

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS EM  
GARRAFAS INDIVIDUAIS COMERCIALIZADAS EM  
ARARAQUARA-SP.**

Maria Fernanda Falcone Dias

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Farache Filho

ARARAQUARA-SP  
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS EM  
GARRAFAS INDIVIDUAIS COMERCIALIZADAS EM  
ARARAQUARA-SP.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos e Nutrição – Área de Ciências dos Alimentos, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Maria Fernanda Falcone Dias

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Farache Filho

ARARAQUARA-SP  
2008

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

D541q Dias, Maria Fernanda Falcone  
Qualidade microbiológica de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara-SP. / Maria Fernanda Falcone Dias. – Araraquara, 2008.  
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição  
Orientador: Adalberto Farache Filho

1.Água mineral. 2.Contaminação bacteriológica. 3.Coliformes. I.Farache Filho, Adalberto, orient. II. Título.

**CDD: 628.161**

**CAPES: 50700006**

## **Comissão examinadora**

---

Prof. Dr. Adalberto Farache Filho  
(orientador)

---

Profa. Dra. Maria da Penha Longo Mortati Catanozi  
(membro)

---

Prof. Dr. Wellington Cyro de Almeida Leite  
(orientador)

**Araraquara, 25 de Janeiro de 2008.**

## **DEDICO**

A minha mãe, pelo incentivo e determinação em tornar possíveis meus ideais.

Aos meus avôs e avós pelo amor e confiança.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe Maria Laura, pelo incentivo na minha realização profissional e pessoal

Ao Prof. Dr. Adalberto Farache Filho, pela orientação, incentivo, apoio, e amizade.

Aos professores integrantes da banca do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Maria da Penha Longo Mortati Catanozi e Prof. Dr. Wellington Cyro de Almeida Leite pelas sugestões e considerações que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Joselma, técnica do laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela paciência, atenção e amizade.

Aos meus amigos, “grandes irmãos”, que me incentivam a seguir a carreira acadêmica e científica e estão sempre presentes na minha vida e alojados no meu coração.

Aos meus sobrinhos, pelo simples sorriso que torna minha vida mais feliz

A minha irmã, pelo carinho e incentivo

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp, pela paciência e atenção dedicadas

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp, pelo auxílio e colaboração durante a fase de elaboração da dissertação.

Por fim e na verdade por todas as coisas, a “Esse Grande Deus e Pai” que me supriu, supre e suprirá em todos os meus anseios. Obrigado!

"Água que nasce na fonte  
Serena do mundo  
E que abre um  
Profundo grotão  
Água que faz inocente  
Riacho e deságua  
Na corrente do ribeirão...

...Águas que movem moinhos  
São as mesmas águas  
Que encharcam o chão  
E sempre voltam humildes  
Pro fundo da terra  
Pro fundo da terra..."

Guilherme Arantes

## RESUMO

Com a dúvida sobre a qualidade da água de abastecimento público, o cidadão passou a utilizar a água mineral com maior intensidade. Para atender a esta demanda as indústrias aumentaram a produção, novas empresas surgiram e também os falsários. Assim, é necessário conhecer-se a qualidade esperada e paga pelo consumidor nesse produto, realmente existe. O objetivo desta pesquisa foi avaliar aspectos de qualidade microbiológica em amostras de água mineral natural, não carbonatada, em garrafas individuais de 330mL a 600mL, das diversas marcas comercializadas em supermercados na cidade de Araraquara-SP. Foram utilizadas sessenta e nove amostras provenientes de dezessete marcas. As amostras foram adquiridas aleatoriamente, em épocas e estabelecimentos diferentes para que fossem originadas de lotes diversos. Para análise de coliformes totais e coliformes fecais/*E. coli* utilizou-se a técnica de substratos cromogênicos; para enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizadas as técnicas de tubos múltiplos específicas; para contagem de bactérias heterotróficas, foi utilizada a técnica de cultivo em profundidade. Todas as amostras de todas as marcas (100%) apresentaram ausência de coliformes fecais/*E.coli*, duas amostras (2,9%) de uma marca (5,9%) apresentaram contaminação por coliformes totais, duas amostras (2,9%), de duas marcas (11,8%) apresentaram contaminação por enterococos, três amostras (4,3%) de duas marcas (11,8%) apresentaram *Pseudomonas aeruginosa* e quarenta amostras (58%) de doze marcas (70,6%) apresentaram contagens acima de 500 UFC/mL para bactérias heterotróficas. Verificou-se que, das sessenta e nove amostras analisadas (100%) apenas seis (8,7%) apresentaram-se contaminadas com um ou mais dos indicadores especificados pela legislação brasileira para águas minerais. Entretanto, considerando os padrões para água mineral e o padrão para bactérias heterotróficas estabelecido pela legislação para água de consumo humano, quarenta amostras (58%) de doze marcas (70,6%) apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões.

Palavras chave: Água mineral, contaminação bacteriana, coliformes.



