

Contaminação do Mel por Presença de *Clostridium* *botulinum*



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



Documentos 161

Contaminação do Mel por Presença de *Clostridium botulinum*

*Fábيا de Melo Pereira
Ricardo Costa Rodrigues de Camargo
Maria Teresa do Rêgo Lopes*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5650, Bairro Buenos Aires

Caixa Postal: 01

Fone: (86) 3225-1141

Fax: (86) 3225-1142

Home page: www.cpamn.embrapa.br

E-mail: sac@cpamn.embrapa.br

Presidente: *Hoston Tomás Santos do Nascimento.*

Secretária: *Executiva: Ursula Maria Barros de Araújo*

Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Humberto Umbelino Sousa, Fábio Mendonça Diniz, Flávio Flavaro Blanco, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo e Carlos Antônio Ferreira de Sousa.*

Supervisor editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*

Revisor de texto: *Lígia Maria Rolim Bandeira*

Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*

Editoração eletrônica: *Erlândio Santos de Resende*

Foto da capa: *Fábia de Mello Pereira*

1ª edição

1ª impressão (2007): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio-Norte

Pereira, Fábila de Melo.

Contaminação do mel por presença de *Clostridium botulinum* / Fábila de Melo Pereira, Ricardo Costa Rodrigues de Camargo, Maria Teresa do Rêgo Lopes. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2007.

17 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 161).

1. Alimento. 2. Contaminação bacteriana. 3. Néctar. 4. Pólen. 5. Cera. I. Camargo, Ricardo Costa Rodrigues de. II. Lopes, Maria Teresa do Rêgo. III. Embrapa Meio-Norte. IV. Título. V. Série.

CDD 638.1 (21. ed.)

© Embrapa, 2007

Autores

Fábria de Mello Pereira

Engenheira agrônoma, Doutora em Zootecnia,
Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-
220, Teresina, PI.

fabia@cpamn.embrapa.br

Ricardo Costa Rodrigues de Camargo

Biólogo, Doutor em Produção Animal, Embrapa
Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-220,
Teresina, PI. ricardo@cpamn.embrapa.br

Maria Teresa do Rêgo Lopes

Engenheira agrônoma, Doutora em Entomologia,
Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-
220, Teresina, PI.

mteresa@cpamn.embrapa.br

Apresentação

O botulismo infantil é uma doença que acomete lactentes e é causada pela ingestão de alimentos contaminados com a bactéria *Clostridium botulinum*, produtora da toxina botulínica que afeta o sistema neurológico das crianças. Os registros relacionados aos casos dessa doença indicam o consumo de mel como responsável por aproximadamente um terço dos casos registrados em bebês.

Essa bactéria está amplamente distribuída no meio ambiente, vindo a contaminar o mel por meio do néctar, pólen, cera, da própria abelha e das práticas de manejo adotadas pelo apicultor. Estimativas indicam que até 15% do mel em todo o mundo esteja contaminado com esporos dessa bactéria.

Ciente da importância dessa doença e, principalmente, pelo difundido uso dos produtos apícolas com fins terapêuticos, a Embrapa Meio-Norte reuniu nesta publicação informações gerais relacionadas à presença desse microrganismo nos produtos das abelhas, sua detecção e práticas de manejo que podem ser adotadas pelos apicultores com o objetivo de evitar ou reduzir a contaminação no mel.

Valdemício Ferreira de Sousa
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Sumário

Contaminação do Mel por Presença de <i>Clostridium botulinum</i>	9
Introdução	9
Presença de <i>Clostridium botulinum</i> nos produtos apícolas	11
Técnicas de manejo e a contaminação das colônias com <i>Clostridium botulinum</i>	12
Análises para detecção do <i>Clostridium botulinum</i>	14
Conclusão	14
Referências	15

Contaminação do mel por presença de *Clostridium botulinum*

Fábia de Melo Pereira

Ricardo Costa Rodrigues de Camargo

Maria Teresa do Rego Lopes

Introdução

O botulismo é uma doença toxicológica que afeta o sistema neurológico, tendo como principais implicações ineficiência respiratória, infecção pulmonar e constipação, podendo levar à morte. A contaminação ocorre pela ingestão de alimentos contendo as toxinas produzidas pela bactéria anaeróbica *Clostridium botulinum* (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MUGNOL, 1997). Embora o botulismo seja uma doença de baixa incidência, a letalidade é alta se não for tratada de forma adequada (SILLOS; FAGUNDES NETO, 2004).

