enlatados que criam um ambiente anaeróbico, além do mel, que representa um risco conhecido para crianças<sup>11</sup>. A prevenção envolve práticas seguras de conservação e manipulação de alimentos, inspeção de embalagens quanto a sinais de deterioração, como estufamento e odor desagradável, e cuidados rigorosos com ferimentos<sup>12</sup>. No Brasil, a vigilância e o controle de surtos de botulismo são conduzidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Saúde, em parceria com secretarias estaduais e municipais, que monitoram as notificações por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Apesar dos avanços nas técnicas de conservação e detecção de patógenos, a complexidade biológica de *C. botulinum*, incluindo sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e a diversidade de suas neurotoxinas, exige abordagens integradas e multidisciplinares para o seu controle eficaz. Assim, a prevenção de surtos de botulismo continua sendo um desafio global, especialmente em regiões com práticas inadequadas de higiene e de conservação de alimentos<sup>13</sup>. Nesse contexto, a revisão de estratégias atualizadas para o controle de *C. botulinum* é essencial, tanto para garantir a segurança dos alimentos quanto para o fortalecimento das ações de proteção à saúde pública.

Diante desse cenário, esta revisão integrativa se propõe a sintetizar as abordagens que têm sido utilizadas para a inativação de esporos, a identificação e o controle de *C. botulinum* na cadeia produtiva de alimentos, sendo justificada pela necessidade de consolidar informações recentes sobre métodos de controle do patógeno e de fornecer subsídios para profissionais da saúde, da indústria alimentícia e para órgãos de vigilância, de modo a prevenir surtos de botulismo e a garantir a segurança alimentar. Para isso, serão analisados estudos recentes que abordam desde aspectos básicos da biologia do microrganismo até métodos que auxiliem na detecção e no controle, oferecendo um panorama sobre o tema e contribuindo para futuras abordagens que possam prevenir surtos de botulismo e garantir a segurança dos alimentos com base em dados previamente publicados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de revisão integrativa da literatura científica, no qual foi utilizado como base de dados o Google Acadêmico. A escolha dessa plataforma ocorreu devido à sua ampla abrangência e ao seu caráter multidisciplinar, contemplando artigos indexados em bases de dados tradicionais, como PubMed, Scopus e Web of Science. Além disso, o Google Acadêmico permite o acesso a diferentes tipos de periódicos nacionais e internacionais, favorecendo uma busca inclusiva e abrangente sobre *Clostridium botulinum* e sua capacidade de esporulação.

A estratégia de busca incluiu os descriptores “*Clostridium botulinum*”, “sporulation”, “botulism” e “toxin”, combinados por meio do operador booleano “AND” para refinar os resultados. Como critérios de inclusão, foram considerados apenas artigos originais publicados entre 2022 e 2024, com data final da busca em 11 de maio de 2024, e que estivessem alinhados aos objetivos deste estudo. Foram excluídos documentos como monografias, teses,

dissertações, livros ou partes de livros, relatos de caso, editoriais e artigos de revisão.

O processo de seleção dos artigos ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, os artigos originais foram separados dos demais tipos de publicação. Em seguida, na segunda etapa, realizou-se uma análise manual dos resumos, sendo selecionados apenas os estudos que abordavam o tema deste trabalho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa inicial de seleção dos artigos, foram identificados 305 documentos na busca. Esses resultados foram categorizados conforme apresentado na **Tabela 1**, destacando-se a predominância de artigos de revisão, seguidos por livros, teses ou dissertações, artigos originais, relatos de caso e editoriais.

**Tabela 1.** Distribuição dos documentos recuperados na pesquisa sobre a relação de *Clostridium botulinum* com a esporulação e a produção de toxinas, realizada no Google Acadêmico entre 2022 e 2024.

TIPO DE DOCUMENTO	QUANTIDADE
Artigos de Revisão	191
Livro	41
Teses ou Dissertações	40
Artigos Originais	27
Relato de Caso	4
Editorial	2
<b>Total</b>	<b>305</b>

Dos 27 artigos originais identificados, procedeu-se à leitura integral, resultando na seleção final de 11 estudos que atendiam aos critérios da abordagem temática deste estudo. Esses estão sintetizados no **Quadro 1**, contendo informações como título, ano de publicação, objetivos e principais resultados. A distribuição temporal dos artigos selecionados mostrou maior representatividade em 2022 (n = 8). Os 16 artigos excluídos não se alinhavam diretamente aos objetivos da revisão.

**Quadro 1:** Informações sobre os 11 artigos originais selecionados na pesquisa sobre *Clostridium botulinum*, esporulação e produção de toxinas, realizada no Google Acadêmico entre 2022 e 2024.

