



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS

MARTA DOLOROSA FERREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA *Apis mellifera* COMERCIALIZADAS EM SOUSA-PB

POMBAL – PB

2018

MARTA DOLOROSA FERREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA *Apis mellifera* COMERCIALIZADAS EM SOUSA-PB

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais (PPGSA), como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG/CCTA.

Orientador: Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho

Co-orientador: Prof. D.Sc. Patrício Borges Maracajá

POMBAL – PB

2018

S237a Santos, Marta Dolorosa Ferreira dos.
Avaliação microbiológica de amostras de mel de abelha *Apis mellifera* comercializados em Sousa - PB / Marta Dolorosa Ferreira dos Santos. – Pombal, 2019.
46 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho".

"Co-orientação: Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá".

1. Mel de abelha. 2. Mel - Qualidade microbiológica. 3. Apicultura. I. Fernandes Filho, Antônio. II. Maracajá, Patrício Borges. III. Título.

CDU 634.616(043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



CAMPUS DE POMBAL

“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA *Apis mellifera* COMERCIALIZADAS EM SOUSA - PB”

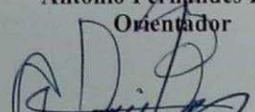
Defesa de Trabalho Final de Mestrado
Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 20 / 12 / 2018

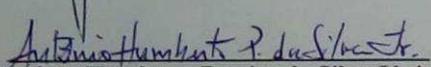
COMISSÃO EXAMINADORA



Antônio Fernandes Filho
Orientador



José Cezário de Almeida
Examinador Interno



Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior
Examinador Externo

POMBAL-PB
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo carinho, amor e dedicação recebidos ao longo da minha vida, em especial a minha querida mãe, que sempre acreditou e investiu em mim. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao meu esposo, Adriano, um apoiador incondicional dos meus projetos, um companheiro amigo e que sempre me incentivou a concretizar meus sonhos profissionais, aceitando resignadamente a minha ausência como esposa.

A minha filha, Maria Vitória, razão do meu viver, a quem dedico todas as minhas batalhas diárias na busca incansável para oferecer-lhe sempre o melhor. Minha querida Vitória, tudo o que faço, faço por você!

Ao meu orientador, Professor Dr. Antônio Fernandes Filho, que no passado fora meu colega de graduação, de residência universitária e de especialização. A vida nos levou por caminhos diferentes, mas depois de alguns anos o destino mais uma vez nos uniu, e como os verdadeiros laços de amizade são indissolúveis, a nossa amizade resistiu ao tempo e nos reencontramos como aluna e professor. Obrigada por ter abraçado o meu projeto com todos os desafios que iríamos enfrentar ao longo dessa caminhada, e por ter acreditado em mim. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência com os meus anseios, e principalmente, por ter sido o AMIGO de sempre.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Patrício Borges Maracajá, pela maneira fraterna e carinhosa que me acolheu, sempre me encorajando nos momentos em que não me sentia capaz.

Ao meu amigo, professor Damião Júnior, por toda a contribuição que deu ao meu projeto, abrindo as portas do laboratório de microbiologia de alimentos do IFPB disponibilizando todo suporte técnico para a realização das análises. Aqui expresso a minha eterna gratidão por tudo o que você fez por mim. Levarei para sempre comigo todos os seus ensinamentos e as palavras de conforto que me tranquilizavam nos momentos difíceis nos quais pensava em desistir.

A querida amiga e colega de profissão, a professora Rafaela Abrantes, que na reta final, adotou meu projeto como se fosse seu, contribuindo de forma ímpar, olhando cada detalhe, checando tudo com seu olhar clínico. Obrigada “Rafa”, por ter sido um anjo de luz na minha vida.

E por fim, um agradecimento especial a Deus, que permitiu que tudo isso se realizasse. Obrigada, meu Deus, por todos os obstáculos superados, por nunca me abandonar e estar sempre presente em todos os momentos. Tudo o que eu sou e conquistei até aqui, foi graças ao teu amor por mim. Hoje, meu coração transborda de alegria. Obrigada por mais essa vitória em minha vida!

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.

Albert Einstein

RESUMO

A espécie *Apis mellifera* L. é a principal produtora do mel comumente utilizado para consumo humano. O mel de abelha é um produto alimentício de grande valor nutritivo, considerado terapêutico, benéfico à saúde, e um composto biológico complexo. Alguns fatores interferem na sua qualidade, como processamento e armazenamento. Estes podem contribuir para as contaminações microbiológicas e as características microbiológicas do mel estão relacionadas à qualidade e a segurança deste alimento. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do mel comercializado no município de Sousa-PB. Foram analisadas 22 amostras de mel de abelha *Apis mellifera* coletadas no comércio da cidade de Sousa/PB. Para análise, foi realizado o plaqueamento em profundidade para contagem das colônias presuntivas de *Clostridium botulinum* sulfito redutores; Coliformes a 35°C e a 45°C e *Staphylococcus* sp. [De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que diante das amostras de mel analisadas quanto à detecção das bactérias presentes, identificou-se que o *Clostridium* sulfito redutor (Crs) foi a bactéria encontrada em menor quantidade, representando 9,1% da amostra. Já quanto a análise de amostra formal e não formal do mel, a bactéria *Clostridium* sulfito redutor (Crs) foi encontrada em 22% da amostra formal e não houve registro na amostra informal. Houve contaminação em 38,5% das amostras informais e 66,7% das amostras formais e presença da bactéria *Staphylococcus* (Estati) em amostras de mel com capa]. Conclui-se, portanto, que os apicultores e os comerciantes de mel não estão obedecendo à regulamentação estabelecida, de forma que não estão seguindo as recomendações de Boas Práticas de Fabricação para que haja a garantia da qualidade do mel produzido e processado.

ABSTRACT

The species *Apis mellifera* L. is the main producer of honey commonly used for human use. Bee honey is a food product of great nutritional value, considered therapeutic, beneficial to health, and a complex biological compound. Some factors interfere in its quality, such as processing and storage. These may contribute to microbiological contaminations and the microbiological characteristics of honey are related to the quality and safety of this food. Therefore, the present study aimed to evaluate the microbiological quality of honey marketed in the city of Sousa-PB. Twenty - two samples of honey bee *Apis mellifera* collected in the city of Sousa / PB were analyzed. For analysis, plating was carried out in depth to count the presumptive colonies of *Clostridium botulinum* sulphite reducers; Coliforms at 35 °C Coliforms and 45 °C and *Staphylococcus* sp. [According to the results obtained, it was possible to observe that, before the honey samples analyzed for the detection of the present bacteria, *Clostridium* sulfite reductant (CrS) was the bacterium found in less quantity, representing 9.1% of the sample. Regarding the formal and non- formal sample analysis of honey, *Clostridium* sulfite reductant (CrS) was found in 22% of the formal sample and there was no record in the informal sample. There was contamination in 38.5% of the informal samples and 66.7% of the formal samples and presence of *Staphylococcus* (Statistical) bacteria in honey samples with a coat]. It is concluded, therefore, that honey beekeepers and merchants are not complying with the established regulations, so that they are not following the Good Manufacturing Practices recommendations in order to guarantee the quality of the honey produced and processed.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviaturas/Siglas	Descrição
Ágar TSC	Ágar Triptona Sulfito Cicloserina
ASF	Abelhas sem ferrão
BHI	Brain Heart Infusion
BoNT	Botulismo neurotoxin
IFPB	Instituto Federal da Paraíba
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
TGM	Meio de Tioglicolato
UFC	Unidade formadora de colônia
Crs	<i>Clostridium</i> sulfito redutor
Estat.	<i>Staphylococcus</i>
C35	Coliformes a 35°C
C45	Coliformes a 45°C
Ec	<i>Escherichia coli</i>

Observação: As abreviaturas e siglas utilizadas neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritas no texto ou são conversões adotadas universalmente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Abelha <i>Apis mellífera</i>	16
Figura 02: Esporos do <i>Clostridium botulinum</i>	21
Figura 03: Mecanismo de ação da toxina botulínica.....	22
Figura 04: Lesões características do botulismo de feridas.....	23
Figura 05: Plaqueamento em profundidade para contagem das colônias presuntivas de <i>Clostridium botulinum</i>	29
Figura 06: Incubação das colônias <i>C. botulinum</i>	29
Figura 07: Contagem e confirmação das colônias de <i>C. botulinum</i>	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resultado do teste de Fisher para investigar a associação do tipo de mercado e a presença de bactérias na amostra.....	35
Quadro 2: Resultado do teste de Fisher para investigar a associação do tipo de mercado e a presença de bactérias na amostra.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Apicultura.....	15
3.2 Tipos de abelhas.....	15
3.3 Considerações gerais do mel de abelha.....	17
3.3.1 Classificação do mel.....	17
3.3.2 Composição do mel.....	17
3.3.3 Características sensoriais.....	18
3.3.4 Características físico-químicas.....	18
3.4 Contaminação microbiológica do mel de abelha.....	18
3.4.1 Botulismo.....	20
3.4.1.1 Fontes de alimentos.....	21
3.4.1.2 Fisiopatogenia.....	22
3.4.1.3 Sintomas.....	24
3.4.1.4 Diagnóstico.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Tipo de estudo.....	26
4.2 Local de pesquisa.....	26
4.3 Desenho da pesquisa.....	26
4.4 Procedimentos para análise.....	27
4.4.1 Material e meios requeridos para análise.....	27
4.4.2 Preparação das amostras.....	27
4.4.3 Inoculação.....	27
4.4.4 Incubação.....	28
4.4.5 Contagem de colônias presuntivas de <i>C. botulinum</i> sulfito redutores.....	28
4.4.6 Confirmação das colônias típicas de <i>C. botulinum</i>	28
4.4.7 Cálculo dos resultados.....	29
4.5 Contagem de <i>C. botulinum</i> em placas.....	29