Existem sete tipos de *C. botulinum* classificados de acordo com a neurotoxina que produzem (A, B, C, D, E, F, e G). Os seres humanos são afetados pelas neurotoxinas A, B, E e F e a contaminação ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, destacando-se legumes (57 %), pescados (15 %), frutas em conservas, condimentos e mel 8 % (ALMEIDA FILHO et al., 2006; SILLOS; FAGUNDES NETO, 2004).

Esse bacilo está presente no solo, sedimentos lacustres e fluviais e ambiente marinho. No Brasil já foi confirmada a presença de *C. botulinum* no Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (MUGNOL, 1997).

Nos humanos a doença causada pela toxina botulínica pode ocorrer de três formas: botulismo alimentar, botulismo por lesões e botulismo como toxi-infecção, que caracteriza-se pela ingestão do microorganismo, que passa a produzir *in vivo* suas toxinas, afetando, em geral, lactentes (botulismo infantil) e crianças e adultos que estejam com a flora intestinal prejudicada, decorrente de inflamação no cólon, cirurgias recentes ou uso de antibióticos (MUGNOL, 1997).

O botulismo infantil foi reconhecido inicialmente em 1976 e sua incidência vem crescendo desde então. Caracteriza-se por haver não somente a ingestão das toxinas, mas também do *Clostridium botulinum*, que consegue sobreviver ao pH do trato digestivo dos bebês; no intestino, ainda imaturo, com pouco movimento peristáltico e flora bacteriana ainda em formação. Essas duas características permitem que o *Clostridium botulinum* instale-se nas paredes intestinais e se desenvolva rapidamente, sem concorrência (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MUGNOL, 1997).

Apesar de mais de mil casos de botulismo infantil já ter sido relatado em todo o mundo, menos na África, devido à semelhança com outras síndromes, acredita-se que os diagnósticos errôneos encobrem grande parte da ocorrência dessa doença. Cerca de 4,5 % a 15 % das vítimas da “Síndrome da Morte Súbita do Bebê” ou “Morte do Berço” foram posteriormente confirmados como botulismo infantil (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MUGNOL, 1997).

A contaminação dos lactentes ocorre com a ingestão de alimento contaminado com o organismo *in vivo*. Embora tenha sido comprovado a contaminação de bebês que consumiram alimentos industrializados e formulações próprias, um terço dos casos de botulismo infantil ocorridos no mundo tem histórico de ingestão de mel, fazendo com que esse alimento seja contra-indicado para lactentes com menos de 1 ano de idade (ARNON et al., 1979; CENTORBI et al., 1997; KÜPLÜLÜ et al. 2006; MIDURA et al., 1979; MONETTO et al., 1999; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1999).

Devido à crença de que o mel tem propriedades terapêuticas, esse alimento é fornecido para crianças em substituição ao açúcar e mesmo como remédio. Por isso, acredita-se que os casos de botulismo de lactentes decorrentes da contaminação de mel é maior do que o revelado (MUGNOL, 1997).

Presença de *Clostridium botulinum* nos produtos apícolas

Pesquisas realizadas em amostras de abelhas, cera, mel dos favos, mel centrifugado, grãos de pólen e pólen estocado nos favos (pão das abelhas) revelaram a presença de *Clostridium botulinum* em toda a colônia, sendo que a cera de abelha e o mel dos favos são os produtos mais contaminados (NEVAS et al., 2006).

Como o *Clostridium botulinum* está amplamente distribuído no meio ambiente, a contaminação do mel pode ocorrer a partir do néctar e pólen contaminados, pela própria abelha, ar, etc. Nesses casos, não existe forma de evitar a contaminação (NAKANO et al. 1992).