TÍTULO ORIGINAL DO ARTIGO	CITAÇÃO	PAÍS EM QUE O ESTUDO FOI REALIZADO	OBJETIVOS DO ARTIGO	PRINCIPAIS RESULTADOS DO ARTIGO
Bacteriological isolation in the restaurant of Hawler city Kurdistan Region, Iraq	Ahmed <sup>23</sup> (2024)	Iraque	Isolar e identificar bactérias presentes em três diferentes restaurantes iraquianos, a fim de avaliar os possíveis efeitos da contaminação alimentar na saúde humana. Foram coletadas amostras de cardápios, mesas e recipientes.	Foram analisados três restaurantes. No primeiro restaurante houve uma maior contagem de bactérias isoladas em uma mesa e a menor contagem foi encontrada no menu. No segundo restaurante o recipiente tinha o maior número de bactérias, enquanto a mesa tinha o menor número. No terceiro restaurante a mesa tinha o menor número de bactérias encontradas, enquanto o menu tinha o maior número. As descobertas demonstraram que certos Agentes patogênicos, como <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>C. botulinum</i> e <i>Bacillus cereus</i> , estão presentes e podem ser identificados em restaurantes.
Inactivation of Group I And Group II <i>Clostridium botulinum</i> spores by ultraviolet irradiation in water	Assal et al. <sup>14</sup> (2023)	Canadá	Avaliar a possibilidade de uso de luz UV para inativar os esporos de <i>C. botulinum</i> através da sua sensibilidade.	Esporos de <i>C. botulinum</i> indicaram uma resistência moderada à desinfecção por UV-C, necessitando de <55 mJ/cm <sup>2</sup> para atingir 5 log de inativação.
Cellular and population strategies underpinning neurotoxin production and sporulation in <i>Clostridium botulinum</i> type E cultures	Mertaoja et al. <sup>24</sup> (2023)	Finlândia e Portugal	Analizar a relação entre a produção da toxina botulínica (BoNT) e a esporulação em <i>Clostridium botulinum</i> tipo E, investigando sua regulação pelo fator transcripcional Spo0A e a heterogeneidade populacional em culturas bacterianas sob diferentes condições ambientais.	As combinações possíveis de produção de toxina e esporulação testadas em culturas selvagens de <i>C. botulinum</i> tipo E não indicaram uma co-regulação rigorosa tampouco uma independência estrita entre os dois processos metabólicos. Além disso, uma produção de BoNT independente de Spo0A foi observada em uma pequena subpopulação de células da cepa <i>spo0A-null</i> .
Prevalent toxin types of <i>Clostridium botulinum</i> in South Korean cattle farms	Park et al. <sup>16</sup> (2022)	Coreia do Sul	Investigar fazendas de gado em áreas com surtos contínuos na Coreia do Sul para determinar os tipos de toxinas prevalentes.	As toxinas dos tipos B e D de <i>C. botulinum</i> foram altamente prevalentes nas rações e nas fezes de gado em fazendas sul-coreanas em 2012 e 2013 durante surtos de botulismo.

Continuação Quadro 1.

Type C botulism outbreak in free-ranging waterfowl in Goiás	Martins et al. <sup>17</sup> (2022)	Brasil	Descrever um surto de botulismo tipo C em uma população de aves aquáticas de vida livre, incluindo patos ( <i>Cairina moschata</i> ), marrecos ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) e gansos ( <i>Anser cygnoides</i> ), no município de Quirinópolis, Goiás, Brasil.	A toxina botulínica foi identificada em uma das quatro amostras de água coletadas no lago sob estudo e no conteúdo intestinal de um dos marrecos necropsiados. O botulismo do tipo C, transmitido pela água, foi indicado como a causa da mortalidade em aves aquáticas de vida livre no Parque da Liberdade em Quirinópolis, Goiás, Brasil.
Genomic diversity, competition, and toxin production by group I and II <i>Clostridium botulinum</i> strains used in food challenge studies	Bowe et al. <sup>20</sup> (2022)	Estados Unidos da América	Investigar um coquetel de dez cepas de <i>C. botulinum</i> (sete do Grupo I e três do Grupo II) usados para testes de contaminação alimentar.	Alinhamentos de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do genoma inteiro revelaram que esse coquetel de linhagens abrange os principais clados das espécies <i>C. botulinum</i> do Grupo I e II. Embora pareça existir competição de crescimento entre várias das linhagens, o coquetel como um todo resultou em altos níveis de produção de BoNT.
Selection and development of nontoxic nonproteolytic <i>Clostridium botulinum</i> surrogate strains for food challenge testing	Poortmans et al. <sup>21</sup> (2022)	Bélgica e Alemanha	Desenvolver cepas que possam substituir as cepas do grupo não proteolítico, também conhecido como grupo II. Visando que essas cepas substitutas sejam não tóxicas.	Foi realizada uma análise fenotípica e genômica de 31 cepas de <i>C. botulinum</i> (não tóxicas e não proteolíticas) que revelou três diferentes linhagens, as do tipo E e BEF (não proteolíticas tóxicas), e um agrupamento distinto pouco caracterizado. Outra análise feita foi determinar se essas cepas conseguem crescer em diferentes ambientes, como ambiente salgado, ambiente ácido e ambiente com baixa temperatura, e observar a resistência dos esporos ao calor. O estudo mostrou que o crescimento das cepas e resistência dos esporos caem na mesma faixa descrita que das cepas não proteolíticas tóxicas.
Extensive growth and growth boundary model for non-proteolytic <i>Clostridium botulinum</i> – evaluation and validation with MAP and smoked foods	Koukou, Dahl Devitt e Dalgaard <sup>22</sup> (2022)	Dinamarca	Avaliar e validar um modelo matemático recentemente desenvolvido para prever o crescimento de <i>C. botulinum</i> não proteolítico e o TTT (time-to-toxin formation), isto é, o tempo	Um modelo de crescimento e limite de crescimento existente para <i>C. botulinum</i> não proteolítico foi validado com sucesso para frutos do mar e produtos de aves, independentemente da embalagem em ar, vácuo ou da MAP.