4.5.1 Confirmação das colônias típicas de <i>C. botulinum</i>	29
4.5.2 Cálculo dos resultados.....	30
4.6 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
7 REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O mel é definido como uma substância açucarada natural, produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou de secreções procedentes de partes vivas de certas plantas, ou de secreções de insetos sugadores de plantas que vivem sobre algumas espécies vegetais que as abelhas, recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (Rodriguez et al., 2012)

É um dos alimentos mais complexos produzidos pela natureza. Por este motivo, é utilizado tanto para fins medicinais como nutricionais (AL-WAILI et al., 2012), também é o único agente edulcorante que pode ser utilizado para o consumo humano, sem transformação (TERRAB, et al., 2004). A procura da população por produtos naturais e saudáveis nos últimos anos tem aumentado o consumo de mel significativamente (BERTOLDI, 2008). Por ser um alimento conhecido e utilizado mundialmente é considerado um adoçante natural, fonte de energia e apresenta característica medicinal que confere resistência imunológica, antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, sedativo e expectorante (RODRIGUEZ et al., 2012; YUCEL; SULTANOGLU, 2013).

Além das propriedades medicinais, o mel apresenta cerca de 180 substâncias diferentes, com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter ceras de abelhas procedentes do processo de extração (BRASIL, 2000).

Após sua colheita, o mel continua sofrendo modificações físicas, químicas e organolépticas, gerando a necessidade de produzi-lo dentro de níveis elevados de qualidade, controlando todas as etapas de processamento, a fim de que se possa adquirir um produto de qualidade. Portanto, a qualidade do mel das abelhas é determinada principalmente pelas características químicas, físicas, sensoriais e microbiológicas. (CONTI, 2000; AZEREDO et al., 2003; TERRAB et al., 2004; CORBELLA; COZZOLINO; ZAMORA, 2006; CHIRIFE; ROLDAN, 2006). Internacionalmente, os critérios de qualidade do mel estão especificados nos órgãos reguladores, compilados em um dos Codex Alimentarius Standard (2001).

No Brasil, o mel comercializado deve estar adequado com o que é descrito pelo Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel contido na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A atual Legislação Brasileira para identidade e qualidade do mel (BRASIL 2000) não contemplam os limites microbiológicos aceitáveis para este produto, porém esses padrões

precisam ser revisados, principalmente por se tratar de um alimento consumido por crianças, adultos, idosos e pessoas de saúde frágil.

Sua microbiota é constituída por micro-organismos presentes no estado esporulado, como as bactérias do gênero *Bacillus*, e outros ocasionais ou acidentais, como fungos dos gêneros *Penicillium*, *Mucore* *Saccharomyces*, os quais são incorporados ao mel pelas próprias abelhas da colônia, durante as operações de coleta, preparo do néctar e pólen, ou de maneira fortuita por manipulações pouco higiênicas, durante as etapas de coleta e processamento do mel (SNOWDON, 1999).

Segundo (SANTOS, 2007), é possível encontrar no intestino das abelhas cerca de 1% de leveduras, 29% de bactérias Gram positivas, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bacterium*, *Streptococcus* e *Clostridium* e 70% de gram-negativas das espécies *Achomobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinea*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiela*, *Proteus* e *Pseudomonas*.

Desta forma, considera-se necessário fixar a qualidade e identidade do mel destinado ao consumo humano, pois é sabido que o mesmo é um produto resultante da ação de enzimas salivares das abelhas, a partir do néctar que é colhido das flores, sendo armazenado nos favos em suas colmeias. Por este motivo, é considerado um produto de origem animal e necessita, então, ser inspecionado (TEIXEIRA; VERÍSSIMO, 2015).

Diante do exposto, questiona-se: o mel comercializado no município de Sousa, estado da Paraíba, é de qualidade? Apresenta contaminantes bacterianos (*C. botulinum*)?

Na tentativa de responder a esta questão, a presente proposta de pesquisa tem por objetivo realizar uma sistematização de dados sobre a importância do mel de abelha, da bactéria *Clostridium botulinum* e da toxina botulínica, bem como detectar a quantidade de Coliformes e de *Staphylococcus* sp presentes no mel comercializados em Sousa-PB e alertar as autoridades competentes sobre a importância do controle de qualidade e de boas práticas apícolas para se oferecer aos consumidores um produto de qualidade higiênico-sanitária satisfatória, sem que haja riscos à saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica do mel de abelha *Apis mellifera* comercializado no município de Sousa-PB

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença do *C. botulinum* no mel de abelha comercializado no município de Sousa-PB;
- Detectar a quantidade de Coliformes e de *Staphylococcus* sp presentes no mel de abelha comercializado no município de Sousa-PB;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Apicultura

É uma atividade de grande importância, pois apresenta uma alternativa de ocupação e renda para o homem do campo. É de fácil manutenção e de baixo custo inicial em relação às demais atividades agropecuárias. O mel é considerado o produto apícola mais fácil de ser explorado, sendo também o mais conhecido e aquele com maiores possibilidades de comercialização. Além de ser um alimento, é também utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas, pelas suas conhecidas ações terapêuticas (FREITAS; KHAN; SILVA, 2004).

A apicultura vem ganhando espaço no Brasil como uma atividade rentável, pois apresenta retorno rápido do capital investido. Além disso, as condições climáticas são bastante favoráveis ao desenvolvimento das abelhas do gênero *Apis* (BRASIL, 2004).

O mel de abelhas tem se tornado uma importante fonte alimentar nos últimos anos. Prova disso é que em alguns locais do Brasil já é componente básico da merenda escolar de crianças que estão no ensino fundamental (PEREIRA, 2010). Por outro lado, além de alimento, é bastante utilizado como fonte medicamentosa no combate a algumas enfermidades do corpo humano. É um produto biológico muito complexo, cuja composição varia notavelmente em função da flora visitada pelas abelhas e das condições climáticas da região onde foi produzido. Nesse cenário, estudos que caracterizam o mel das mais distintas localidades de produção são importantes para a formação de um banco de dados que possibilite estabelecer padrões que sirvam de referência para se interferir sobre aspectos de qualidade de tais produtos e, desse modo, proteger o consumidor contra produtos contaminados ou adulterados (PEREIRA, 2010).

3.2 Tipos de abelhas

A criação de abelhas no Brasil atualmente pode ser dividida em duas práticas distintas, a Apicultura e a Meliponicultura. A Apicultura é a atividade que consiste no manejo da abelha *Apis mellifera* e dos produtos provenientes de sua colmeia. Como sua prática é difundida pelo mundo, é detentora de tecnologia desenvolvida e os métodos de sua produção são bem definidos e conhecidos. No Brasil, existe legislação preconizando padrões de qualidade para mel (BRASIL, 2000), pólen, própolis e geleia real (BRASIL, 2001). Nogueira

Neto (1997) define Meliponicultura como a arte de manejo de abelhas indígenas sem ferrão, sendo a obtenção de mel seu objetivo principal.

A maioria das abelhas não tem hábito social. No entanto, as abelhas sociais são as mais conhecidas por serem exploradas para obtenção especialmente do mel estocado em suas comeias e da polinização (COUTO; COUTO, 2002). Porém, várias espécies de abelhas sociais são também nativas do Brasil. A população de abelhas sociais inclui algumas espécies de “mamangavas” (BOMBINI), como também muitas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) (IMPERATRIZ FONSECA et al., 2005).

As abelhas sem ferrão (ASF) foram as únicas espécies produtoras de mel empregadas até 1838. Por serem tradicionalmente manejadas por povos indígenas e por terem o ferrão atrofiado, são comumente referidas como “abelhas nativas sem – ferrão” ou “abelhas indígenas sem – ferrão” (KERR et al., 2005).

As abelhas meliponíneas que podem ser encontradas no Brasil são as espécies borá (*Tetragona claviceps*), Jataí (*Tetragonisca angustula*), jandaíra (*Melipona quadrifasciata*), mirins (*Plebeia* spp) e urucu nordestina (*Melipona scutellaris*). Quanto às abelhas africanizadas no Brasil, refere-se à espécie *Apis mellifera* (NOGUEIRA NETO, 1997). As abelhas sociais mais utilizadas comercialmente pertencem ao gênero *Apis*. Elas são classificadas em sete espécies diferentes: *Apis florea*, *A. andreniformes*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. mellifera*, *A. laboriosa*, e *A. koschevnikov* (COUTO; COUTO, 2002).

A *A. mellifera* (figura 1) foi introduzida no Brasil no século XIX e, atualmente tem ampla distribuição em todo país. Esta espécie adaptou-se muito bem às condições ambientais e, atualmente tem uma enorme população silvestre (IMPERATRIZ-FONSECA et al.,2005).

Figura 1. Abelha *Apis mellifera*.



Fonte: Freak M., 2007.