## ABSTRACT

With the doubt on the water quality in public supplying, the citizen started to use the mineral water with larger intensity. For attend this demand the factory had increased the production, new companies had appeared and also the falsifiers. Thus, it's necessary to know if the quality waited and paid for the consumer in this product, really exists. The objective of the research was to evaluate aspects of microbiological quality in natural mineral water samples, not carbonated, in individual bottles of 330mL to 600mL, of the diverse marks commercialized in supermarkets in the city of Araraquara-SP. Sixty nine samples proceeding from seventeen marks had been used. The samples had been acquired aleatory, at different times and establishments for that they were originated from diverse lots. For analysis of fecal coliform/E. coli and total used it cromogenic substrate technique; for enterococcus and for *Pseudomonas aeruginosa* was used the technique of multiple tube specific; for counting of heterotrophic bacteria, was used the technique of culture in depth. All the samples of all the marks (100%) had presented absence for fecal coliform/E.coli., two samples (2.9%) of one mark (5.9%) had presented contamination for total coliform, two samples (2.9%), of two marks (11.8%) had presented contamination for enterococcus, three samples (4.3%) of two marks (11.8%) had presented *Pseudomonas aeruginosa*, and forty samples (58%) of twelve marks (70.6%) had presented counting above of 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. It was verified that, of the sixty nine analyzed samples (100%), only six (8.7%) had been presented contaminated with one or more than the pointers specified for the Brazilian legislation for mineral waters used in this research. However, considering the standards for mineral water and the standard for heterotrophic bacteria established by the legislation for water of human consumption, forty samples (58%) of twelve marks (70.6%) had been presented in disagreement with one or more standards.

Key words: Mineral water, bacterial contamination, coliforms.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	NMP/mL de coliformes totais, coliformes fecais/ <i>E.coli</i> , enterococos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostras de água mineral em garrafas de 330 à 600mL, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	41
Tabela 2.	Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para coliformes fecais, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	43
Tabela 3.	Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para coliformes totais, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	44
Tabela 4.	Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para enterococos, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	45
Tabela 5.	Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	46
Tabela 6.	Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para bactérias heterotróficas, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de Jul. a Dez. de 2006 .....	48
ANEXO A.	Tabela dos índices de NMP e limites de 95% de confiança para várias combinações de resultados positivos e negativos quando dez alíquotas de 10mL são usadas .....	65

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	Água e doenças .....	15
3.2	A água mineral .....	18
3.3	Qualidade microbiológica das águas minerais .....	20
3.4	Microbiota autóctone .....	21
3.5	Fatores que influenciam a multiplicação das bactérias em água mineral ....	22
3.6	Microbiota Alóctone .....	25
3.7	Microrganismos indicadores .....	26
3.8	Microrganismos monitorados na água mineral .....	27
3.8.1	<b>Coliformes</b> .....	27
3.8.2	<b>Enterococos</b> .....	29
3.8.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
3.8.4	<b>Bactérias heterotróficas</b> .....	31
3.9	Ocorrência de microrganismos indicadores em águas minerais .....	33
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	Amostragem .....	36
4.2	Análises microbiológicas .....	36
4.2.1	<b>Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes fecais/<i>E. coli</i></b> .....	36
4.2.2	<b>Determinação do número mais provável (NMP) de enterococos</b> .....	37
4.2.3	<b>Determinação do número mais provável (NMP) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	38
4.2.4	<b>Contagem de bactérias heterotróficas</b> .....	38
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1	<b>Coliformes fecais/<i>E. coli</i></b> .....	43
5.2	<b>Coliformes totais</b> .....	44
5.3	<b>Enterococos</b> .....	45
5.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46

5.5	<b>Bactérias heterotróficas</b> .....	48
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	54
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
	<b>ANEXOS</b> .....	64
	<b>ANEXO A</b> .....	65
	<b>ANEXO B</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A água constitui um dos elementos fundamentais para a existência do ser humano. Em seu estado natural é um dos componentes de maior pureza que se conhece e atualmente torna-se difícil encontrar uma fonte de água doce que não tenha suas características alteradas (NASCIMENTO et al., 2000).

O novo século traz crise de falta de água e a sociedade precisa discutir o futuro da água e da vida. A abundância do elemento líquido causa uma falsa sensação de recurso inesgotável, mas a água é um recurso finito e não tão abundante quanto possa parecer (MACÊDO, 2001).

A utilização dos recursos de água doce é fonte de numerosos problemas, cuja resolução necessita uma profunda reflexão ética. A questão é saber se o planeta pode suportar o ritmo atual de exploração dos recursos de água doce. É preciso ressaltar a questão da equidade de acesso aos recursos hídricos, bem como a salubridade destes recursos que são, frequentemente, degradados por diversas formas de poluição, tanto em países de pouca oferta quanto naqueles abundantes em água (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA-UNESCO, 2001).

Considerando que 97,5% da água existente no planeta é salgada (oceanos e mares) e 2,493% da água doce está em geleiras ou regiões subterrâneas de difícil acesso, só resta 0,007% da água doce disponível nos rios, lagos e atmosfera. O Brasil detém 11,6% da água doce superficial do mundo; desse total, 70% está na região Amazônica com 7% da população brasileira enquanto os 30% restantes estão distribuídos desigualmente para atender a 93% da população (UNIVERSIDADE DA ÁGUA, 2004).

O Brasil possui a vantagem de dispor de abundantes recursos hídricos, porém possui também a tendência desvantajosa de desperdiçá-los (MORAES; JORDÃO, 2002).

Com o processo de urbanização acelerada a partir da segunda metade do século XX, a tal ponto que mais da metade da população mundial vive atualmente em aglomerações urbanas, técnicas foram sendo desenvolvidas tornando possível o fornecimento de água potável em grandes volumes para atender a milhões de habitantes que se concentram nas médias e grandes cidades espalhadas por todo o globo terrestre. No entanto, a água potável não está atualmente disponível para todas as pessoas, em muitas sociedades (PONTES; SCHRAMM, 2004).

No ano 2000, em todo o mundo 1,1 bilhões de pessoas não tinham acesso a um adequado abastecimento de água (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000a). Nos países da América Latina e Caribe, existiam 60 milhões de pessoas sem abastecimento de água (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006a). No Brasil, segundo Macêdo (2001) 54 milhões de habitantes não tinham acesso à rede de distribuição de água.