Continuação Quadro 1.

			que um alimento leva para desenvolver a toxina botulínica em produtos defumados e alimentos armazenados em embalagens de ar, vácuo ou atmosfera modificada (MAP).	
Inactivation of <i>Clostridium</i> spores in honey with super-critical CO <sub>2</sub> and in combination with essential oils	Dacal-Gutiérrez et al. <sup>15</sup> (2022)	Colômbia e Espanha	Explorar a eficácia do CO <sub>2</sub> supercrítico (scCO <sub>2</sub> ) sozinho e combinado com óleos essenciais de limão, cravo e canela na inativação de <i>Clostridium sporogenes</i> (CECT 553) como um substituto de <i>C. botulinum</i> .	Foi observado que o scCO <sub>2</sub> aplicado ao mel não conseguiu inativar os esporos de <i>Clostridium</i> em temperaturas abaixo de 70°C, o que leva a pensar que seja por causa do efeito protetor do mel. Quando scCO <sub>2</sub> é combinado com óleo essencial de canela (<0,4% em massa), foi observada uma melhora na inativação dos esporos, com redução de 1,3 log <sub>10</sub> de unidades formadoras de colônia g <sup>-1</sup> (UFC) alcançada na temperatura de 60 °C.
Sporulation strategies and potential role of the exospore in survival and persistence of <i>Clostridium botulinum</i>	Portinha et al. <sup>18</sup> (2022)	Finlândia	Analizar a diversidade da esporulação de 10 cepas de <i>C. botulinum</i> Grupo I, II ou III observando especificamente (i) a dinâmica na estrutura populacional em culturas esporuladas e (ii) a ultraestrutura e (iii) as propriedades funcionais de esporos individuais.	Os resultados mostraram dois padrões dinâmicos populacionais distintos na esporulação, que podem estar relacionados às propriedades proteolíticas das cepas de diferentes Grupos. Onde cepas do Grupo I apresentaram maiores proporções de células esporuladas, mas demoraram mais para liberar esporos, resultando em contagens maiores de esporos do que as cepas dos Grupos II e III. Os autores também observaram que as cepas com a menor resistência ao calor dentro de seu respectivo grupo não tinham um exósporo ou tinham um mais fino em comparação com suas linhagens filogeneticamente relacionadas, sugerindo um possível papel do exósporo na resistência ao calor.
Membrane vesicles derived from <i>Clostridium botulinum</i> and related clostridial species induce innate	Kobayashi et al. <sup>19</sup> (2022)	Japão	Estudar o papel das vesículas de membrana bacteriana (VMs) produzidas por <i>C. botulinum</i> e espécies	As VMs derivadas de todas as cepas induziram a expressão de citocina inflamatória em linhagens de células epiteliais e de ma-

## Continuação Quadro 1.

immune responses via Myd88/Trif signaling <i>in vitro</i>			filogeneticamente relacionadas pertencentes a <i>C. sporogenes</i> e <i>C. scindens</i> na imunidade e patologia do hospedeiro em infecções clostridiais.	crófagos intestinais através da sinalização Myd88/Trif, revelando a influência de VMs na indução da resposta imune inata do hospedeiro
---	--	--	---	--

*A inativação de esporos de Clostridium botulinum*

Dos 11 artigos selecionados, três abordaram métodos para a inativação dos esporos de *C. botulinum*. Assal et al.<sup>14</sup> (2023) investigaram o uso de radiação ultravioleta (UV-C), demonstrando que os esporos do Grupo II (tipos B, E e F) foram mais resistentes do que os do Grupo I (tipos A, B e F). Para atingir uma redução de 5 log na população de esporos, foram necessárias doses de UV-C inferiores a 55 mJ/cm<sup>2</sup>. No entanto, a aglomeração de esporos reduziu a eficácia do método, sugerindo a necessidade de técnicas complementares para desagregar esporos em situações específicas. O estudo destacou que a UV-C pode ser aplicada em alimentos, mas que são necessários mais experimentos em matrizes alimentares líquidas.

O estudo de Mertaoja et al.<sup>24</sup> (2023) investigou o comportamento de *C. botulinum* tipo E em duas temperaturas distintas (10 °C e 30 °C), utilizando microscopia de fluorescência para monitorar as fases de crescimento, produção de toxinas e esporulação, além da técnica ELISA para quantificar a produção de toxinas. Os resultados revelaram que a temperatura influencia significativamente a dinâmica celular e a formação de esporos. Sob a temperatura de 30 °C, a produção de toxinas e a esporulação ocorreram de forma acelerada; entretanto, as células sofreram lise precoce, limitando a viabilidade do microrganismo a longo prazo. Por outro lado, a 10 °C, observou-se um equilíbrio mais estável entre a produção de toxinas e a esporulação, com ambos os processos ocorrendo de forma gradual ao longo de semanas.

Esse comportamento sugere que *C. botulinum* tipo E é capaz de se adaptar a ambientes refrigerados, o que representa um desafio significativo para a segurança alimentar, especialmente em produtos armazenados a baixas temperaturas, como frutos do mar. Além disso, o estudo identificou quatro subpopulações celulares com comportamentos distintos: (i) células que produziram toxinas e esporularam; (ii) células que produziram toxinas, mas não esporularam; (iii) células que esporularam, mas não produziram toxinas; e (iv) células que não realizaram nenhum dos dois processos. A proporção dessas subpopulações foi influenciada pela temperatura e pela fase de crescimento, destacando a heterogeneidade da resposta celular a diferentes condições ambientais.