3.3 Considerações gerais do mel de abelha

Os produtos apícolas mais comercializados atualmente são o mel, que para as abelhas é uma reserva alimentícia, enquanto para nós é um dos melhores adoçantes naturais. O mel de abelha é um produto alimentício de grande valor nutritivo e de alta aceitabilidade por parte do consumidor, principalmente por ser considerado um produto terapêutico, benéfico à saúde. É um produto biológico muito complexo, cuja qualidade e composição físico-química variam notadamente dependendo da flora visitada, das condições climáticas e da região onde for produzido, bem como do manejo do apicultor (RACOWSKI, 2009).

Ainda são comercializados a apitoxina, coletada do ferrão com alguns usos terapêuticos; e a cera, secretada das glândulas cerígenas, sendo usada na confecção dos favos das colmeias, com usos diversos na indústria (WIESE, 1986).

3.3.1 Classificação do mel

- **Mel floral:** obtido dos néctares das flores. O mel pode ser unifloral ou monofloral quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias. E pode ainda ser multifloral ou polifloral, quando obtido a partir de diferentes origens florais ((BRASIL, 2000).
- **Mel de melato:** é formado principalmente a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000).

3.3.2 Composição do mel

O mel é constituído de diferentes açúcares, predominando os monossacarídeos glicose e frutose. Apresenta também teores de proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, substâncias minerais, pólen e outras substâncias, sacarose, maltose, malesitose e outros oligossacarídeos (incluindo dextrina). Além de pequenas concentrações de fungos, algas, leveduras e outras partículas sólidas resultantes do processo de obtenção do mel (CODEX, 2001).

A concentração de tais substâncias depende de muitos fatores tais como: espécie de abelha, natureza de solo, estado fisiológico das colônias, estado de maturação do mel, condições meteorológicas, entre outros (VIDAL, 2004).

3.3.3 Características sensoriais

Segundo a instrução normativa nº 11 de 2000, que regulamenta a identidade e qualidade do mel, define as características sensoriais como sendo: cor, sabor, aroma e consistência (viscosidade) (BRASIL, 2000).

Esses parâmetros variam de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (oriundo de flores como o assa-peixe), âmbar (flores de laranjeiras), escuro (eucalipto, silvestre) e pardo escuro (trigo sarraceno). A coloração do mel (escurecimento) varia também de acordo com o tempo de estocagem e com a temperatura. O superaquecimento e contaminação com metais também podem escurecer o mel. De maneira geral, o mel mais escuro tem mais sais minerais do que o mel claro. Pesquisas mostram que os mais escuros podem ter de quatro a seis vezes mais sais minerais que os claros, com destaque para o manganês, potássio, sódio e ferro (COUTO; COUTO, 2002).

3.3.4 Características físico-químicas

A composição físico-química do mel varia de acordo com alguns fatores como condições climáticas, estágio de maturação, espécies de abelhas e tipo de florada (PEREZ et al., 2007).

A obtenção de parâmetros físico-químicos de méis é de grande importância para a sua caracterização (SERRANO et al, 2004), bem como é primordial para garantir a qualidade desse produto.

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) e o Codex Standard for Honey estabelecem parâmetros indicadores de qualidade físico-química do mel que estão divididos em três grupos: Indicadores de maturidade, de pureza e de deterioração.

3.4 Contaminação microbiológica do mel de abelhas

Os produtos apícolas são sensíveis às contaminações ambientais, pois o néctar e o pólen são oriundos das flores que estão permanentemente expostas às mais diversas fontes

poluidoras. Segundo Pereira (2010), é importante que se estude os méis das mais diferentes localidades de produção para que se possa obter um banco de dados que se possibilite estabelecer padrões que sirvam de referência para se interferir sobre aspectos de qualidade de tais produtos e, desse modo, proteger o consumidor contra produtos contaminados ou adulterados.

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) e internacional (CODEX, 2001) vigentes não exigem realização de análise microbiológica em mel. Estabelecem apenas que sejam seguidas Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos na manipulação do produto.

Segundo Lopes (2008), a microbiota do mel pode variar, possuindo micro-organismos introduzidos pelas próprias abelhas e outros introduzidos de forma indesejada por falta de higiene na manipulação ou durante a extração e beneficiamento do mel.

A quantidade de bactérias presentes no mel pode variar de acordo com o tipo de mel, tipo de amostra, tempo de colheita, armazenamento e técnica de análise utilizada (SNOWDON, 1999). Para Nogueira Neto (1997), as condições higiênicas do mel não estão somente relacionadas às práticas de higiene do produtor, mas também estão relacionadas com os hábitos das abelhas, já que muitas espécies pousam em material fecal.

Os esporos de bactérias mais encontrados pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Dentre os esporos do gênero *Bacillus*, os predominantes são *B. cereus*, *B.coagulans*, *B. megatorium* e *B. alvei*. Em estudo realizado em 433 amostras de mel da Argentina, 27% das amostras podem conter *Bacillus cereus* e 14% *Bacillus spp*. Os resultados mostraram uma grande diversidade entre os isolados. Isso poderia estar relacionado com várias origens da contaminação bacteriana, como pólen, abelhas, cera, equipamentos e pó. A incidência de esporos de *Clostridium botulinun* no mel tem sido estudada, pois são frequentemente relacionados com a incidência de botulismo infantil.

[Através de pesquisas microbiológicas realizadas em todo o mundo têm sido encontrados esporos de *Clostridium botulinun* entre 4 e 25% das amostras de mel (EDUARDO, 2002). Devido essa contaminação e como consequência, a associação epidemiológica do consumo do mel com o botulismo infantil, a U.S. Food and Drug Administration, o Centers for Disease Control and Prevention e a American Academyo Pediatrics têm advertido que o mel não deve ser administrado a crianças menores de um ano de idade em substituição ao açúcar (PEREIRA et al., 2007)].

3.4.1 Botulismo

O botulismo, uma forma de intoxicação alimentar, é causado pelo *Clostridium botulinum*, um bastonete gram-positivo anaeróbico obrigatório, formador de endosporos, encontrado no solo e em muitos sedimentos de água fresca. Em ambientes de anaerobiose, o microrganismo produz uma exotoxina que estudos em animais mostraram ser a mais potente de todas as toxinas naturais. Essa neurotoxina é altamente específica para a extremidade sináptica do nervo, onde bloqueia a liberação da acetilcolina, uma substância necessária para a transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses (GERARD et al., 2008).

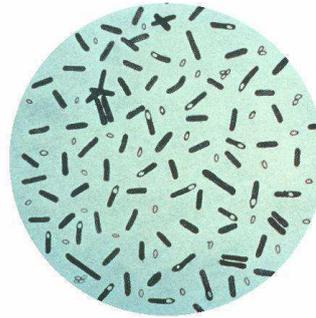
O botulismo foi descrito pela primeira vez como uma doença clínica no início do século XIX, quando ficou conhecida como a doença da salsicha (*botulus* é a palavra latina para salsicha). É adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, tais como embutidos e conservas caseiras que não sofreram tratamento térmico adequado, ou foram armazenados em condições que permitam a germinação dos esporos do *C. botulinum* presentes no alimento e como consequência a produção da toxina botulínica (GERARD et al., 2008).

É uma doença de alta letalidade que deve ser considerada como uma emergência médica e de saúde pública que tem como agente etiológico o *Clostridium botulinum*, que é um bacilo que apresenta esporos ovais subterminais, cujo hábitat natural é o solo, poeira e sedimentos marinhos, podendo ser encontrado em uma grande variedade de agroprodutos frescos ou industrializados, e que pode ser encontrado também em fezes humanas (TRABULSI et al., 2008).

O agente aparece também como habitante normal do trato intestinal de equinos, bovino e aves, onde se multiplica e é excretado em grande quantidade nas fezes por mais de oito semanas após a primo-infecção (EDUARD et al., 2002; FREAN et al., 2004).

Os esporos do *C. botulinum* são as formas mais resistentes que se tem encontrado entre os agentes bacterianos, podendo sobreviver por mais de 30 anos em meio líquido e, provavelmente, mais tempo ainda em estado seco (RADOSTITS et al., 2002). Podem tolerar temperaturas de 100 °C por hora. Para destruir os esporos, os alimentos contaminados devem ser aquecidos a 120 °C por 30 minutos. Além disso, os esporos do tipo E são capazes de germinar em temperaturas inferiores a 3°C e frequentemente estão associados com frutos do mar refrigerados (KETCHAM; GOMEZ, 2003).

Figura 02: Esporos do *Clostridium botulinum*.



Fonte: Kookaburra, 2005.

A espécie que produz sete tipos antigênicos de toxina botulínica (BoNT – botulismo neurotoxin) designados de A-G é dividida em quatro grupos fisiológicos:

- Grupo I reúne os micro-organismos proteolíticos que produzem as toxinas A, B ou F.
- Grupo II reúne os organismos não proteolíticos e que podem produzir as toxinas B, E ou F.
- Grupo III engloba os organismos produtores de toxinas C e D.
- Grupo IV define o tipo G, descoberto na Argentina e que não causa doença humana ou animal (TRABULSI et al., 2008).

As toxinas A, B, E, e F são as principais causas de botulismo em humanos, enquanto os tipos C e D estão associados o botulismo que ocorre em aves e mamíferos (TRABULSI et al., 2008).

Essas toxinas perdem sua atividade quando submetidas à temperatura de 80°C durante trinta minutos ou a 100°C por cinco minutos, quando expostas à luz solar por uma a três horas, à temperatura ambiente por doze horas ou em vinte minutos em água clorada (destruição de 84%) (PINILLOS et al., 2003).

