

ANÁLISE PRESUNTIVA DE *Clostridium botulinum* EM AMOSTRAS DE MEL COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LEITE, J.M.M.^a; NOGUEIRA, B. E.^a; PARDI, H. S.^b; ECUDINI, J. R.^c; ANDRADE, A.F.B.^d; FRANCO, R. M.^e

^a Bolsista Iniciação Científica - Medicina Veterinária/UFF - Niterói-RJ; ^b Prof. Adjunto – UFF – Niterói-RJ; ^c Prof. C.T.A.I.B.B.; ^d Prof. Adjunto - UERJ - Rio de Janeiro-RJ; ^e Prof. Associado II - UFF - Niterói-RJ

1 – INTRODUÇÃO

O botulismo é causado pela ingestão de uma potente exotoxina solúvel, altamente tóxica produzida pelo *Clostridium botulinum* durante seu crescimento (SOLOMON; LILLY, 2001). Este agente etiológico é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos. Apresenta sete diferentes tipos divididos em dois grandes grupos de acordo com sua atividade proteolítica, sendo os proteolíticos do grupo I e os não-proteolíticos do grupo II. O *C. botulinum* é encontrado nos solos e águas.

Entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores, secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias próprias e deixam maturar nos favos da colméia (BRASIL, 2000). Este alimento é utilizado em larga escala, tendo em vista a sua função medicamentosa aplicada na medicina alternativa. Sabe-se que o mel apresenta inúmeras ações farmacológicas que estão relacionadas diretamente à sua composição química, como, por exemplo, infecções gastrintestinais (ALNAQDY et al., 2005) e na cicatrização de ferimentos e queimaduras. Como também possui longo prazo de vida comercial. A grande pressão osmótica determinada pela alta concentração de açúcar, elevado nível de peróxido de hidrogênio, baixa atividade de água, pH baixo, alta viscosidade, baixo teor de proteínas e potencial redox (MOLAN, 1992). A grande concentração de potássio, entre outros, faz com que este alimento possua efetiva ação antibacteriana sobre a microbiota vegetativa, porém sem ação efetiva sobre a microbiota esporulada. Neste aspecto, considera-se que os esporos de *C. botulinum* possam permanecer no mel durante todo seu processo industrial e prazo de vida comercial (SNOWDON; CLIVER, 1996).

O mel e a poeira são considerados como principais vetores do botulismo infantil (MIDURA, 1996). Por esse motivo, o consumo de mel pra crianças menores de um ano de idade é contra-indicado (JAY, 2005). Indivíduos nesta faixa etária ainda não apresentam microbiota intestinal competitiva, permitindo a vegetação no tubo digestivo dos esporos ingeridos. A presença do esporos no interior da via digestiva da abelha (HUHTANEN et al., 1981), fatores ambientais, presença de animais de fazenda próximos ao apiário e o solo (NEVAS et al., 2006) podem ser citados como fatores que possivelmente estejam relacionados com a contaminação do mel.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo a identificação presuntiva da presença de *C. botulinum*, utilizando-se as técnicas

de semeadura direta (método 1) e centrifugação (método 2), segundo Kuplulu et al., 2006.

Palavras chave: *Clostridium botulinum*, esporo, mel.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas sete amostras de méis oriundas do Município de Bom Jesus de Tabapuana, Estado do Rio de Janeiro, e submetidas a análises bacteriológicas:

2.1. Preparação das amostras:

Método 1: Semeadura direta

Foram adicionados diretamente 10g de mel a 90 mL de Caldo Carne Cozida (CMM) e a 90 mL de Caldo Trypticase Peptona Glicose Extrato de Levedura (CTPGEL) e incubados em banho maria a 65°C por 30 minutos, a fim de inativar a microbiota não esporulada.

Método 2: Diluição centrifugada

25g de mel foram diluídos em 100 mL de água destilada com 1% de Tween 80, homogeneizados e incubados em banho maria a 65°C por 30 min, com a mesma finalidade do método anterior. Posteriormente, foram colocados 10 mL da solução em tubos de Falcon e centrifugados a 9000xg por 30 minutos. O precipitado formado foi transferido com pipetas de Pasteur para 9 mL de CMM e 9 mL de CTPGEL.

Despejou-se parafina sobre os meios para propiciar condição de anaerobiose. A incubação das amostras pelos dois métodos foi feita em estufa, sendo o CMM a 35°C e o CTPGEL a 26°C, ambos por um período de 7 a 10 dias.