A presença e a quantidade de esporos encontrados nos favos indicam que esses podem contribuir para a contaminação dos outros produtos. Por outro lado, freqüentemente a contaminação dos produtos apícolas coincide com o tipo de bacilo existente no solo, indicando que as próprias abelhas devem realizar a contaminação da colônia (NEVAS et al., 2006). Colônias localizadas em áreas de solo degradado possuem uma contaminação maior, pois a cobertura vegetal auxilia a evitar a proliferação dos esporos. Assim, recomenda-se que os apicultores evitem áreas degradadas (NEVAS et al., 2006) ou trabalhem para ampliar a cobertura vegetal das áreas próximas ao apiário.

A análise de amostras de méis indica que entre 2 % e 15 % do mel em todo o mundo está contaminado com esporo de *Clostridium botulinum*, havendo uma incidência maior de contaminação em amostras coletadas nos próprios apiários (até 23 %) (MIDURA et al., 1979; NAKANO et al., 1990; NEVAS et al. 2002, 2006).

Poucas pesquisas sobre o assunto foram realizadas no Brasil, mas as análises de amostras de méis provenientes de diversos estados do país indicam uma contaminação de até 7 %, havendo a produção de toxinas do tipo A, B e D, sendo a toxina A considerada a mais letal para o homem (RALL et al., 2003; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1999).

Segundo Nevas et al. (2006), não há correlação estatística entre a contaminação do mel extraído e a contaminação na colônia. Isso ocorre porque o mel também é contaminado no processo de extração.

Técnicas de manejo e a contaminação das colônias com *C. botulinum*

Estudos comprovam que algumas práticas de manejo podem aumentar ou diminuir a quantidade de *Clostridium botulinum* nas colônias. O fornecimento de alimento para as colônias é uma necessidade em algumas épocas do ano, contudo, muitas vezes o alimento energético fornecido às colônias está contaminado com *Clostridium botulinum*, podendo colaborar para a contaminação do mel (NAKANO et al., 1992; NEVAS et al., 2006).

Como o *Clostridium botulinum* pode germinar em abelhas adultas e pupas mortas na colmeia, a taxa de contaminação de algumas amostras pode estar relacionada à essa proliferação do bacilo (NAKANO; KIZAKI; SAKAGUCHI, 1994). Por outro lado, os favos possuem alta concentração dos esporos e a prática de trocar periodicamente os favos velhos diminui a contaminação do mel (NEVAS et al., 2006).

Durante a extração, processamento e beneficiamento do mel, a não-utilização de técnicas de manejo adequadas, a falta de higiene dos manipuladores e dos equipamentos e a contaminação cruzada também podem contaminar o mel (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Nesse caso, o uso das Boas Práticas de Fabricação (BPF) durante todas as etapas da colheita, extração e beneficiamento podem evitar a contaminação.

Nevas et al. (2006) verificaram que a luminosidade adequada facilita a limpeza do local de extração e dos equipamentos, diminuindo a contaminação do mel com qualquer tipo de sujidade. Por outro lado, segundo os autores, existe influência negativa da contaminação do produto com *Clostridium botulinum* nas infra-estruturas físicas que facilitam a prática de lavar as mãos durante o processo de extração.

Como o *Clostridium botulinum* é resistente ao calor, a pasteurização do mel não elimina essa bactéria. Somente temperaturas superiores a 100 °C podem afetar o agente causador do botulismo e aquecer o mel a essa temperatura, entre outros fatores, eleva o nível de hidroximetilfurfural (HMF) e destrói a enzima diastase. Pela legislação brasileira, os níveis desses dois componentes não podem exceder 60 mg/kg para HMF e para diastase o mínimo de 8 mg/kg na escala Göthe ou 3 mg/kg se o HMF for inferior a 15 mg/kg (BRASIL, 2000; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Para que se desenvolva no alimento, o *C. botulinum* necessita encontrar condições adequadas como potencial redox, pH, temperatura e umidade (ALMEIDA FILHO et al., 2006). Comparando-se as análises físico-químicas e microbiológicas de méis contaminados com méis não contaminados, não foi observada nenhuma diferença no teor de HMF, pH, atividade diastásica e presença de leveduras e bactérias anaeróbias (NAKANO; SAKAGUCHI, 1991).