A preocupação com a degradação e a conseqüente escassez dos recursos hídricos deixou de ser somente uma bandeira de luta de ambientalistas fervorosos, passando a representar um sério problema de saúde pública (MORAES; JORDÃO, 2002).

A água poluída é um importante veículo na transmissão de grande variedade de doenças, motivo pelo qual a preservação da sua qualidade microbiológica é um fator indispensável para a saúde pública (GIOMBELLI et al., 1998).

Além do aspecto qualitativo é indispensável que o homem disponha de água nas quantidades necessárias aos seus diversos usos. A escassez de água tem reflexos sanitários, pois influirá na higiene pessoal, dos alimentos e do ambiente, podendo trazer danos à saúde humana (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 1999).

Os sistemas de saneamento básico adequado e água tratada podem reduzir em 20% a 80% a incidência de doenças infecciosas, inibindo a sua geração e interrompendo a sua transmissão (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA-UNESCO, 2001; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006b).

A água tem influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento do ser humano. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) e seus países membros, “todas as pessoas, em quaisquer estágios de desenvolvimento e condições sócio-econômicas têm o direito de ter acesso a um suprimento adequado de água potável e segura”. “Segura”, neste contexto, refere-se a uma oferta de água que não represente um risco significativo à saúde, que tenha quantidade suficiente para atender a todas as necessidades domésticas, que seja disponível continuamente e que tenha um custo acessível. Essas condições podem ser resumidas em cinco palavras-chave: qualidade, quantidade, continuidade, cobertura e custo (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006b).

A qualidade do sistema de distribuição de água refletida na qualidade da água distribuída para a população, determina a confiabilidade no sistema e na segurança do consumidor em relação ao produto que recebe em casa. Quando isso não ocorre a população passa a procurar alternativas para consumir água segura (MACÊDO, 2001).

Com a dúvida sobre a qualidade da água de abastecimento público, o cidadão passou a utilizar a água mineral com maior intensidade. Para atender a esse aumento na demanda as indústrias aumentaram a produção; novas empresas surgiram e também os falsários. Assim, é necessário conhecer se a qualidade esperada e paga pelo consumidor nesse produto, realmente existe (SABIONI; SILVA, 2006).

Apesar de Araraquara ter um sistema de abastecimento público de água de boa qualidade, observa-se também na cidade o aumento do consumo de água mineral e do número de estabelecimentos que comercializam o produto, bem como a frequência de consumidores portando pequenas garrafas de água mineral para consumo individual, principalmente no período de verão. Diante disso e a partir de estudos anteriores realizados no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP com águas minerais em garrafas com volumes maiores, optou-se por dar continuidade à pesquisa da qualidade de águas minerais em garrafas com volumes menores geralmente utilizadas individualmente.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar aspectos de qualidade microbiológica de amostras de água mineral natural, não carbonatada em garrafas individuais de 330mL a 600mL, das diversas marcas comercializadas em supermercados na cidade de Araraquara-SP.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Água e doenças

A água é essencial para a vida, mas também pode se tornar um importante veículo de muitos parasitas, doenças infecciosas e responsável pela crescente frequência de doenças crônicas (FRANCO; CANTUSIO NETO, 2002).

Tanto os agentes biológicos como os poluentes químicos e radioativos podem alcançar o ser humano através da ingestão direta da água, pelo contato com a pele ou mucosas ou através do seu uso em irrigação ou na preparação de alimentos. São as chamadas “doenças de veiculação hídrica” em que a água serve como meio de transporte de agentes patogênicos eliminados pelo ser humano por meio dos dejetos, ou de poluentes químicos e radioativos presentes nos esgotos industriais (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 1999).

É importante ressaltar a diferença entre doenças de transmissão hídrica e doenças de origem hídrica. A primeira é aquela em que a água atua como veículo do agente infeccioso e a segunda é aquela causada por substâncias químicas presentes na água em concentrações inadequadas (MACÊDO, 2001). São exemplos de doenças de origem hídrica a fluorose, devida ao excesso de flúor e o saturnismo causado pelo chumbo. Algumas substâncias dão à água propriedades laxantes, como sulfatos, ou a tornam tóxicas como o zinco, arsênio, e cianetos entre outras (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 1999). Dentre as principais doenças de transmissão hídrica pode-se citar a febre tifóide, cólera, salmonelose, shigelose e outras gastroenterites, poliomielite, hepatite A, verminoses, amebíase e giardíase (LESER et al., 1988).

As principais fontes de contaminação dos recursos hídricos são: esgotos domésticos sem tratamento lançados em rios e lagos; aterros sanitários que afetam os lençóis freáticos; defensivos agrícolas que escoam com a chuva e são arrastados para os rios e lagos e infiltram no solo; garimpos que jogam produtos químicos, como o mercúrio, em rios e córregos; efluentes de indústrias que utilizam os rios como carreadores de seus resíduos tóxicos (MACÊDO, 2001).

Os agentes biológicos são os fatores mais importantes de contaminação da água, assim como dos alimentos (GERMANO; GERMANO, 2001). Em termos gerais, o maior risco microbiano está associado com a ingestão de água contaminada com fezes humana ou animal.

As fezes podem ser fontes de patógenos; como bactérias, vírus, protozoários e helmintos (CSUROS; CSUROS, 1999; GERMANO; GERMANO, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A água é, provavelmente, a principal via de transmissão de agentes patogênicos, tanto pelo consumo direto como pela contaminação dos alimentos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; HOBBS; ROBERTS, 1999).

Doenças infecciosas relacionadas à água são a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003) e causa de mais de 80% de todas as mortes nos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006b).

As infecções pela água e alimentos aumentam em climas quentes devido à rápida multiplicação das bactérias nos alimentos e a necessidade da ingestão de grandes volumes de água (HOBBS; ROBERTS, 1999).