Outro resultado relevante deste estudo relacionou-se ao papel do gene *spo0A*, uma vez que os autores discutem que esse gene pode controlar tanto a esporulação quanto a produção de toxinas, sugerindo que a regulação genética seja um alvo promissor para estratégias de inativação de esporos. Esses resultados reforçam a complexidade da inativação de esporos de *C. botulinum* e a necessidade de abordagens multifatoriais que considerem não apenas as condições ambientais, mas também os mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos na sobrevivência e na virulência do microrganismo.

Dacal-Gutiérrez et al.<sup>15</sup> (2022) testaram o dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) para inativar esporos de *C. sporogenes* (substituto de *C. botulinum* neste estudo, devido às semelhanças morfológicas e genéticas) em água e

mel. Em água, a inativação foi eficaz, abrangendo 99,7% dos esporos inativados a 80 °C; entretanto, no mel, a eficácia foi menor, devido às suas propriedades físico-químicas. A adição de óleos essenciais contribuiu para a inativação de 94% dos esporos a 60 °C. Os testes de inativação por scCO<sub>2</sub> foram realizados a uma pressão de 10 MPa, e o aumento da pressão para 30 MPa também foi testado, mas não apresentou resultados significativos; assim, concluiu-se que o uso da menor pressão é mais seguro e economicamente mais viável. O estudo concluiu que o uso de scCO<sub>2</sub> é viável, mas que devem ser considerados o custo-benefício e o impacto na qualidade do alimento.

#### *Contaminação de restaurantes por *Clostridium botulinum**

Somente um artigo abordou a contaminação em restaurantes. O estudo de Ahmed<sup>23</sup> (2024) investigou a presença de microrganismos em três restaurantes localizados na cidade de Arbil, no Curdistão, Iraque. Foram coletadas amostras de mesas, cardápios e recipientes (como saleiros), que foram semeadas em ágar nutritivo e incubadas a 37 °C. Após o crescimento das colônias, realizou-se a coloração de Gram para diferenciar as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas. Posteriormente, as bactérias Gram-positivas foram semeadas em ágar sangue, enquanto as Gram-negativas foram semeadas em ágar MacConkey.

A identificação das bactérias foi feita com base em características das colônias, como cor, forma, altura e diâmetro. Os resultados revelaram contagens variáveis de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos três restaurantes. No primeiro restaurante, a maior contaminação foi encontrada em uma mesa (298 UFC), enquanto a menor ocorreu no cardápio (220 UFC). No segundo restaurante, o recipiente apresentou a maior contaminação (280 UFC), e a mesa, a menor (220 UFC). No terceiro restaurante, o cardápio apresentou a maior contaminação (80 UFC), e a mesa, a menor (52 UFC). Entre as bac-

térias identificadas, destacaram-se *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*, microrganismos associados a alimentos conservados. O estudo evidenciou que cardápios e recipientes foram os locais com maior contaminação, sugerindo falhas na higienização frequente e adequada.

#### *Neurotoxinas de *Clostridium botulinum* em animais*

Somente dois artigos abordaram as neurotoxinas produzidas por *C. botulinum* e seus impactos em animais. O estudo de Park et al.<sup>16</sup> (2022) investigou surtos de botulismo em fazendas de gado na Coreia do Sul, com a coleta de 184 amostras de fezes, feno, silagem, solo, bebedouros e conteúdo estomacal de bovinos. Utilizando PCR multiplex, os autores identificaram que 33 amostras foram positivas para *C. botulinum*, com prevalência de 33,3% (n = 11) para o tipo B, 12,1% (n = 4) para o tipo C/D e 54,5% (n = 18) para o tipo D. A maior parte das amostras positivas foi encontrada em fezes (17/72) e em conteúdo estomacal (11/15), enquanto nenhuma amostra de solo apresentou detecção de neurotoxinas. O estudo destacou que as neurotoxinas dos tipos B e D foram as mais prevalentes durante os surtos de 2012 e 2013 na Coreia do Sul.

Por outro lado, o estudo de Martins et al.<sup>17</sup> (2022) descreveu um surto de botulismo do tipo C em aves aquáticas no Parque da Liberdade, em Quirinópolis, Goiás, Brasil. Foram coletadas amostras de água, ração, fígado, conteúdo estomacal e intestinal de aves mortas. A toxina botulínica do tipo C foi detectada em uma amostra de água e no conteúdo intestinal de um marreco, com confirmação por bioensaio em camundongos e PCR. Os camundongos inoculados com amostras não tratadas termicamente apresentaram sinais de botulismo e morreram entre 12 e 24 horas, enquanto aqueles inoculados com amostras tratadas termicamente não apresentaram sintomas. A ração não estava contaminada, sugerindo que a água do lago foi a principal fonte de contaminação.

*Estruturas-chave da esporulação e da síntese de neurotoxinas por Clostridium botulinum*

Três artigos estão relacionados à esporulação, à produção de neurotoxinas e à patogenicidade de *C. botulinum*. O estudo de Portinha et al.<sup>18</sup> (2022) investigou a diversidade da esporulação em dez cepas de *C. botulinum* dos Grupos I, II e III. Os resultados mostraram que as cepas do Grupo I (proteolíticas) apresentaram maior proporção de células esporuladas e maior contagem de esporos, embora tenham demorado mais para liberá-los; ou seja, apresentaram contagens de esporos superiores às das cepas dos Grupos II e III (não proteolíticas). Todas as cepas compreenderam estágios morfológicos de esporulação semelhantes. Outrossim, foram identificados quatro morfotipos de esporos, com diferenças entre os grupos, mas sem impacto significativo na hidrofobicidade ou na autoagregação dos esporos. O estudo também destacou que a presença do exosporium aumentou a resistência dos esporos ao calor.