3.4.1.1 Fontes de alimentos

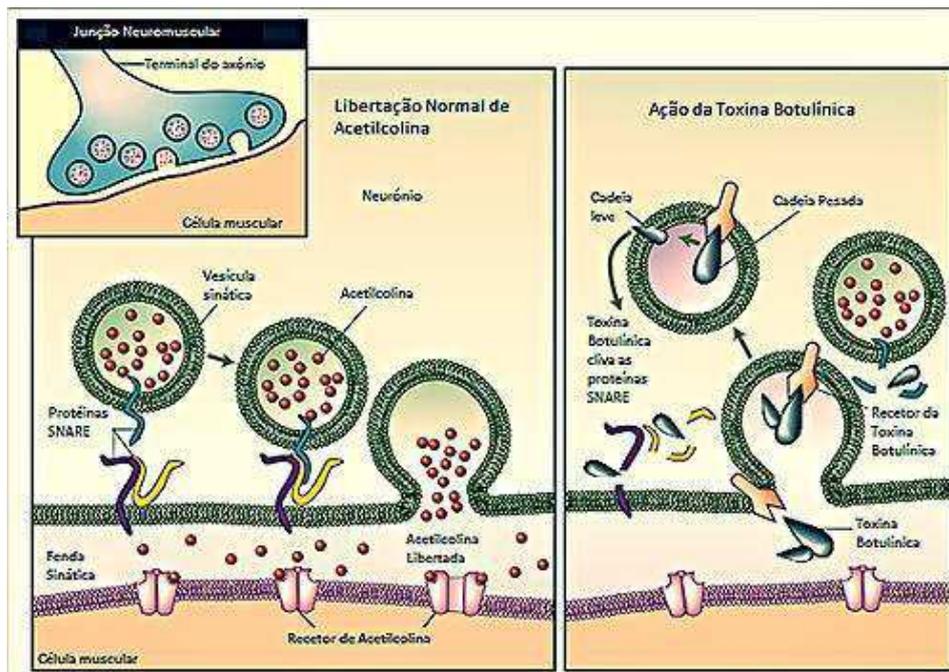
São inúmeros os alimentos que podem conter o *C. botulinum* e transmitir a doença (botulismo), entre eles temos: os embutidos de carne em geral (salsicha, salame e presunto), conservas em lata, hortaliças, legumes (palmitos, aspargos, cogumelo, alcachofra, pimentões, berinjela, alho e pickles), peixes, frutos do mar, mel 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 (TRABULSI et al., 2008).

3.4.1.2 Fisiopatogenia

A contaminação faz-se, habitualmente, pela ingestão de alimentos confeccionados e conservados por processos caseiros, que podem estar contaminados com esporos da bactéria. As neurotoxinas botulínicas (tipos A e B) estão relacionadas com a ingestão de mel, compotas, enlatados e defumados, enquanto a toxina E associada ao caviar, pastas de peixe ou marisco preparados artesanalmente (POÇAS, 1990).

Após a absorção gastrointestinal da toxina, ela é transportada por via sanguínea indo exercer a sua ação nas sinapses nervosas periféricas colinérgicas, nomeadamente na união neuromuscular, bloqueando de forma irreversível a libertação da acetilcolina (figura 05) por meio do bloqueio dos canais de cálcio, conforme aponta George (1995).

Figura 03: Mecanismo de ação da toxina botulínica



Fonte: Adaptado de Dickerson and Janda, 2006.

Consequentemente, haverá falha na transmissão de impulsos na junção das fibras nervosas, resultando em paralisia flácida dos músculos que esses nervos controlam (MURRAY, 2000).

O alimento consumido juntamente com a toxina pode protegê-la do efeito deletério dos ácidos durante a passagem pelo estômago. O local de máxima absorção da toxina

botulínica é o intestino delgado, de onde segue para o sistema linfático e posteriormente alcança a corrente sanguínea.

Nos humanos, a doença causada pela toxina botulínica, pode ocorrer de três formas:

- Botulismo clássico: Correspondente à intoxicação causada pela ingestão de alimentos contendo neurotoxinas;
- Botulismo de lesão: É uma doença infecciosa causada pela proliferação e consequente liberação de toxinas em lesões infectadas com *Clostridium botulinum*. Os sinais e sintomas neurológicos do botulismo alimentar e da ferida são os mesmos, porém os sintomas de botulismo da ferida podem levar mais tempo para aparecer, como mostra a figura 07.

Figura 04: Lesões características do botulismo de feridas.



Fonte: Lima; Carvalho Neta, 2015.

- Botulismo infantil: É também uma doença infecciosa causada pela ingestão de esporos do *C. botulinum* e subsequente germinação, multiplicação e toxigênese no intestino de crianças com menos de um ano de idade.

Uma vez que a toxina é responsável pela sintomatologia do botulismo, as três formas dessa doença são clinicamente muito semelhantes.

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 (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MUGNOL, 1997).

É também conhecido como botulismo de lactentes (associado a Síndrome da Morte Súbita do Recém-nascido). Ocorre em crianças muito jovens (geralmente menor que um ano de idade) devido à absorção da toxina produzida in vivo, no intestino da criança. A ausência da microbiota de proteção permite que o esporo do *Clostridium botulinum* ingerido germine e ocorra a produção de toxina na luz intestinal. A doença esta normalmente associada ao consumo de mel contaminado. Por isso, este alimento não deve ser fornecido para crianças menores de um ano de idade (BOOK, 2007).

Os indivíduos com botulismo sofrem uma paralisia flácida progressiva por 1 a 10 dias e podem morrer de insuficiência respiratória e cardíaca.

3.4.1.3 Sintomas

- Botulismo alimentar: Os sintomas aparecem 18 a 24h após a ingestão da toxina, e podem ser gastrintestinais (náusea, vômito, diarreia e dores abdominais) e neurológicos (cefaleia, vertigem e tontura), além de apresentar ptose palpebral, disfagia, disartria, paralisia facial e diplopia;
- Botulismo de feridas: No botulismo de ferida, os nervos que conectam o cérebro à espinha, conhecidos como nervos cranianos, experimentam os primeiros sintomas. Isso então se espalha para o resto do corpo. O período de incubação é de 4 dias a 2 semanas.O quadro clínico é semelhante, entretanto não são esperados sintomas gastrintestinais;
- Botulismo infantil: Há sintomas gastrintestinais (constipação), e neurológicos (disfagia, choro fraco, sucção fraca, hipoatividade e paralisia bilateral descendente), baba excessiva ao alimentar, pálpebra caída, dificuldade respiratória.

Importante considerar que a recuperação da doença não confere imunidade, pois a toxina geralmente não está presente em quantidades grandes o suficiente para ser imunogênica (GERARD et al., 2008).

3.4.1.4 Diagnóstico

Quanto ao diagnóstico, este é realizado a partir da história epidemiológica, da apresentação clínica e da utilização de testes laboratoriais, podendo ser empregadas amostras de sangue (soro), fezes, vômitos, conteúdo gástrico e material de lesão, juntamente com o alimento suspeito (MANGILLI; ANDRADE, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo, experimental, com abordagem quantitativa sobre a qualidade do mel comercializado na cidade de Sousa-PB, por meio de análises microbiológicas. Segundo Gil (1996), a pesquisa experimental objetiva proporciona visão geral e específica, acerca de determinado tema. Richardson (1999), afirma que o método quantitativo se caracteriza pelo emprego em quantificação tanto na modalidade de coleta de dados, quanto no tratamento por meio de técnicas específicas.

4.2 Local de pesquisa

As amostras de mel da pesquisa foram coletadas no município de Sousa-PB, cidade localizada no sertão paraibano, distante 438 quilômetros a oeste de João Pessoa, capital estadual. Ocupa uma área de 738,547 km², dos quais 3,0220 km² estão em perímetro urbano. Sua população, estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2016, é de 69.196 habitantes, sendo o sexto mais populoso do estado, o primeiro de sua microrregião e o segundo da mesorregião.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal da Paraíba (IFPB), Campus Sousa-PB.

4.3 Desenho da pesquisa

O objeto do estudo foi constituído de amostras de mel de abelha - *Apis mellifera* coletadas no comércio formal (em supermercados), e informal, de produtores de mel localizados na zona rural de Sousa/PB.

Foram adquiridas 22 amostras do produto, sendo 09 compradas no comércio formal e 13 no comércio informal. As amostras de mel foram adquiridas pela compra direta nos diferentes estabelecimentos. No comércio formal, o vidro do produto foi escolhido aleatoriamente, adquirindo-se 02 marcas diferentes, assim como também no comércio informal. Quanto ao tipo, foram adquiridas amostras sem capa, ou seja, o mel líquido extraído do favo e envasado em garrafas pet ou vidro. Além de amostras com capa, que é o mel ainda

com o favo. Em seguida, essas amostras foram levadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFPB, onde foram analisadas.

4.4 Procedimentos para análise

4.4.1 Material e meios requeridos para análise

- ⇒ Estufa incubadora regulada a 46 ± 1 °C;
- ⇒ Contador de colônias com fundo escuro;
- ⇒ Placas de Petri estéreis;
- ⇒ Pipetas bacteriológicas esterilizadas de 1,0 ml;
- ⇒ Ágar Triptona Sulfito Cicloserina (TSC) ou Ágar SPS;
- ⇒ Tubos com caldo BHI;
- ⇒ Alça de platina ou níquel – cromo n° 25, montada em cabo de Kolle;
- ⇒ Água oxigenada (H₂O₂) a 3%
- ⇒ Vidrinhos contendo 9,0 ml de solução de água peptonada 0,1%.