Nos países da América Latina e Caribe as enfermidades de veiculação hídrica aparecem entre as três principais causas de morte na região. A epidemia mais significativa dos últimos anos, nesta área, foi a da cólera originada no Peru em 1991 e que se estendeu por 21 países da região, com mais de 1.200.000 casos registrados até 1997 (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006b).

No Brasil, doenças transmitidas pela água são as causas recorrentes da maioria das internações de crianças e de 80% das consultas pediátricas na rede pública (COSTA E SILVA, 2001). A média de notificações de casos de hepatites, no Brasil, nos últimos quatro anos foi de 50.000 casos, dos quais a maior porcentagem se refere à hepatite do tipo A (MACIEL FILHO et al., 2007).

Os patógenos de humanos nos abastecimentos de água geralmente vêm da contaminação da água com material fecal (CSUROS; CSUROS, 1999). Trata-se, pois, de um verdadeiro círculo vicioso, em que os patógenos introduzidos nos mananciais a partir de pessoas portadoras de doenças entéricas, retornam ao ambiente domiciliar através dos sistemas de captação de água potável, contaminando populações saudáveis (TUNDIZI et al., 1999).

Aparentemente, com os conhecimentos que se tem e com os métodos disponíveis para tratamento da água e de destinação de excretas, altamente eficientes, a transmissão por via hídrica deveria ter perdido quase totalmente a importância que tinha quando com ela se relacionavam epidemias de grandes proporções (LESER et al., 1988). Entretanto, deficiências de saneamento básico, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento,

fazem com que não só continuem a ocorrer epidemias, notadamente de febre tifóide, como também que a via hídrica de transmissão contribua acentuadamente para a morbidade e a mortalidade por infecções intestinais (LESER et al., 1988; DAVID et al., 1999).

No ano 2000, em todo o mundo 2,4 bilhões de pessoas (quase a metade da população do planeta) não viviam em condições aceitáveis de saneamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000a).

Na região da América Latina e Caribe em 2006, 137 milhões de pessoas não tinham acesso a um sistema adequado de esgotamento sanitário e desses um pouco mais que a metade, concentram-se em áreas rurais. Das populações urbanas servidas com sistema de esgoto, apenas 14% tratam os seus efluentes. Os outros 86% das descargas, que representam aproximadamente 516 m<sup>3</sup>/s de águas residuárias sem tratamento, são lançados nos corpos superficiais de água, contaminando fontes potenciais para o consumo da água e degradando os ecossistemas aquáticos (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006a).

No Brasil até o ano 2000, apenas 8% dos municípios possuíam tratamento adequado de esgoto o que representava mais de 100 milhões de pessoas sem seus esgotos tratados (MACÊDO, 2001).

A falta de saneamento e de água de boa qualidade resulta no aumento do número de casos de doenças parasitárias e infecciosas, e conseqüente elevação dos gastos com a Saúde Pública (DAVID et al., 1999).

Só no ano de 1996 o país gastou R\$ 78 milhões com internações, ocasionadas por doenças diarréicas e, segundo a Organização Mundial da Saúde, o atraso do Brasil na área da saúde é representado pelo recrudescimento de epidemias, algumas que já haviam sido erradicadas, como é o caso da cólera. Este atraso tem um sentido de alerta sobre a condição de miséria e ausência de infra-estrutura sanitária, uma vez que epidemias só ocorrem em áreas com precárias condições de vida (NISHIARA et al., 1998).

A instalação de rede de água e esgoto em todas as cidades constitui uma medida da máxima importância na erradicação de muitas doenças e, conseqüentemente, para a salubridade urbana (SOUNIS, 1985).

Não é surpresa que em cada novo estudo que se têm sobre o tema, são reforçadas as conclusões que mostram as vantagens da água segura na saúde da população em geral e das crianças em particular, e que a água segura reduz a mortalidade infantil, previne a diarreia, melhora a nutrição e a saúde em geral (SOLSONA, 2001).

### 3.2 A água mineral

Água mineral natural é considerada como a água obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas de origem subterrânea, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais (composição iônica) e pela presença de oligoelementos e outros constituintes (BRASIL, 2000).

Tradicionalmente águas minerais eram aquelas que emergiam naturalmente de fonte subterrânea sendo consumidas no lugar de origem. Atualmente são engarrafadas e vendidas em lugares distantes do seu sítio de origem (COELHO et al., 1998; CABRINI; GALLO, 2001).

Dois teorias clássicas sobre a origem das águas minerais se confrontaram durante muito tempo: a teoria da origem meteórica, que admite ser a água mineral proveniente da própria água das chuvas infiltradas a grandes profundidades e a teoria da origem magmática, que explica a origem dessas águas a partir de fenômenos magmáticos como vulcanismo. Hoje, com os conhecimentos sobre a distribuição da água no planeta, a primeira teoria é a mais aceita. A teoria da origem meteórica considera a água mineral um tipo particular de água subterrânea cuja formação resulta da ressurgência das águas das chuvas infiltradas a grandes profundidades, através de fraturas e falhas tectônicas, em velocidade muito lenta. Ao defrontar-se com descontinuidades de estruturas geológicas (falhas, diques, etc.), impulsionadas pelo peso da coluna de água superposta e, em certos casos, por gases e vapores nelas presentes, essas águas emergem à superfície sob forma de fontes (LIMA, 2003).

As águas minerais e as águas subterrâneas têm a mesma origem. São águas de superfície que infiltram no subsolo e cujo conteúdo em sais guarda uma relação direta com o calor, pois a capacidade de dissolver minerais e incorporar solutos aumenta com a temperatura. Considera-se como água mineral aquela que conseguiu atingir profundidades maiores e, dessa forma, se enriqueceu em sais, adquirindo novas características físico-químicas (RAMIRES et al., 2004).