2.2. Isolamento de *Clostridium botulinum*:

Após sete dias de incubação verificou-se de ambos os meios a turbidez, produção de gás e proteólise (digestão da carne) no caso do CMM. As culturas com crescimento insignificante foram reincubadas na estufa na mesma temperatura utilizada anteriormente por mais três dias, completando um período máximo de dez dias. As culturas ainda sem crescimento foram consideradas negativas e descartadas. Das amostras positivas são feitos esfregaços para a coloração pelo método Gram, a fim de detectar a presença de bacilos gram positivos esporulados ou não.

Semearam-se as culturas positivas em placas contendo Anaerobic Egg Yolk Agar (AEY) e incubadas em anaerobiose em Jarra colorina grande a 35°C por 48 horas. As colônias típicas obtidas foram re-estriadas em duplicata em placas de AEY e uma de cada incubada aerobicamente e anaerobicamente em Jarra colorina grande, ambas a 35°C por 48h.

Somente as colônias crescidas em anaerobiose foram consideradas culturas puras e estocadas em CMM e CTPGEL.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas apresentaram bacilos Gram positivos, identificados por esfregaço em lâmina e corados pelo método de Gram, tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose. Contudo nas amostras

analisadas pelo método 2 (diluição centrífuga) ocorreu maior presença de esporos e bacilos nas culturas submetidas à anaerobiose do que comparado com as submetidas à aerobiose. Através desses resultados sugere-se que tanto *Bacillus* spp. quanto *Clostridium* spp. foram encontrados nas metodologias utilizadas. É de fundamental importância destacar que no método 2 com centrifugação de 9.000xg o número de esporos encontrados por campo foi sempre superior aqueles encontrados no método 1 (semeadura direta) tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Entretanto, de acordo com Huhtanen et al., 2005, que utilizou técnicas de análise similares, o método de semeadura direta foi mais eficaz.

Os resultados são preliminares pois serão realizadas provas bioquímicas objetivando a identificação de *Bacillus* spp, e provas bioquímicas e biológicas para a identificação de *C. botulinum*.

Ragazani et al., 2008, Schocken-Iturrino et al., 1999 e Midura, et al., 1979, também isolaram estirpes de *C. botulinum*, utilizando técnicas diferentes das aplicadas no presente trabalho, entretanto, os meios de cultura foram semelhantes.

Portanto, de acordo com os resultados encontrados e com os autores citados acima, observa-se uma alta ocorrência da presença de *C. botulinum* em amostras de mel. Salienta-se que o consumo de mel contaminado por esta microbiota anaeróbica pode tornar-se um grande problema de saúde coletiva, por ser, o mel, um alimento de grandes propriedades nutricionais e farmacêuticas, altamente consumido pela população e podendo atuar como um disseminador de agentes etiológicos às diferentes categorias de ingestores, principalmente idosos, crianças e imunocomprometidos.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alnaqdy, A.; Al-Jnabri, A.; Nzeako, B.; Nsanze, H. Inhibition effect of honey on the adherence of *Salmonella* to intestinal epithelial cells in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, v.103, p.347-351, 2005.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, 2007.
- Huhtanen, C.N.; Knox, D.; Shimanuki, H. Incidence and origin of *Clostridium botulinum* spores in honey. *Journal of Food Protection*, v.44, p.812–814, 1981.
- Jay J. M. Intoxicação Alimentar causada por Bactérias Esporuladas Gram-positivas. In: Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artimed, 2005. 711p. cap.24, p.491-542.
- Kuplulu, O.; Goncuoglu, M.; Ozdemir, H.; Koluman, A. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*, v.17, p.222-224, 2006.
- Midura, T. F.; Snowden, S.; Wood, R. M.; Arnon, S. S. Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. *Journal of Microbiology*, v.9, p.282-283, 1979.
- Midura, T.F. Update: infant botulism. *Clinical Microbiology*, v.9, p.119–125, 1996.
- Molan, P.C. The antibacterial activity of honey. *Journal Bee World*, v.73, p.5-28, 1992.
- Nevas, M.; Lindström, M.; Hörman, A.; Keto-Timonen, R.; Korkeala, H. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environmental Microbiology*, v.8, p.1085–1094, 2006.

- Raganazi, A. V. F.; Schocken-Iturrino, P. R.; Garcia, G. R.; Delfino, T. P. C.; Poiatti, M. L.; Berchielli, S. P. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializados no Estado de São Paulo e em outros Estados brasileiros. *Ciência Rural*, v.38, p.396-399, 2008
- Solomon, H.M.; Lilly, T. Jr. *Clostridium botulinum*. *Bacteriological analytical manual*, 8.ed, 2001.
- Snowdon, J.A., and Cliver, D.O. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p.1–26, 1996.
- Schocken-Iturrino, P.R.; Carneiro, M.C.; Kato, E.; Sorbara, J.O.B.; Rossi, O. D.; Gerbasi, L.E.R. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.379-382, 1999.