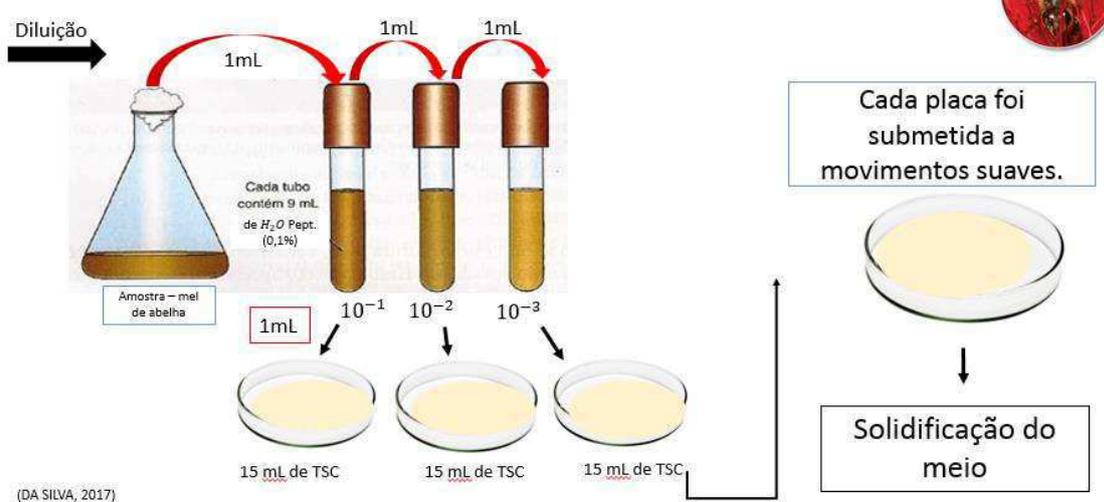
4.4.2 Preparação das amostras

- Foi pesado assepticamente 11g de cada uma das 22 amostras e adicionado 99 ml de água peptonada 0,1%, seguindo a técnica descrita por Da Silva (2017).
- Foram preparadas as diluições necessárias de 10² e 10³, a partir da diluição 10¹, transferindo 1 ml de cada diluição para em seguida verter em vidrinhos contendo 9 ml de solução de água peptonada 0,1% e homogeneizar.

4.4.3 Inoculação

Foram distribuídas alíquotas de 1,0 ml de cada diluição ao centro da placa de Petri estéril, adicionando-se cerca de 15 ml de Agar Triptona Sulfito Cicloserina (TSC) para contagem, previamente fundido e resfriando a 45°C, numa superfície plana. Posteriormente, o inóculo foi misturado com o meio de cultura contido nas placas em movimentos suaves em forma de 8. Em seguida, aguardou-se que as placas secassem e a superfície fosse coberta com uma sobrecarga do mesmo meio, sendo aguardado mais uma vez a sua solidificação (DA SILVA, 2017). Todo o procedimento de inoculação esta esquematizado na figura 05.

Figura 05: Plaqueamento em profundidade para contagem das colônias presuntivas de *Clostridium botulinum*.

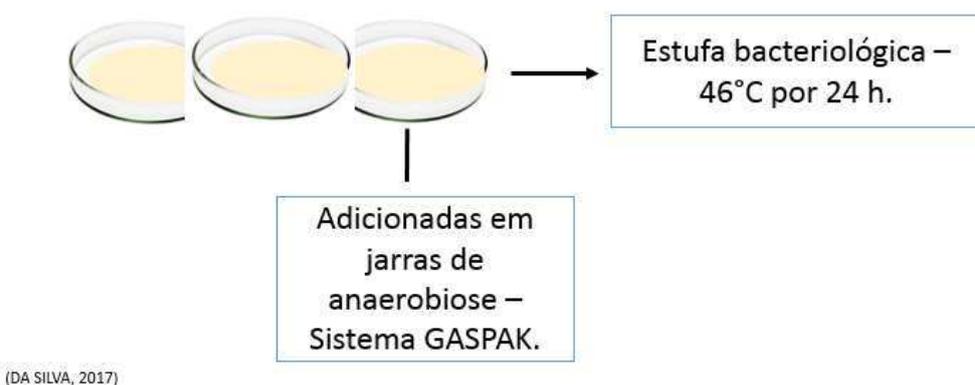


Fonte: Adaptado de Da Silva, 2017.

4.4.4 Incubação

Após a completa solidificação do meio foram incubadas as placas sem inverter a 46°C por 24h em jarras de anaerobiose com o envelope produtor de CO_2 e H_2 (sistema GASPAK) e o papel indicador de anaerobiose, como mostra a figura 06.

Figura 06: Incubação das colônias *C. botulinum*.



Fonte: Adaptado de Da Silva, 2017.

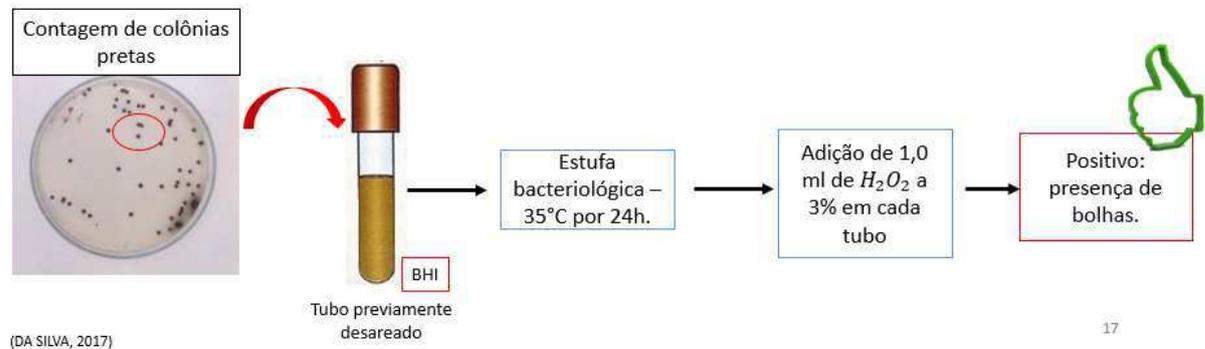
4.4.5 Contagem das colônias presuntivas de *C. botulinum* sulfito redutores

Foram selecionadas placas que apresentasse entre 20 a 200 colônias e apenas as colônias pretas foram contadas, típicas de *C. botulinum* redutores em TSC.

4.4.6 Confirmação das colônias típicas de *C. botulinum*

Foram selecionadas 05 colônias típicas por placas e inoculadas nos tubos contendo BHI previamente desaerado, [isto é, desaerar é colocar os tubos dentro de um Becker com água e deixar em ebulição durante 15 minutos. Depois colocar num Becker contendo gelo, dando um choque térmico]. Em seguida, as colônias foram incubadas a 35°C por 24h. Após a incubação foi adicionado 1,0 ml de H_2O_2 a 3% em cada tubo. Foi considerado como positivo, o teste que apresentou bolhas (DA SILVA, 2017). A contagem e confirmação das colônias de *C. botulinum* estão representadas de forma esquematizada na figura 07.

Figura 07: Contagem e confirmação das colônias de *C. botulinum*.



Fonte: Adaptado de Da Silva, 2017.

4.4.7 Cálculo dos resultados

Foi calculado o número de *clostridium* - sulfito redutores em função do número de colônias negras (típicas) contadas no Ágar TSC, pelo inverso do fator da diluição da inoculação.

4.5 Contagem do *C. botulinum* em placas

No método de contagem de *C. botulinum* em placas foi utilizado o mesmo procedimento usado para *Clostridium* sulfito redutores, incluindo a mais a etapa de confirmação bioquímica.

4.5.1 Confirmação das colônias típicas de *C. botulinum*

Foram selecionadas cinco colônias típicas e transferidas para o meio de Tioglicolato (TGM). Foram incubadas por 18-20h. Em seguida, a cultura obtida foi analisada e inoculada nos meios recomendados pela Instrução Normativa N° 62 de 26.08.2003 ou pelo Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimento:

- Coloração de Gram
- Fermentação tempestuosa
- Prova da motilidade
- Prova da redução de nitrato
- Fermentação da lactose e liquefação e liquefação da gelatina
- Fermentação da rafinose
- Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina
- Teste de redução de nitrato e teste de motilidade
- Teste de fermentação da rafinose esalicina

4.5.2 Cálculo dos resultados

Foi calculado o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias negras típicas, pelo inverso do fator da diluição da inoculação e pela percentagem de colônias confirmadas

4.6 Análise estatística

Para analisar os dados, foi utilizado o pacote Estatístico IBM SPSS Versão 25.0 (MOTTA; OLIVEIRA FILHO, 2009). Já na construção dos gráficos, precisou-se do auxílio da planilha eletrônica Excel.

Foi realizada uma distribuição de frequências e gráficos para descrever a amostra comparando se existe associação quanto à formalidade do comércio e a presença de bactérias, bem como o tipo de produto (com capa- é o mel ainda com o favo e sem capa- mel líquido envasado em garrafa pet ou vidro) aplicando o Teste Exato de Fisher.

Segundo Motta e Oliveira Filho (2009) o teste exato de Fisher serve para testar a hipótese de que duas variáveis, apresentadas em uma tabela 2x2, estão associadas. É indicado quando o tamanho das duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada, ou de valores mais extremos.