Pesquisas indicam que a presença de *Bacillus alvai* estimula a germinação e a produção da toxina pelo *C. botulinum* tipo F e é provável que a presença do *Clostridium* também estimule o crescimento de outros microorganismos (NAKANO; SAKAGUCHI, 1991; NAKANO; KIZAKI; SAKAGUCHI, 1994). Dessa forma, pode-se concluir que o mel de colônias acometidas de cria pútrida européia, quando causada pelo *Bacillus alvai*, possui uma concentração maior de *Clostridium botulinum*. Entretanto, Nevas et al. (2006) não encontraram correlação significativa entre a presença do bacilo e a existência de doenças nas colônias ou raça das abelhas.

As pesquisas sobre o tempo de sobrevivência do esporo no mel não são conclusivas, mas é certo que dependendo da temperatura de armazenamento, o mesmo pode sobreviver por mais de dois anos (EUROPEAN COMMISSION, 2002).



Análises para detecção do *Clostridium botulinum* no mel

Quando a concentração de esporos nos produtos apícolas é pequena, é difícil detectá-lo por análise (NEVAS et al., 2006). Para detectar a neurotoxina botulínica, o único método recomendado é o bioensaio com ratos (NORDIC..., 1991). Como algumas pesquisas utilizaram outros métodos de análises, que acabam por destruir parte dos esporos antes do laudo final, é possível que a contaminação do mel seja maior do que às divulgadas em pesquisas (NEVAS et al., 2002).

O método de Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) é eficiente para detectar a contaminação de mel com 10^2 esporos/kg de mel, contudo, é necessário que o mel seja processado para a remoção do açúcar do mel, pois esses açúcares inibem a reação de PCR. Várias metodologias já foram testadas para esse processamento, mas somente a filtração do supernadante mostrou-se eficaz (NEVAS et al., 2002). Apesar de ser necessário o consumo de mel contendo 10^3 a 10^4 esporos/Kg de mel para que um lactente desenvolva o botulismo infantil (MIDURA et al., 1979) e o método PCR detectar uma quantidade inferior de esporos, esse não é eficiente para análise de mel contendo menos de 10^2 esporos/Kg de mel. Segundo Dodds (1993), citado em European Commission (2002), o mel pode estar contaminado com níveis bem inferiores aos causadores do botulismo infantil (1 a 10 esporos/Kg de mel).

Vale ressaltar ainda que, na Europa, não é recomendado a análise rotineira do mel para detecção da presença do *Clostridium botulinum* (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Conclusões

A contaminação do mel com *Clostridium botulinum* pode ser reduzida, mas não evitada. Além disso, como um mel que sai da colmeia sem conter os esporos pode ser contaminado durante a extração, ou mesmo posteriormente, no processo de envase do produto, incluir a análise de detecção do *Clostridium botulinum* como corriqueira e obrigatória para a comercialização do produto parece ser desnecessária.

Como foi visto, das análises realizadas, somente os bioensaios com ratos são recomendados. Esses bioensaios, além de demorados, são eticamente discutíveis.

Pesa, ainda, o fator custo. Essas análises aumentariam o custo de produção, que certamente seria repassado ao consumidor, sem lhe garantir que o mel consumido estaria livre do *Clostridium botulinum*.

Diante de todas essas argumentações, pode-se recomendar que o consumidor seja informado do risco em se fornecer mel à lactentes, sem a necessidade de realizar as análises.

No relatório da Comissão Européia sobre os microorganismos existentes no mel, o Diretório Geral de Proteção ao Consumidor chegou à mesma conclusão (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Por outro lado, não existem dados sobre a presença desse esporo em mel de abelhas sem ferrão (*Melipona*). Como essas espécies utilizam barro na construção dos ninhos, é possível que a quantidade de *Clostridium botulinum* nesses méis seja maior do que a existente no mel de *Apis mellifera*. Como popularmente são atribuídas ao mel de *Melipona* maiores propriedades medicinais do que ao mel de *A. mellifera*, fator esse que estimula o fornecimento desse produto a lactentes, é necessário que sejam realizadas pesquisas neste aspecto para nortear as ações dos órgãos competentes sobre o assunto.