Dependendo da qualidade desses sais a água pode ser benéfica para o tratamento de determinados problemas de saúde. Porém, na grande maioria dos casos, essas águas têm apenas discreto poder diurético ou alcalinizante e muitas vezes as campanhas promocionais é que fazem a propaganda do poder medicinal dessas águas (RIEDEL, 1992).

As águas minerais foram batizadas como “diamante líquido”, “petróleo”, “ouro”, “remédio universal”, quer por suas virtudes terapêuticas, quer pelo potencial econômico que

representam para um país e/ou uma região. Elas foram frequentemente usadas desde a antiguidade por vários povos e em torno de suas nascentes surgiram diversos núcleos urbanos com funções terapêuticas e lúdicas (QUINTELA, 2004).

A cultura de utilização das águas minerais teve origem na Roma antiga com os banhos medicinais. O comércio de águas minerais foi regulamentado na França, no século XVII (MACÊDO, 2001).

Durante o século XIX houve, por parte dos governos de alguns países, interesse em conhecer as águas existentes nos seus territórios, como um recurso terapêutico e como manancial econômico em potencial (QUINTELA, 2004).

Ao longo do século XIX é que nasce realmente a indústria de envasamento de água mineral. Inicialmente sua venda era feita em farmácias, pois essencialmente sua função era medicinal. A igreja reconhecia as qualidades terapêuticas “milagrosas” das águas minerais e colocava as fontes sob a proteção de um santo, o que justifica a maioria do nome das fontes. No século XX, até o ano de 1968, a produção brasileira de água engarrafada manteve-se estável, a partir daí iniciou-se uma nova fase no mercado, com o lançamento do garrafão de vidro de 20 litros, que possibilitou a ampliação do mercado. Em 1970, outra novidade da indústria de águas minerais, que conquistou o consumidor, foram as garrafinhas plásticas de polietileno de baixa densidade - PEBD. Em 1979, o crescimento do mercado aumentou ainda mais com a introdução do garrafão de 20 litros de Policarbonato. (MACÊDO, 2001).

Nos últimos anos, a preocupação com a qualidade da água que se consome, decorrente da poluição progressiva das águas, tem provocado uma contínua demanda por água mineral em todos os países (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS, 2005; COELHO et al., 1998; JEENA et al., 2006). O sabor e odores desagradáveis causados pela adição de flúor e cloro nas águas de abastecimento público (AMARAL et al., 2005) e a falta de suprimentos de água potável segura durante viagens têm também resultado em um aumento na demanda de água mineral (JEENA et al., 2006).

Acompanhando uma tendência mundial, o mercado brasileiro de águas minerais continua em franca ascensão, consolidando-se como um dos setores da economia que mais crescem no país (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS, 2005). Em 2005 o Brasil ficou em 8º lugar em produção, com 7,7 bilhões de litros, e 9º em faturamento, com 1,9 bilhões de euros (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS, 2006a).

### 3.3 Qualidade microbiológica das águas minerais

A qualidade microbiológica de água mineral engarrafada é de grande interesse já que muitos consumidores a usam como uma alternativa para a água de abastecimento público (RAMALHO et al., 2001). A água engarrafada deve ser de boa qualidade microbiológica, especialmente se o uso for destinado à população vulnerável, tais como doentes, idosos ou crianças (WARBURTON, 1993).

A água que se move abaixo da superfície, ou água subterrânea, passa por uma filtração no próprio solo que remove a maioria dos microrganismos. Por essa razão, as águas de fontes e poços profundos normalmente são de boa qualidade quando comparadas às águas superficiais (BURBARELLI, 2004).

Existe a percepção de que o consumo de água mineral natural representa um estilo saudável de vida e que esses produtos são relativamente seguros (VILENA et al., 1996; JEENA et al., 2006). Entretanto, pode não ser verdadeira a afirmação de que a água mineral apresente qualidade microbiológica superior a das águas de abastecimento público, apesar de sua origem em mananciais subterrâneos (WENDPAP et al., 1999; EIROA et al., 1996; HUNTER, 1993).

A ocorrência de distúrbios gastrointestinais seguintes ao consumo dessas águas tem focado atenção no estudo de sua microbiologia (HUNTER, 1993; WARBURTON, 1993).

É importante considerar que, na epidemia de cólera ocorrida em Portugal em 1974, a água mineral engarrafada não carbonatada foi incriminada como veículo primário da doença, afetando 3.000 pessoas (EIROA et al., 1996; GONZALEZ et al., 1987). Outros casos de enfermidades relacionadas com água engarrafada incluem febre tifóide e diarreia de viajante. Pesquisas também têm relatado o isolamento de ameba potencialmente patogênica na água mineral (ROSENBERG, 2003).

Além dos microrganismos de importância para saúde pública, especial atenção deve ser dada aos microrganismos que podem deteriorar o produto (alteram sabor e/ou coloração) e aos indicadores de condições higiênicas (SANT'ANA et al., 2003).

Os resultados obtidos pelo Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos, no setor de águas minerais, revelaram que quase 10% das análises laboratoriais feitas no país deram resultados insatisfatórios (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS, 2006b).

A água mineral natural deve apresentar qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, devendo ser captada, processada e envasada obedecendo às condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação (BRASIL, 2000).