As hipóteses para realização do teste foram definidas como:

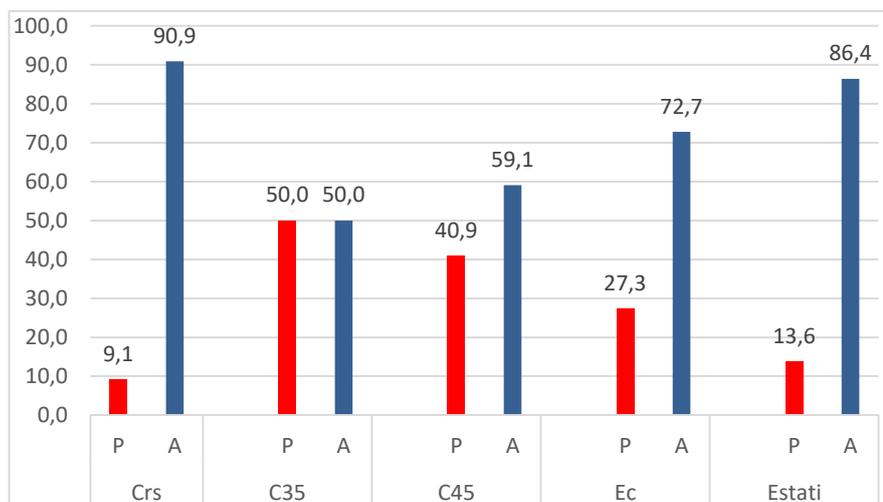
- H0: As proporções são iguais das bactérias segundo o tipo de comercialização do mel de abelha ou tipo de produto.
- H1: As proporções são diferentes segundo o tipo de comercialização do mel de abelha ou tipo de produto.

O nível de significância adotado foi de 0,05. A conclusão do teste é que se rejeita a hipótese se o valor P for $\leq 0,005$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as 22 amostras de mel de abelhas analisadas, foram identificadas as bactérias do tipo *Clostridium* sulfito redutor (Crs) em 9,1% das amostras, Coliformes a 35°C (C35) em 50%, Coliformes a 45°C (C45) teve presença em 40,9%, a *E. coli* (Ec) presente em 27,9% e *Staphylococcus* coagulase positiva (Estati) foi de 13,6% das amostras de mel, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1: Percentual de presença e ausência de bactérias na amostra.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram demonstrados por Ragazani et al (2008), quando analisaram 100 amostras de mel e identificaram o crescimento bacteriano de *Clostridium botulinum* 7% das amostras avaliadas. No presente estudo foi identificado *Clostridium* sulfito redutor (Crs) em 9,1% das amostras. Tais resultados reforçam a importância deste achado para a saúde pública. Em outra pesquisa realizada nos EUA, com amostras de mel não associados a processos de botulismo infantil, descobriu-se que 7,5% continha *Clostridium botulinum*, produtor da toxina A ou B, ou ambos (BOOK, 2007). Mesmo sendo um alimento saudável, rico em vitaminas e sais minerais, deve-se evitar a exposição de crianças menores de 1 ano ao mel de abelhas, em virtude do mesmo ser uma fonte de esporos e uma vez contaminado com estes, apresentar fator de risco para o desenvolvimento do botulismo infantil (BOOK, 2007).

O *Clostridium botulinum* apresenta 08 diferentes tipos antigênicos indicados pelas letras de A G. Entre elas, os tipos A, B, E e, mais raramente, F, são causadoras de doenças nos seres humanos, sendo o tipo A o mais tóxico e o mais frequente no homem, embora o tipo B

seja o mais difundido (BARBOZA et al., 2011). O Botulismo é uma pandemia de modo irregular, cuja principal fonte de contaminação é o alimento ingerido, e ocorre com mais frequência nos meses de verão, quando as temperaturas se encontram entre 22°C e 37°C e a bactéria prolifera nos alimentos (SALGUEIRO; DOMINGUES, 2011).

Ainda de acordo com identificação das amostras de mel pode-se notar que coliformes a 35°C foi encontrado em 50% do total das amostras, sendo que, apresentou contaminação em 38,5% das amostras informais e 66,7% das amostras formais.

O mel de abelha, apesar de ser um produto natural, possui flora microbiana própria, porém com comportamento microbiológico característico. Esta microbiota pode ser dividida em dois grupos: os micro-organismos próprios do mel que, são introduzidos pelas abelhas na colmeia, com o néctar, pólen ou melato, ou durante a operação de limpeza por elas realizada; e os micro-organismos considerados ocasionais ou acidentais, introduzidos de forma fortuita por falta de higiene na manipulação ou durante o processo de extração e beneficiamento do mel (GROSSO et al., 2002).

O grupo dos coliformes totais é constituído por bacilos gram-negativos, que não apresentam capacidade de produzir esporos e podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Além disso, os mesmos conseguem se proliferar em ambientes contendo presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície e também possuem como característica marcante a capacidade de fermentar lactose com produção de gás a 35°C em 24-48 h. São enterobactérias comumente encontradas no trato intestinal tanto de humanos como de alguns animais. A contaminação por essas bactérias pode causar diarreias e infecção urinária (SANTOS, RAGEL E AZEREDO, 2010).

Um aspecto importante da produção do mel é a manutenção da qualidade higiênica do produto. A qualidade deste alimento está relacionada ao tipo de frasco utilizado para o envase; condições de estocagem do produto; condições higiênicas da coleta e hábitos higiênicos das abelhas, já que, a maioria das melíponas e a *Apis mellifera scutella* costumam visitar excrementos humanos, de animais e água poluída (OLIVEIRA et al., 2005).

O processo de manipulação dos alimentos é uma das principais causas de contaminação, pois se não for realizada uma higienização adequada das mãos dos manipuladores, das bancadas e dos utensílios que serão utilizados, o alimento irá se contaminar assim que entrar em contato com estas superfícies (RUBIN et al., 2012).

O manipulador de alimentos é um elemento incisivo no processo de disseminação dessas bactérias. Os autores mostraram que doenças ocasionadas pela falta de higiene dos manipuladores de alimentos acontecem, principalmente, em estabelecimentos clandestinos ou

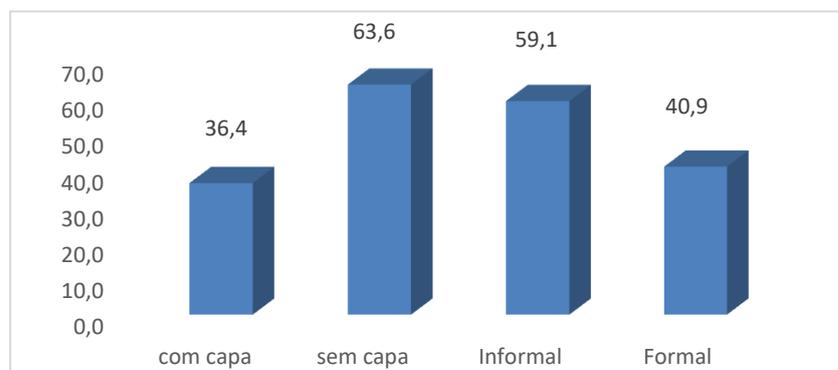
estabelecimentos que nunca tiveram treinamentos sobre boas práticas de manipulação de alimentos (FERREIRA, 2006).

A falta de informação dos manipuladores de alimentos, em relação aos procedimentos adequados durante a higienização e manipulação, é de grande relevância, pois na maioria das vezes a manipulação incorreta não está associada ao descuido durante a preparação, mas com a falta de conhecimento dos procedimentos adequados (LEAL, 2010).

Os achados para coliformes totais e termotolerantes no presente estudo corroboram com os encontrados por Matuella e Torres (2000) em um estudo realizado no município de Chapecó – SC, no qual pesquisaram a qualidade microbiológica do mel produzido nesta região e constataram que 46% das amostras estavam contaminadas por estes dois tipos de coliformes.

Além das identificações dos tipos de bactérias presentes nas amostras de mel, foi avaliado quanto sua presença nas amostras obtidas em comércio formal e informal. Observou-se que 40,9% dessas amostras pertenciam ao mercado formal e 59,1% mercado informal. Quanto ao tipo de produto, observa-se que 63,9% da amostra resultou em produto sem capa e 36,4% produto com capa, como está ilustrado no gráfico 2. A maior quantidade de bactérias presentes nas amostras informais pode ser justificada pelo fato de terem sido coletadas amostras de feiras livres, que apresentavam características de falta de higiene na coleta e armazenamento, acusando sujidade, além de estarem envasados em embalagens impróprias para este produto, como vasilhames reutilizados. A utilização de potes reutilizados, impróprios para o acondicionamento do mel, torna-se perigoso devido à contaminação cruzada do produto por micro-organismos patogênicos (LIEVEN et al., 2009).