O estudo de Mertaoja et al.<sup>24</sup> (2023), citado anteriormente, analisou o papel do gene *spo0A* na esporulação e na produção da toxina botulínica (BoNT) em *C. botulinum* tipo E. Os resultados mostraram que a produção de BoNT ocorreu em subpopulações celulares, sendo liberada por autólise mediada por *spo0A* ou após a liberação de esporos maduros. No entanto, a produção de BoNT também foi observada em células sem o gene *spo0A*, indicando que outros genes podem estar envolvidos nesse processo. A heterogeneidade das culturas foi influenciada por condições ambientais, como a temperatura, sugerindo que fatores externos também desempenham papel na regulação da produção de toxinas.

O estudo de Kobayashi et al.<sup>19</sup> (2022) investigou o papel das vesículas de membrana (VMs) secretadas por *C. botulinum* na indução de respostas imunes inatas. Os resultados mostraram que as VMs derivadas de *C. botulinum* induziram a expressão de citocinas inflamatórias em células epiteliais e em macrófagos in-

testinais. Além disso, as VMs de *C. botulinum* tipo E ativaram a expressão de peptídeos antimicrobianos da família Reg3, como Reg3g e Reg3b, por meio da sinalização MyD88/TRIF. Esses achados sugerem que as VMs desempenham um papel importante na ativação do sistema imunológico contra infecções por *C. botulinum*.

*Métodos para identificação de contaminação alimentar por Clostridium botulinum nas indústrias alimentícias*

Três artigos abordaram métodos para avaliar a contaminação alimentar por *C. botulinum* na indústria alimentícia. O estudo de Bowe et al.<sup>20</sup> (2022) investigou um coquetel de dez cepas de *C. botulinum* (sete do Grupo I e três do Grupo II), utilizado há mais de 20 anos em estudos de desafio alimentar. As cepas foram cultivadas em meios específicos e tiveram seu material genético sequenciado, com posteriores análises bioinformáticas visando à identificação dos genes relacionados à produção de toxinas. Os resultados mostraram que, apesar da competição entre cepas, o coquetel produziu toxinas botulínicas (BoNT) dos tipos A, B e E, representando os principais clados de *C. botulinum* envolvidos em intoxicações alimentares.

Poortmans et al.<sup>21</sup> (2022) desenvolveram cepas substitutas não tóxicas de *C. botulinum* do Grupo II, que possuem características fenotípicas e genotípicas semelhantes às cepas tóxicas. Foram analisadas 31 cepas não tóxicas, identificando-se três agrupamentos genômicos, incluindo um novo grupo ainda não caracterizado. Os autores relataram que, além da presença de um agrupamento de genes da toxina BoNT, as cepas não tóxicas e as cepas tóxicas não proteolíticas do Grupo II de *C. botulinum* são geneticamente e fenotipicamente indistintíveis, evidenciando que essa substituição pode ser eficiente para utilização em estudos que envolvam contaminação alimentar. Assim, cinco cepas selecionadas receberam um marcador de resistência à eritromicina e foram testadas em

um meio seletivo que suprime a microbiota de fundo, permitindo a recuperação quantitativa das cepas substitutas. Esse método facilita a realização de testes de desafio alimentar sem o risco associado ao uso de cepas tóxicas.

Koukou, Dahl Devitt e Dalgaard<sup>22</sup> (2022) validaram um método de qPCR para a detecção de *C. botulinum* com foco no gene 16S rRNA, que não está associado à produção de toxinas. O método foi validado para uso em frutos do mar e aves, independentemente do tipo de embalagem (ar, vácuo ou atmosfera modificada – MAP). A técnica mostrou-se eficaz na detecção de cepas proteolíticas e não proteolíticas, mesmo na presença de outros microrganismos, configurando-se como uma ferramenta promissora para a indústria alimentícia.

Neste trabalho, foram revisados estudos recentes que abordam os desafios e os avanços no controle, na detecção e na inativação de *Clostridium botulinum*, um patógeno de relevante importância para a segurança alimentar, devido à sua capacidade de produzir neurotoxinas potentes e de formar esporos altamente resistentes a condições ambientais adversas. Os três estudos revisados que envolvem a inativação de esporos de *C. botulinum* destacam a elevada resistência desses esporos e os desafios associados à sua inativação em alimentos.

A radiação UV-C mostrou-se promissora; entretanto, sua eficácia é limitada pela aglomeração de esporos, o que sugere a necessidade de métodos complementares para otimizar sua aplicação. A influência da temperatura na esporulação e na produção de toxinas, conforme observado por Mertaoja et al.<sup>24</sup> (2023), reforça a importância de se considerarem condições ambientais variáveis no desenvolvimento de métodos de inativação. Além disso, o uso de scCO<sub>2</sub>, embora eficaz em água, apresentou limitações em matrizes complexas, como o mel, indicando que a escolha do método deve considerar as propriedades físico-químicas do alimento. Esses resultados evidenciam a necessidade de mais pesquisas para adaptar e

otimizar técnicas de inativação de esporos, garantindo a segurança alimentar sem comprometer a qualidade dos produtos.