Os tratamentos que poderiam ser aplicados de forma a reduzir ou eliminar os microrganismos seriam os métodos químicos (cloração, ozonização) e processos ou agentes físicos (temperatura elevada, por exemplo), que não são permitidos no Brasil, de acordo com a definição de água mineral. A carbonatação pode ser aplicada desde que no rótulo conste de forma clara a expressão "com gás". O CO<sub>2</sub> apresenta efeito bactericida por reduzir o pH da água (SANT'ANA et al., 2003). Apesar de a carbonatação reduzir significativamente o número de microrganismos contaminantes, ela não pode ser considerada como um meio de melhorar a qualidade microbiológica de águas minerais contendo elevadas populações de microrganismos (EIROA et al., 1996).

### **3.4 Microbiota autóctone.**

As águas minerais apresentam microrganismos que lhe são próprios, isto é, existentes antes de qualquer tratamento ou processamento (COELHO et al., 1998; ROSENBERG, 2003; SCHMIDT-LORENZ, 1976).

A água mineral ao atravessar superfícies de rochas tem suas moléculas orgânicas filtradas. O resultado são águas com baixo conteúdo de nutrientes orgânicos que são necessários para a multiplicação de microrganismos (STICKLER, 1989).

Entretanto, as águas minerais não são produtos estéreis, apenas perdem grande parte de suas bactérias e matéria orgânica em suspensão ao atravessarem superfícies de rochas e terra até atingirem um determinado nível (HILUY et al., 1994).

Leclerc e Moreau (2002) observaram que os microrganismos dominantes em águas subterrâneas são bactérias heterotróficas, frequentemente chamadas de oligotróficas, mas muitas delas são oligotróficas facultativas.

Schmidt-Lorenz (1976) cita que a microbiota autóctone consiste de psicrotróficos, principalmente de bactérias Gram-negativas tais como os gêneros: *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp., assim como Gram-positivas como *Arthrobacter* sp. Para Urmeneta, Navarrete e Sancho (2000), a prevalente microbiota bacteriana consiste de

*Pseudomonas* sp., juntamente com espécies de *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e outros gêneros Gram-negativos.

As características das fontes influenciam a população bacteriana das águas minerais (MORAIS; COSTA, 1990). Essas células bacterianas são geralmente menores, sendo cerca de um terço ou um quarto do tamanho de células normais; isso é uma tática para sobreviverem abaixo das condições normais. É difícil determinar precisamente que proporções dessas células ainda estão vivas e capazes de se multiplicar (STICKLER, 1989).

Bischofberger et al. (1990) encontraram que na água da fonte predominam as bactérias Gram-negativas. Após o engarrafamento 30% das bactérias da fonte não foram mais encontradas e houve aumento do número de bactérias Gram-positivas. Após uma semana de engarrafamento ocorreu uma mudança na composição da microbiota, *Pseudomonas fluorescentes*, *Flexibacter* e *Acinetobacter* (aeróbios estritos e mesófilos) foram dominantes.

Para Morais e Costa (1990) o longo tempo de estocagem da água mineral tem um profundo efeito na população bacteriana. O grupo dominante na hora do engarrafamento não foi identificado depois disso, porque ele perdeu a viabilidade ou não pode se multiplicar e durante o último período de estocagem outros grupos aumentaram em número. Esse fato pode refletir mudanças nos nutrientes disponíveis, um decréscimo na viabilidade de algumas cepas, competição, antagonismo ou outros fatores ainda não identificados.

Os produtores e as agências reguladoras normalmente avaliam a qualidade da água mineral em termos da presença de indicadores e patógenos. Mudanças na população bacteriana após o engarrafamento ou durante a estocagem pode também indicar alterações na água da fonte ou modificações durante o engarrafamento. Os produtores deveriam examinar e caracterizar a população bacteriana na fonte e na água engarrafada como uma adição ao controle do processo (MORAIS; COSTA, 1990).

### **3.5 Fatores que influenciam a multiplicação das bactérias em água mineral.**

Embora os microrganismos conhecidos como autóctones, não apresentem risco para a saúde pública e permaneçam num nível baixo em termos populacionais enquanto a água está em seu ambiente natural, logo após o engarrafamento começam a multiplicar rapidamente (COELHO et al., 1998; LECLERC; MOREAU, 2002; ROSENBERG, 2003; SCHMIDT-LORENZ, 1976; STICKLER, 1989). Estudos sobre a ecologia das águas minerais têm



demonstrado que amostras coletadas diretamente do aquífero têm uma população bacteriana de aproximadamente 10-100 UFC/mL sendo que, após o envase, esta população aumenta para aproximadamente  $10^3$ - $10^6$  UFC/mL (BISCHOFBERGER et al., 1990; EIROA et al., 1996; GONZALEZ et al., 1987; HUNTER, 1993; LECLERC; MOREAU, 2002; SCHIMDT-LORENZ, 1976).

Vários autores estudaram o tempo de variação da microbiota bacteriana da água mineral após o engarrafamento e encontraram que a população inicial aumenta extremamente logo após o engarrafamento, até aproximadamente uma semana (BISCHOFBERGER et al., 1990; DEFIVES et al., 1999; EIROA et al., 1997; LECLERC; MOREAU, 2002; LEGNANI et al., 1999; URMENETA et al., 2000). Essa fase de multiplicação é geralmente seguida por um pequeno declínio (EIROA et al., 1997; STICKLER, 1989), depois mantém esse nível até 70 a 100 dias, coincidindo com o tempo em que as águas engarrafadas normalmente seriam compradas e consumidas (EIROA et al., 1997; LEGNANI et al., 1999).

Essa multiplicação da população bacteriana é considerada normal por vários pesquisadores e não afeta a potabilidade da água, a não ser que microrganismos alóctones estejam também presentes (DAVID et al., 1999). A explicação para este fenômeno ainda está sob debate (LECLERC; MOREAU, 2002).