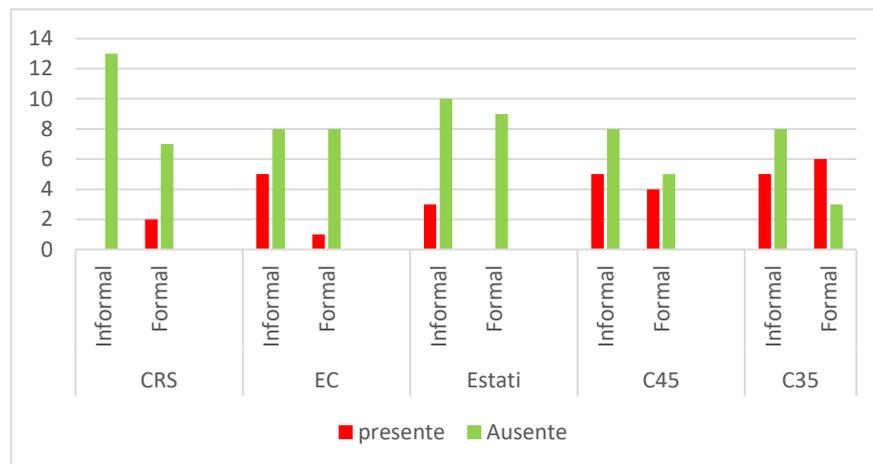
Gráfico 2: Percentual do tipo e da formalidade do produto.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Ainda pode-se observar que, das amostras formais, a bactéria *Clostridium* sulfito redutor (Crs) foi encontrada em 22% das amostras, a bactéria *Escherichia coli* (Ec) foi encontrada em 11,1%, coliformes a 35°C (C35) em 66,7%, coliformes a 45°C (C45) em 44,4% e *Staphylococcus* (Estati) não foi identificada em nenhuma amostra formal. Enquanto que nas amostras informais, houve presença de 38,5% de *E. coli*, 23,2% de *Staphylococcus* (Estati), 38,5% de coliformes a 35°C (C35), 38,5% de coliformes a 45°C (C45) e *Clostridium* sulfito redutor (Crs) não foi identificada em amostras informais, como mostra o gráfico 3. Para complementar esse resultado, foi realizado o teste Exato de Fisher para investigar se há associação com a presença da bactéria e o tipo de mercado (formal ou informal) que o mel está sendo comercializado (Quadro 1). Observou-se que nenhuma bactéria está associada ao comércio formal ou informal do mel de abelha. Em outras palavras, ao nível de significância de 5%, a presença de bactérias no mel de abelha não depende da formalidade do comércio.

Gráfico 3: Percentual de presença e ausência de bactérias na amostra segundo a sua formalidade.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

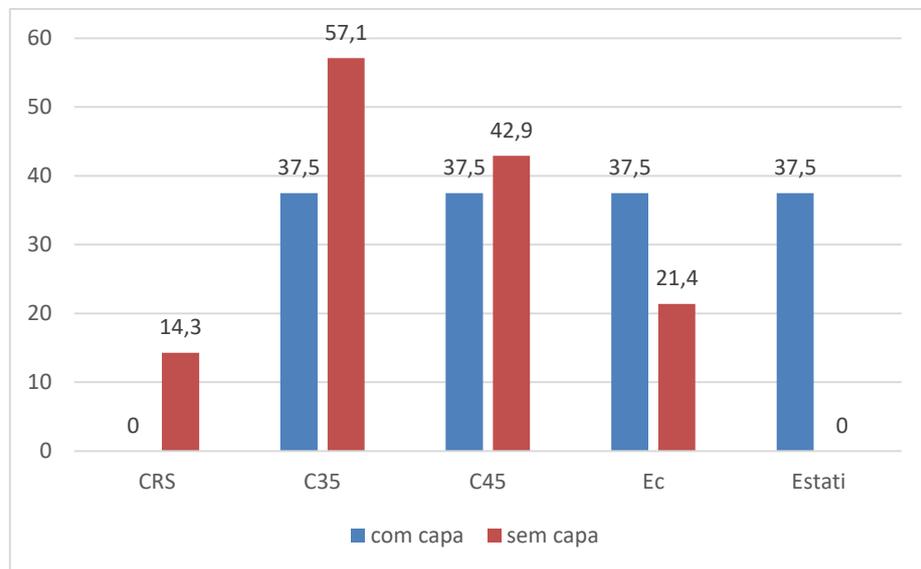
Quadro 1: Resultado do teste de Fisher para investigar a associação do tipo de mercado e a presença de bactérias na amostra.

Tipo de bactéria x Tipo de formalização do mel de abelha	Valor de p	Conclusão do teste
Crs	0,156	Não há associação/ Aceita H0
C35	0,387	Não há associação/ Aceita H0
C45	0,568	Não há associação/ Aceita H0
Ec	0,333	Não há associação/ Aceita H0
Estati	0,240	Não há associação/ Aceita H0

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

A presença de bactérias no mel de abelha com capa e sem capa também foi analisado. O *Clostridium* sulfito redutor (Crs) não houve registro nas amostras com capa, já para coliformes a 35°C, coliformes a 45°C (C45), *E. coli* e *Staphylococcus* (Estati) houve presença da mesma quantidade nas amostras, correspondendo a 37,5% para cada. Já nas amostras de mel sem capa, foi encontrado 14,3% das amostras para *Clostridium* sulfito redutor (Crs), já para coliformes a 35°C (C35) houve registro em 57,1% das amostras, para coliformes a 45°C (C45) correspondeu a 42,9%, 21,4% para *E. coli* (Ec) e para *Staphylococcus* (Estati) não apresentou registro nas amostras sem capa.

Gráfico 4: Percentual de presença e ausência de bactérias na amostra segundo o tipo de produto



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

De acordo com o que foi visto no gráfico 4 e em complementariedade com os resultados do quadro 2, observou-se que a presença da bactéria *Staphylococcus* (Estati) está associada com fato do mel apresentar a capa. As demais bactérias nesse estudo não apresentaram associação neste contexto. A análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul apontam que, no período de 1987 a 2002, a *Salmonella* spp e o *Staphylococcus aureus* foram os principais agentes etiológicos responsáveis por enteroinfecção (Costalunga & Tondo 2002). O *Staphylococcus aureus* é um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo, coagulase-positivo, catalase-positivo e oxidase-negativo. Algumas cepas produzem uma enterotoxina

termoestável que pode ser classificada em A, B, C1, C2, C3, D e E. (GERMANO; GERMANO, 2001).

As bactérias que fazem parte do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva encontram-se largamente distribuídas no meio ambiente, cujo habitat são a pele, as glândulas e membranas mucosas, e o trato gastrintestinal do homem e de animais. A presença dessa bactéria nos alimentos, sugere uma provável participação de manipuladores portadores desse micro-organismo (FRANCO; LANDGRAF, 1997). O período de incubação médio da intoxicação estafilocócica é de 2 a 4 horas. Os sintomas são geralmente agudos e se caracterizam por náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. (GERMANO; GERMANO, 2001).

Quadro 2: Resultado do teste de Fisher para investigar a associação do tipo de mercado e a presença de bactérias na amostra.

Tipo de bactéria x Tipo de produto do mel de abelha	Valor de <i>p</i>	Conclusão do teste
Crs	0,515	Não há associação/ Aceita H0
C35	0,659	Não há associação/ Aceita H0
C45	0,589	Não há associação/ Aceita H0
Ec	0,624	Não há associação/ Aceita H0
Estatí	0,036	Há associação/ Rejeita H0

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Diante da quantidade de amostras analisadas no presente estudo, as mensurações microbianas permitem avaliar higienicamente um produto, no que se refere à aplicação de boas práticas de manipulação em toda a sua cadeia de produção e exposição ao consumo. Entretanto, a avaliação da presença/ausência ou de números baixos desses micro-organismos, não é suficiente e não está diretamente relacionada com conclusões sobre o risco do consumidor. Indicadores higiênicos estão relacionados com qualidade do produto que vai desde o processamento até a possível deterioração deste (SILVA et al., 2017; SEBRAE, 2009). Segundo Mora (2010), o parâmetro microbiológico é suficiente para atestar a qualidade do mel, e a cada dia que passa a busca por essa qualidade torna-se cada vez mais presente, visto que há uma necessidade de se garantir a isenção de contaminantes bem como uma maior estabilidade e duração desse produto nos pontos de venda.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- Presença de *Clostridium* sulfito redutor (CrS) em 9,1% das amostras analisadas e não foi identificada em amostras informais. Porém, a presença de bactérias no mel de abelha não depende da formalidade do comércio.
- Presença de coliformes em 38,5% das amostras informais e 66,7% das amostras formais.
- Presença da bactéria *Staphylococcus* está associada com fato do mel apresentar a capa.
- De maneira geral, os apicultores e os comerciantes de mel não estão obedecendo a regulamentação estabelecida, de forma que não estão seguindo as recomendações de Boas Práticas de Fabricação para que haja a garantia da qualidade do mel produzido e processado.

7 REFERÊNCIAS

- AL-WAILI, N. SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. **The Scientific World Journal**, v.14, p.1-9, 2012.
- ARAÚJO, J.P. Desmame precoce e suas causas: experiência na atenção básica de campina grande-pb. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, p. 146-155, 2013.
- AZEREDO, L. C. ET AL. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of diferente floral origins. **Food Chemistry**. v.80, p.249-254, 2003.
- AAVIANDRA. **Paciente apresentando midríase relacionada ao botulismo**. 2010. Disponível em: < <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Botulism1and2.JPG>> Acesso em 09 de ago. 2018.
- BARBOZA, M. M. O et al. Surto familiar de botulismo no Estado do Ceará: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 400-402, 2011.
- BROOK, I. Infant botulism. **Journal of Perinatology**, v. 27, p. 175–180, 2007.
- BERTOLDI, C.R.C. Meliponicultura uma alternativa sustentável. **Embrapa**. Agosto de 2008.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Defesa Animal. **Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**.2000.
- _____. **Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001**.
- BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Apicultura**. Instituto Centro de Ensino Tecnológico. 2 ed. Fortaleza: Edição Demócrito rocha: Ministério da Ciência e Tecnologia, 56, p. 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, 2000, out, 23, Seção 1, p.16-17.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346, 2002.