O estudo de Ahmed<sup>23</sup> (2024) destaca a presença de *C. botulinum* em ambientes de restaurantes, reforçando a importância de práticas rigorosas de higiene para prevenir a contaminação de alimentos. A contaminação predominantemente observada em cardápios e recipientes, como saleiros, sugere que esses itens são frequentemente negligenciados durante os procedimentos de limpeza, tornando-se potenciais fontes de contaminação cruzada. Além disso, a identificação de *Bacillus cereus*, outro microrganismo associado a doenças transmitidas por alimentos, reforça a necessidade de monitoramento constante e de higienização adequada em estabelecimentos comerciais. Esses resultados evidenciam que a contaminação em restaurantes não está restrita apenas às superfícies de preparo de alimentos, mas também a itens de uso frequente pelos clientes, como cardápios e recipientes. Portanto, é essencial implementar protocolos de limpeza mais abrangentes e capacitar os funcionários quanto à importância da higiene em todas as áreas do estabelecimento. Ademais, estudos futuros poderiam investigar a eficácia de diferentes métodos de desinfecção nesses ambientes, visando reduzir a carga microbiana e garantir a segurança alimentar.

Os estudos de Park et al.<sup>16</sup> (2022) e de Martins et al.<sup>17</sup> (2022) destacam a importância das neurotoxinas de *C. botulinum* como agentes causadores de botulismo em animais. O primeiro estudo revelou que os tipos B e D são os mais prevalentes em surtos de botulismo bovino na Coreia do Sul, com contaminação associada a fezes, feno, silagem e conteúdo estomacal. Esses resultados sugerem que a contaminação de alimentos e de água constitui um fator crítico na disseminação da doença, reforçando a necessidade de práticas rigorosas de manejo e de higiene em fazendas. A ausência de detecção de neurotoxinas no solo pode indicar que esse não

seja um reservatório significativo para *C. botulinum* nesses surtos; contudo, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

O segundo estudo evidenciou que a água contaminada foi a principal fonte de botulismo do tipo C em aves aquáticas no Brasil, destacando o papel de ambientes aquáticos como reservatórios da toxina. A detecção da toxina do tipo C em amostras de água e de conteúdo intestinal, associada à ausência de contaminação na ração, sugere que a exposição do solo orgânico durante a drenagem do lago pode ter facilitado a proliferação de *C. botulinum*. Esse surto ressalta a importância do monitoramento de ambientes aquáticos, especialmente em áreas onde aves e outros animais têm acesso direto à água. Ambos os estudos utilizaram técnicas de PCR para identificar os tipos de neurotoxinas, demonstrando a eficácia dessa metodologia na detecção e na caracterização de *C. botulinum*. Esses resultados reforçam a necessidade de estratégias de prevenção e de controle que considerem não apenas a contaminação de alimentos, mas também a qualidade da água e as condições ambientais que favorecem a proliferação do microrganismo. Além disso, os achados destacam a importância de investigar surtos de botulismo em animais, uma vez que esses eventos podem fornecer subsídios relevantes para a prevenção de casos humanos e para a proteção da saúde pública.

Os três estudos revisados sobre estruturas-chave da esporulação e da síntese de neurotoxinas por *C. botulinum* destacam a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na esporulação, na produção de toxinas e na patogenicidade dessa bactéria. O trabalho de Portinha et al.<sup>18</sup> (2022) revelou que a esporulação varia significativamente entre os grupos de *C. botulinum*, com as cepas proteolíticas (Grupo I) apresentando maior eficiência na formação de esporos. A constatação de que o exosporium contribui para a resistência térmica dos esporos sugere que essa estrutura pode constituir um alvo potencial para estra-

tégias de inativação de esporos em alimentos e em ambientes contaminados.

O estudo de Mertaoja et al.<sup>24</sup> (2023) demonstrou que o gene *spoOA* desempenha um papel importante, porém não exclusivo, na produção de toxinas e na esporulação. A observação de que células sem *spoOA* ainda são capazes de produzir BoNT possibilita o desenvolvimento de novas perspectivas para a identificação de outros genes e vias regulatórias envolvidas nesse processo. Esses resultados ressaltam a necessidade de mais pesquisas para compreender a rede genética que controla a virulência de *C. botulinum*, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de controle.

O estudo de Kobayashi et al.<sup>19</sup> (2022) destacou o papel das vesículas de membrana (VMs) na ativação de respostas imunes inatas. A capacidade das VMs de induzir a expressão de citocinas inflamatórias e de peptídeos antimicrobianos sugere que essas estruturas podem constituir alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas ou de terapias que modulam a resposta imune contra infecções por *C. botulinum*. Além disso, a compreensão dos mecanismos de sinalização MyD88/TRIF pode fornecer novos caminhos para o tratamento de doenças associadas a toxinas clostridiais. Em conjunto, esses estudos avançam no entendimento das moléculas-alvo envolvidas na biologia de *C. botulinum*, oferecendo bases para futuras pesquisas e aplicações práticas na prevenção e no controle do botulismo.