Na fonte, a água mineral possui uma pequena população de bactérias dormentes. O processo de engarrafamento muda drasticamente suas condições ambientais e favorece multiplicação bacteriana (STICKLER, 1989; SCHIMDT-LORENZ, 1976).

Alguns autores tentaram explicar este fenômeno. Para Eiroa et al. (1996); Schimdt-Lorenz, (1976); Eiroa et al. (1997), essa multiplicação das bactérias após o engarrafamento pode ser devido ao incremento na concentração de oxigênio dissolvido durante as operações de engarrafamento e para Eiroa et al. (1996) essa multiplicação também é devido ao contato com compostos orgânicos, que podem estar presentes em tubulações, reservatórios ou nas embalagens e tampas.

Vários autores explicaram essa multiplicação das bactérias após o engarrafamento devido ao fato das bactérias aderirem à superfície das garrafas (BISCHOFBERGER et al., 1990; JAYASEKARA et al., 1998; SCHIMDT-LORENZ, 1976; ZOBEL; ANDERSON, 1936). Para Bischofberger et al. (1990); Schimdt-Lorenz (1976) a explicação para isto é que os nutrientes presentes em baixas concentrações são adsorvidos e concentrados na superfície, estando mais disponível para as bactérias que, provavelmente, fixam-se na superfície. Este fato foi relatado pela primeira vez por Zobel e Anderson (1936) que concluíram que quanto maior a área da superfície em relação ao volume da água mais rapidamente a multiplicação de

bactérias acontece; segundo os autores esse fato auxiliaria concentrando os nutrientes por adsorção ou podem favorecer a atividade enzimática das bactérias e a absorção de metabólitos. Jayasekara et al. (1998) consideram que a aderência à superfície interna das garrafas pode explicar o longo tempo de sobrevivência dos microrganismos na água mineral.

Principalmente em ambientes com poucos nutrientes é uma tendência normal das células microbianas, quando entram em contato com uma superfície sólida, fixarem na superfície para competir eficientemente com outras células microbianas por espaço e nutrientes para resistir a qualquer condição ambiental desfavorável, resultando assim em formação de biofilme (JONES et al., 1999; RAY, 1996). Para Jones et al. (1999) a rugosidade da superfície do frasco é muito importante na determinação da adesão da bactéria a superfície.

Este fato pode ser incrementado devido ao longo tempo que as garrafas ficam estocadas. Uma vez a garrafa preenchida e selada, a água engarrafada pode ficar nas prateleiras dos mercados ou estocadas em casa por semanas ou meses. Assim a água contendo poucos organismos quando engarrafada pode apresentar um crescimento logarítmico no número de bactérias em um tempo relativamente pequeno. Este aumento continua em curva de crescimento típica até a matéria orgânica da água ser esgotada. Esta matéria orgânica pode variar entre marcas, dependendo da fonte. (ROSENBERG, 2003).

A temperatura também é um fator importante para a multiplicação das bactérias após o engarrafamento, pois, durante o período de estocagem elas são geralmente maiores que na fonte (SCHIMDT-LORENZ, 1976). Se a água é estocada em temperatura ambiente, como é comum em mercados e, frequentemente, em casa, em apenas alguns dias as contagens bacterianas atingirão concentrações altas como  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL. A refrigeração retarda esse processo (ROSENBERG, 2003). Nsanze e Babarinde (1999) encontraram que a refrigeração da água (4°C) e a estocagem a altas temperaturas (42°C) preservaram a água sem multiplicação microbiana, entretanto a 25-37°C os microrganismos multiplicaram mais facilmente.

A multiplicação bacteriana ocorre menos frequentemente em água gaseificada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000b). O decréscimo no pH resultado da carbonatação age para prevenir a multiplicação bacteriana (ROSENBERG, 2003).

Estudos têm mostrado que as bactérias geralmente ocorrem em maior número nas garrafas plásticas do que nas de vidro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000b). Coelho et al. (1998); Rosenberg (2003) acreditam que maior número de microrganismos são encontrados em águas de garrafas

plásticas, devido á característica do plástico em permitir a passagem de O<sub>2</sub>; os nutrientes liberados dos plásticos são também um possível contribuinte para o aumento da multiplicação bacteriana na água (EIROA et al., 1997).

Leclerc e Moreau (2002); Bischofberger et al. (1990) concluíram que a principal causa das baixas contagens de colônias da mesma água mineral em garrafas de vidro mecanicamente limpas comparadas com as garrafas plásticas se deve ao efeito bacteriostático dos agentes de limpeza residual.

O desenvolvimento microbiano em águas engarrafadas caracteriza-se por uma alternância de aumentos e diminuições da população, cuja razão não se conhece exatamente. Para explicar este fato existem algumas teorias que consideram que cada nova população é composta de várias espécies que se desenvolvem às expensas da matéria orgânica das células mortas da população anterior (EIROA et al., 1997). Os produtos da autólise das células mortas são utilizados como nutrientes para as novas populações, que são compostas por espécies quase sempre diferentes. (SCHIMDT-LORENZ, 1976).

Alguns autores estão pesquisando se essa multiplicação das bactérias na água depois do engarrafamento é devido à ressuscitação de um grande número de células dormentes não cultiváveis presente na fonte de água ou no sistema de engarrafamento, ou se ela é resultado da divisão celular e multiplicação de poucas células cultiváveis inicialmente presente, mas ainda não chegaram a nenhuma conclusão (LECLERC; MOREAU, 2002).

As características de multiplicação dos microrganismos nas águas minerais requerem mais estudos (COELHO et al., 1998).