Referências

ALMEIDA FILHO, E. S. de; PEREIRA, T. C.; SANTOS, I. F. dos; OLIVEIRA, L. A. T. de. Botulismo em alimentos: um problema de saúde pública. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 38-45, 2006.

ARNON, S. S.; MIDURA, T. F.; DAMUS, K.; THOMPSON, B.; WOOD, R. M.; CHIN, J. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *The Journal of Pediatrics*, Saint Louis, v. 94, n. 2, p. 331-336, Feb. 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11**, de 20 out. 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>. Acesso em: 22 set. 2007.

CENTORBI, O. P. de; SATORRES, S. E.; ALCARAZ, L. E.; CENTROBI, H. J.; FERNÁNDEZ, R. Detection of *Clostridium botulinum* spores in honey. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 29, n. 3, p. 147-151, 1997.

EUROPEAN COMMISSION. Health & Consumer Protection Directorate-General. **Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health on honey and microbiological hazards**. Bruxelas, 2002. 40 p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out53_en.pdf. Acesso em: 22 set. 2007.

KÜPLÜLÜ, O.; GÖNCÜOĞLU, M. ÖZDEMİR, H.; KOLUMAN, A. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 3, p. 222-224, Mar. 2006.

MIDURA, T. F.; SNOWDEN, S.; WOOD, R. M.; ARNON, S. S. Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 9, n. 2, p. 282-283, 1979.

MUGNOL, K. C. U. **Botulismo infantil, um estudo preliminar**. 1997. 24 f. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes.

MONETTO, A. M.; FRANCAVILLA, A.; RONDINI, A.; MANCA, L.; SIRAVEGNA, M.; FERNÁNDEZ, R. A study of botulinum spores in honey. **Anaerobe**, Orlando, v. 5, n. 3/4, p. 185-186, June 1999.

NAKANO, H.; SAKAGUCHI, G. An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 63, n. 2/3, p. 171-177, Apr. 1991.

NAKANO, H.; KIZAKI, H.; SAKAGUCHI, G. Multiplication of *Clostridium botulinum* in dead honey-bees and bee pupae, a likely source of heavy contamination of honey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 247-252, 1994.

NAKANO, H.; OKABE, T.; HASHIMOTO, H.; SAKAGUCHI, G. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Tokyo, v. 43, n. 5, p. 183-195, 1990.

NAKANO, H.; YOSHIKUNI, Y.; HASHIMOTO, H.; SAKAGUCHI, G. Detection of *Clostridium botulinum* in natural sweetening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 117-121, Jun. 1992.

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS. *Clostridium botulinum*: detection in foods and others test materials. 2. ed. Espoo, Finland: VTT Biotechnology and Food Reserach, 1991. 1 v. (NCFM Method, n. 80).

NEVAS, M.; HIELM, S.; LINDSTRÖM, M.; HORN, H.; KOIVULEHTO, K.; KORKEALA, H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 1/2, p. 45-52, 2002.

NEVAS, M.; LINDSTRÖM, M.; HÖRMAN, A.; KETO-TIMONEN, R.; KORKEALA, H. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 1085-1094, 2006.

RALL, V. L. M.; BOMBO, A. J.; LOPES, T. F.; CARVALHO, L. R.; SILVA, M. G. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? **Anaerobe**, Orlando, v. 9, n. 6, p. 299-303, Dec. 2003.

SCHÖCKEN-ITURRINO, R. P.; CARNEIRO, M. C.; KATO, E.; SORBARA, J. O. B.; ROSSI, O. D.; GERBASI, L. E. R. Study of the presence of the spores *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 379-382, Jul. 1999.

SILLOS, M. D. de; FAGUNDES-NETO, U. Foodborne: doenças veiculadas por alimento: intoxicação alimentar. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, São Paulo, v. 8, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/sept04/intoxica.htm>. Acesso em: 21 jun. 2007.

Embrapa

Meio-Norte

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