Os estudos revisados sobre as implicações dos métodos de detecção de *C. botulinum* na indústria alimentícia destacam avanços significativos no desenvolvimento e na validação de métodos para a detecção dessa bactéria em alimentos, com implicações relevantes para a segurança alimentar. O trabalho de Bowe et al.<sup>20</sup> (2022) reforça a utilidade de coquetéis de cepas de *C. botulinum* em estudos de desafio alimentar, permitindo a avaliação da produção de toxinas em condições

controladas. A competição entre cepas observada no estudo não comprometeu a produção de toxinas, indicando que o coquetel constitui uma ferramenta confiável para simular contaminações reais em alimentos.

O estudo de Poortmans et al.<sup>21</sup> (2022) introduziu uma abordagem inovadora ao desenvolver cepas substitutas não tóxicas de *Clostridium botulinum* Grupo II, que mantêm características fenotípicas e genotípicas semelhantes às cepas patogênicas. A inserção de um marcador de resistência à eritromicina, aliada ao desenvolvimento de um meio seletivo, facilita a quantificação dessas cepas em testes de desafio alimentar, reduzindo os riscos associados ao manuseio de cepas toxigênicas. Esse método pode tornar os testes de segurança alimentar mais acessíveis e seguros para a indústria.

Por fim, o estudo de Koukou et al.<sup>22</sup> (2022) validou um método de qPCR baseado no marcador molecular 16S rRNA, que permite a detecção de *C. botulinum* independentemente da produção de toxinas. A técnica mostrou-se robusta para diferentes tipos de embalagem e matrizes alimentares, como frutos do mar e aves, além de eficaz na presença de outros microrganismos. Esse método representa uma alternativa rápida e confiável para o monitoramento da contaminação por *C. botulinum* ao longo da cadeia produtiva de alimentos.

Em conjunto, esses estudos oferecem ferramentas valiosas para a indústria alimentícia, contribuindo para a prevenção de surtos de botulismo e para a garantia da segurança dos alimentos. A combinação de coquetéis de cepas, cepas substitutas não tóxicas e métodos moleculares, como a qPCR, pode otimizar os processos de detecção e controle de *C. botulinum*, reduzindo riscos à saúde pública e promovendo a inovação no setor alimentício.

Em síntese, os estudos revisados evidenciam a complexidade da biologia de *Clostridium botulinum* e os desafios associados à sua detecção, inativação e controle em alimentos. A resistência dos esporos, a diversidade das neu-

rotoxinas e a capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais destacam a necessidade de abordagens multifatoriais para garantir a segurança alimentar. Métodos como a radiação UV-C, o uso de dióxido de carbono supercrítico e a identificação de moléculas-alvo, como o gene *spo0A*, oferecem perspectivas promissoras para a inativação de esporos e a redução da produção de toxinas. Além disso, o desenvolvimento de cepas substitutas não tóxicas e de técnicas moleculares avançadas, como a qPCR, representa um avanço significativo para a detecção e o monitoramento de *C. botulinum* na indústria alimentícia.

Essas ferramentas, aliadas a práticas rigorosas de higiene e manejo, são essenciais para prevenir surtos de botulismo e proteger a saúde pública. Futuras pesquisas devem enfatizar a otimização desses métodos, a exploração de novos alvos moleculares e a adaptação das técnicas a diferentes matrizes alimentares, visando garantir a eficácia e a viabilidade de sua aplicação em larga escala. Assim, a integração entre ciência básica, inovação tecnológica e boas práticas de produção pode contribuir para um controle mais eficaz de *C. botulinum* e para a segurança dos alimentos em escala global.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

DTM, BCD e AGCO realizaram a concepção e desenho do estudo, análise dos dados, redação do manuscrito. DTM e AGCO realizaram a coleta de dados, análise estatística, revisão crítica do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito e concordam em se responsabilizar por seu conteúdo.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Desejamos confirmar que não há conflitos de interesse conhecidos associados a esta publicação e que não houve apoio financeiro significativo para este trabalho que pudesse ter influenciado seus resultados.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento da bolsa de Doutorado a DTM (número do processo: 177392/2024-0). DTM foi aluno de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## DECLARAÇÃO QUANTO AO USO DE IA GENERATIVA

Os autores declaram que utilizaram ferramentas de inteligência artificial generativa (ChatGPT) para auxiliar na revisão linguística. No entanto, todas as análises, interpretações e conclusões apresentadas são de exclusiva responsabilidade dos autores. A IA não foi utilizada para a geração de dados científicos, redação de seções críticas do manuscrito ou tomada de decisões metodológicas.