CODEX. Codex Alimentarius standard for honey 12-1981. Revised Codex standard for honey. **Standards and standard methods**, v. 11, 2001.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L. **Apicultura: Manejo e produtos**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 191p. 2002.

CRANE, E. **The Archeology of Beekeeping**. Londres, Gerald Duckworth and Co., Ltda, 1983.

DA SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água. 5 ed. São Paulo. Blucher, 2017.

DICKERSON, T.J.; JANDA K.D. The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. **ACS Chemical Biology**, v. 6, p. 359-69, 2006.

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.

FRANCO, B. D. G. M. et al. **Microbiologia dos Alimentos**. v.2, Editora Atheneu, p. 139-145, São Paulo, 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 199.182. 2007.

FREAN, J. ET AL. Fatal type A botulism in South Africa, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London, v.98, p. 290-295, 2004.

FREITAS, D.G.F.; KHAN, A.S.; SILVA, L.M.R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellífera*) no Ceará. **Rev. Econ. Sociol. Rural.**, v.42, n.1, p.171-188, 2004.

FREAK, M. **Abelha *Apis mellifera***. 2007. Disponível em <
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apis_mellifera_carnica_worker_hive_entrance_2.jp

g> Acesso em 09 de ago. de 2018.

FERREIRA, F. S. Consumo de alimentos impróprios por crianças menores de dois anos e suas possíveis consequências. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, p. 87-98, 2015.

FERREIRA, S. M. S. Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores [dissertação]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.

FIGUEIREDO M. A. A.; DIAS, J. LUCENA, R. Considerações acerca de dois casos de botulismo ocorridos no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 289-291, 2006.

GEORGE, W. L. Intoxicación e infección por clostridios. In: **Tratado de Infecciones en Pediatría**. Mc Graw-Hill, 3ª ed. n.1, p.1211-1217, 1995.

GERARD J. TORTORA, ET AL. Microbiologia. 8º ed. Editora Artmed, p. 621-623. 2007.

GIL, Antônio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 1996.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GÓIS, G.C.; RODRIGUES, A.E.; LIMA, C.A.B.; SILVA, L.T. Composição do mel de *Apis mellifera*: Requisitos de qualidade. **Acta Veterinária Brasilica**, v.7, n.2: p.137- 147, 2013.

GROSSO, G. S.; ROJAS, C. A. H.; MORENO, G. I.; LUNA, A. Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. **Apicultura**, Tolima-Espanã, p.1-7, 2002.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ET AL. Abelhas e desenvolvimento rural no Brasil. **Mensagem Doce**, n.80, mar. 2005.

KOOKABURRA. **Esporos de *Clostridium botulinum***. 2005. Disponível em: <
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clostridium_botulinum.jpg> Acesso em 09 de ago. de 2018.

KERR, W.E; CARVALHO, G.; SILVA, A.C. e Assis, M.G.P. **Aspectos pouco mencionados**

da biodiversidade amazônica . Mensagem Doce, n. 80, 2005.

KETCHAM, E.M.; GOMES, H.F. Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. **Air Medical Journal**, v.22, n.5, p.06-11, 2003.

LIMA, C.C.R.D.; CARVALHO NETA, A.V. **Lesões características do botulismo de feridas**. 2015. Disponível em < <http://www.informativoregional.com.br/destaque/botulismo-campo-ou-em-casa/>> Acesso em 09 ago. de 2018.

LOPES, A.C.S.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, J.T.; PAIVA, M.H.R.S.. **Adesão às precauções do atendimento pré-hospitalar móvel de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, n.6, 2008.

LEAL, D. Crescimento da alimentação fora do domicílio. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 17, p. 123-32, 2010.

MATUELLA, M.; TORRES, V. S. Teste da qualidade microbiológica do mel produzido nos arredores do lixão do município de Chapecó-SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, p. 73-77, 2000.

MOURA, S.G. de. Boas práticas apícolas e a qualidade do mel das abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. [tese]. Piauí: Universidade Federal do Piauí; 2010.

MANGILLI, L. D.; ANDRADE, C. R. F. de. Botulismo e disfagia. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, Barueri (SP), v. 19, n. 2, p. 215-222, 2007.

MOTTA, V.; OLIVEIRA FILHO, P. F. **SPSS - Análise de dados biomédicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

MUGNOL, K.C.U. **Botulismo infantil, um estudo preliminar**. TCC Especialização em Biotecnologia. Universidade de Mogi das Cruzes, 1997.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 3 d. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5 ed. São Paulo: Blucher, 2010.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Ed.

Nogueirapis, 1997.

OLINDA, R. G.; GOIS, R. C. S.; SILVA, R. O. S. S.; CALDAS, R. P.; LOBATO, F. C. F.; BATISTA, J. S. Surto de botulismo tipo C em aves domésticas no semiárido do Nordeste, Brasil. **Revista brasileira de ciência veterinária**, v. 22, p. 157-159, 2015.

OLIVEIRA, G. E.; NASCIMENTO, R. A.; COSTA, P. M. C.; NETO, M. V. Qualidade microbiológica do mel de Tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) produzido no Estado do Maranhão. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, p.92-99, 2005.

PEREIRA, L.L. **Análise físico-química de amostras de méis de *Apis melífera* e Meliponíneos**. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

PEREIRA, R.A., ET AL. O Rio Grande do Norte já analisa o seu mel para exportação. **Mensagem doce**. v.106, p.17-25, 2010.

PÉREZ: R.A; IGLESIAS, M. T; PUEYO, E; GONZALEZ, M; & LORENZO, C. DE Aminoacid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p 360 – 364, 2007.

PINILLOS, M A. et al. Intoxicación por alimentos plantas y setas. **Anales del sistema Sanitário de Navarra**. Pamplona . v. 26, suppl. 1, p. 71 – 76, 2003.

POÇAS, J. Doenças infecciosas com compromisso neurológico ligado à acção de toxinas bacterianas. **O Médico**. 1990; 123(1994).

PEREIRA, P.J.M.F. **Propriedades antibacterianas do mel**. [monografia]. Porto: Universidade do Porto; 2007.

RAGAZANI, A. V. F. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros Estados brasileiros. **Ciência Rural**, v.38, p. 396-399, 2008.

RUBIN, F. H.; CERBARO, K.; NAUMANN, V.; BRUNELLI, A. V.; COSER, J. Avaliação microbiológica das mãos, utensílios, e superfície dos manipuladores de alimentos em entidades do banco de alimentos de Cruz Alta. In: Anais do 17º Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 15ª Mostra de Iniciação Científica e 10º Mostra de Extensão;

2012 nov 6-8; Cruz Alta, Bahia. Cruz Alta: Unicruz; 2012. 4 p.

RACOWSKI, I.; SILVAS, F.P.C.; TAKUSHI, D.T.T.; SILVA, D.W.G.; MIRANDA, P.S. Ação Antimicrobiana do Mel em Leite Fermentado. **Revista Analytica**, n. 30, p. 106-114, 2007.

RADOSTITS, O.M. ET AL. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RICHARDSON, Roberto Jarry. **Pesquisa Social: métodos e técnicas**. São Paulo: Atlas, 1999.

RODRIGUEZ, B.A.; MENDOZA, S.; ITURRIGA, M.H.; CASTANO-TOSTADO, E. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. **Journal of Food Science**, v. 77, p. C121-C127, 2012.

SANTOS, A.L. **Identificação da flora microbiana em colmeias de Meliponina**.

Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

SERRANO, S. Chemical and physical parameters of andalusian honey: Classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. **Food Chemistry**, v.87, n.4, p.619-625, 2004.

SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.1-26, 1996.

SARAIVA, M.; CUNHA, I. C.; BONITO, C. C.; PENA, C.; TOSCANO, M. M.; LOPES, T. T.; SOUSA, I.; CALHAU, M. A. O primeiro caso de botulismo infantil em Portugal.

Instituto Nacional de Saúde, n. 06, 2013.

SEBRAE Nacional - PAS Indústria. Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura. Brasília: SEBRAE/NA, 2009. PAS Mel 48 p.: Tab

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

TRIPOLI, E.C.B.; LIMA, C.P. Correlação das análises de méis da cidade de Curitiba com a atividade antibacteriana. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.11, p.116- 127, 2014.

TEIXEIRA, L.V.;VERISSÍMO, S.A.O. Mel e derivados: a inspeção dos produtos apícolas é responsabilidade do médico veterinário: uma visão geral sobre os produtos apícolas e sua inspeção. SIMPOSIO COMEMORATIVO DE INSPENÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.CENTENÁRIO. Anais.... 2015.

TERRAB, A. ET AL. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. **Food Chemistry**, v.88, n.4, p.537-542, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8º ed. São Paulo, Editora Atheneu, pg 397 a 403. São Paulo – SP, 2008.

VIDAL, R.; FREGOSI, E.V. **Mel: características, análises físico-químicas, adulteração e transformação**. Barretos: Instituto Tecnológico Científico “Roberto Rios”. 2004. 95p.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. 1ª ed. Guaíba – RS: Editora Agropecuária LTDA. 424p. 2000.

YUCEL, Y.; SULTANOGLU, P. Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food Chemistry**, vol. 140, p. 231-237, 2013.