## REFERÊNCIAS

1. Kanaan MHG, Tarek AM. Clostridium botulinum, a foodborne pathogen and its impact on public health. *Ann Trop Med Public Health.* 2020;23(5):49–62. Disponível em: [https://www.journal.atmph-specialissues.org/uploads/179/7404\\_pdf.pdf](https://www.journal.atmph-specialissues.org/uploads/179/7404_pdf.pdf)
2. Dahlsten E, Lindström M, Korkeala H. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in Clostridium botulinum. *Res Microbiol.* 2015;166(4):344–52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.011>
3. Jarosz A, Grenda T, Goldsztejn M, Kozak B, Kwiatek K. Potential risk of botulinum neurotoxin-producing clostridia occurrence in canned fish. *J Vet Res.* 2022;66(4):605–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2478/jveteres-2022-0060>
4. Durmaz H, Yiğin A, Kılıç Altun S, Aydemir ME. Assessing the potential public health risk of Clostridium botulinum toxin genes in canned food: a laboratory experience in Türkiye. *Middle East J Sci.* 2024;10(1):58–69. Disponível em: <http://dergipark.org.tr/en/doi/10.51477/meps.1437831>
5. Lonati D, Schicchi A, Crevani M, Buscaglia E, Scaravaggi G, Maida F, et al. Foodborne botulism: clinical diagnosis and medical treatment. *Toxins (Basel).* 2020;12(8):509. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12080509>
6. Lúquez C, Edwards L, Griffin C, Sobel J. Foodborne botulism outbreaks in the United States, 2001–2017. *Front Microbiol.* 2021;12:713101. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmi-cb.2021.713101>
7. Meurice L, Filleul L, Fischer A, Burbaud A, Delvallez G, Diancourt L, et al. Foodborne botulism outbreak involving different nationalities during the Rugby World Cup: critical role of credit card data and rapid international cooperation, France, September 2023. *Euro Surveill.* 2023;28(47):2300624. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.47.2300624>
8. McCarty CL, Angelo K, Beer KD, Cibulskas-White K, Quinn K, de Fijter S, et al. Large outbreak of botulism associated with a church potluck meal—Ohio, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(29):802–3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6429a6>
9. Horabi M, Zayed D, Al-Tammemi AB. Towards safer practices: a spotlight on foodborne botulism following the recent outbreak in Saudi Arabia in 2024. *New Microbes New Infect.* 2024;62:101534. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/j\\_nmni.2024.101534](http://dx.doi.org/10.1016/j_nmni.2024.101534)
10. Dorner MB, Wilking H, Skiba M, Wilk L, Steinberg M, Worbs S, et al. A large travel-associated outbreak of iatrogenic botulism in four European countries following intragastric botulinum neurotoxin injections for weight reduction, Türkiye, February to March 2023. *Euro Surveill.* 2023;28(23):2300203. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.23.2300203>
11. Harris RA, Dabritz HA. Infant botulism: in search of Clostridium botulinum spores. *Curr Microbiol.* 2024;81(10):306. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-024-03828-0>
12. Cereser ND, Costa FMR, Rossi Júnior OD, Silva DAR, Sperotto VR. Botulismo de origem alimentar. *Ciênc Rural.* 2008;38(1):280–7. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000100049&lng=pt&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000100049&lng=pt&tlang=pt)
13. Taşkin Ö, Akpinar AA. The enemy at the gate: botulism. *Turk J Emerg Med.* 2024;24(3):127–32. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.4103/tjem.tjem\\_80\\_24](http://dx.doi.org/10.4103/tjem.tjem_80_24)
14. Assal N, Boone R, Harris RA, Gabriel M, Sanges M, Petri B, et al. Inactivation of Group I and Group II Clostridium botulinum spores by ultraviolet irradiation in water. *Int J Food Microbiol.* 2023;395:110191. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110191>
15. Dacal-Gutiérrez A, Tirado DF, Calvo L. Inactivation of Clostridium spores in honey with supercritical CO<sub>2</sub> and in combination with essential oils. *Processes (Basel).* 2022;10(11):2232.

- Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/10/11/2232>
- 16. Park HY, Lee K, Jung SC, Cho YS. Prevalent toxin types of Clostridium botulinum in South Korean cattle farms. *Vet Anim Sci.* 2022;15:100239. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vas.2022.100239>
  - 17. Martins AS, Silva TA, Rosa ICCR, Oliveira AGF, Oliveira MP, Saraiva JR, et al. Type C botulism outbreak in free-ranging waterfowl in Goiás. *Pesqui Vet Bras.* 2022;42. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2022000100506&tlang=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2022000100506&tlang=en)
  - 18. Portinha IM, Douillard FP, Korkeala H, Lindström M. Sporulation strategies and potential role of the exosporium in survival and persistence of Clostridium botulinum. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):754. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23020754>
  - 19. Kobayashi N, Abe K, Akagi S, Kitamura M, Shiraishi Y, Yamaguchi A, et al. Membrane vesicles derived from Clostridium botulinum and related clostridial species induce innate immune responses via MyD88/TRIF signaling. *Front Microbiol.* 2022;13:720308. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.720308>
  - 20. Bowe BK, Wentz TG, Gregg BM, Tepp WH, Schill KM, Sharma S, et al. Genomic diversity, competition, and toxin production by Group I and II Clostridium botulinum strains used in food challenge studies. *Microorganisms.* 2022;10(10):1895. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10101895>
  - 21. Poortmans M, Vanoirbeek K, Dorner MB, Michiels CW. Selection and development of non-toxic nonproteolytic Clostridium botulinum surrogate strains for food challenge testing. *Foods.* 2022;11(11):1577. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/foods11111577>
  - 22. Koukou I, Dahl Devitt T, Dalgaard P. Extensive growth and growth boundary model for non-proteolytic Clostridium botulinum – evaluation and validation with MAP and smoked foods. *Food Microbiol.* 2022;102:103931. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2021.103931>
  - 23. Ahmed TA. Bacteriological isolation in the restaurant of Hawler City, Kurdistan Region, Iraq. *Sci Herit J.* 2024;8(2):79–82. Disponível em: <https://jscienceheritage.com/archives/2gws2024/2gws2024-79-82.pdf>
  - 24. Mertaoja A, Mascher G, Nowakowska MB, Korkeala H, Henriques AO, Lindström M. Cellular and population strategies underpinning neurotoxin production and sporulation in type E cultures. *mBio.* 2023;14(6):e0186623. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01866-23>