### **3.6 Microbiota alóctone.**

Outro tipo de microbiota que pode surgir na água mineral, mas não proveniente da fonte são as chamadas bactérias alóctones (COELHO et al., 1998; DEFIVES et al., 1999; EIROA et al., 1996; RAMALHO et al., 2001; WARBURTON, 1993). Dentre essas bactérias alóctones a maior preocupação é com a possível e ocasional presença de patógenos como: *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp., *Aeromonas hydrophilla*, *Plesiomonas shigelloides*, vírus entéricos, protozoários e patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa* (SANT'ANA et al., 2003).

Estes organismos chegam até a água por contaminação fecal ou outras vias, sejam diretamente na fonte ou durante o engarrafamento (COELHO et al., 1998). Por isso é importante proteger as fontes de água mineral de infiltração de águas de superfície ou águas de drenagem dos solos no lugar da fonte ou perfuração. Estas águas podem conduzir grande população de organismos aquáticos e do solo até a água subterrânea, mudando suas propriedades físicas e químicas e fornecendo nutrientes para as bactérias (STICKLER, 1989).

Os equipamentos que são usados para conduzir a água até os locais de engarrafamento, equipamentos usados durante o processo de engarrafamento e reservatórios de estocagem podem também abrigar populações de organismos contaminantes (STICKLER, 1989). Podem ser adquiridos também do ambiente e das embalagens e tampas (EIROA et al., 1996; RAMALHO et al., 2001).

A reutilização das garrafas sem adequada limpeza e desinfecção é outra possível fonte de contaminação (STICKLER, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000b).

As bactérias contaminantes sobrevivem pobremente em água engarrafada e podem se tornar fisiologicamente prejudicadas com a exposição aquática porque elas não estão bem adaptadas às condições químicas e físicas da água. Apesar das condições desfavoráveis, os patógenos podem permanecer viáveis em água e causar várias doenças entéricas após serem ingeridas (RAMALHO et al., 2001).

### **3.7 Microrganismos indicadores**

Microrganismos indicadores vêm sendo utilizados na avaliação da qualidade microbiológica da água e alimentos há longo tempo. Eles são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Portanto, os microrganismos indicadores são rotineiramente empregados para avaliar a qualidade do produto final e a higiene empregada no seu processamento (SANT'ANA et al., 2003).

Para ser considerado como indicador da qualidade da água um microrganismo deve obedecer a algumas características importantes que são: 1. Estar presentes em águas poluídas e ausentes em águas potáveis; 2. Estar presentes na água quando os microrganismos patogênicos estiverem presentes; 3. O número de microrganismos indicadores está correlacionado com o índice de poluição; 4. Sobreviver melhor e por mais tempo na água do que os microrganismos patogênicos; 5. Apresentar propriedades uniformes e estáveis; 6. Geralmente ser inofensivo ao ser humano e a outros animais; 7. Estar presente em maior número do que os patogênicos; 8. Ser facilmente evidenciado por técnicas laboratoriais padronizadas; 9. Ser mais resistentes que os patógenos às técnicas de desinfecção (PELCZAR JUNIOR et al., 1997).

Para garantir ausência de patógenos entéricos a enumeração de organismos indicadores apropriados é recomendada. Algumas controvérsias ainda existem quanto a qual grupo de organismos seria mais apropriado, mas coliformes totais, coliformes fecais/*E. coli* tem sido sugerido (SCHRAFT; WATTERWORTH, 2005).

Para Franco e Landgraff (2003) o indicador ideal de contaminação fecal deve preencher os seguintes requisitos: 1. Ter como habitat exclusivo o trato intestinal do ser humano e de outros animais; 2. Ocorrer em número elevado nas fezes; 3. Apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral; 4. Ser detectado através de técnicas rápidas, simples e precisas.

### **3.8 Microrganismos monitorados na água mineral**

A seguir serão abordados os microrganismos envolvidos neste trabalho, na avaliação microbiológica da água mineral.

#### **3.8.1 Coliformes**

O grupo coliforme é dividido em coliformes totais e coliformes termotolerantes ou fecais. Define-se coliformes totais como bastonetes Gram-negativos não esporogênicos,

aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas à temperatura de 35°C (MACÊDO, 2001).

Pertencem a este grupo predominantemente, bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, (FRANCO; LANDGRAF, 2003; HUI et al., 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a), mas o grupo é mais heterogêneo e incluem uma ampla variedade de gêneros, tais como *Serratia* e *Hafnia* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a). Dessas, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do ser humano e animais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O grupo dos coliformes totais é um indicador das condições higiênicas do processo e sua enumeração é muito utilizada em indústrias alimentícias, indicando contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA et al., 1997).

O outro subgrupo dos coliformes são os coliformes termotolerantes ou fecais, que, são capazes de fermentar a lactose a 44 - 45°C ( $\pm 0,2$ ) em 24 horas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a). Nessas condições, cerca de 90% das bactérias são *Escherichia coli*, o restante pertence ao gênero *Enterobacter* e *Klebsiella* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998; SILVA et al., 1997; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Essa definição objetivou selecionar os coliformes originários do trato gastrointestinal. Portanto, a presença de coliformes fecais é muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E. coli* dentro do grupo fecal (SILVA et al., 1997).

A *E. coli* está presente em grande número na microbiota intestinal normal de humanos e animais, onde ela geralmente não causa mal (CLIVER, 1990; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; SALYERS; WHITT, 2002). Muitas cepas de *E. coli* podem até mesmo ser protetoras já que elas previnem a colonização intestinal de outras cepas virulentas (SALYERS; WHITT, 2002).

Algumas cepas de *E. coli*, entretanto, têm adquirido a habilidade para causar infecções que variam de infecções intestinais, tais como diarreia até infecções extra-intestinais, tais como infecções no trato urinário, meningite e septicemia (SALYERS; WHITT, 2002).

A transmissão pela água da *E. coli* enteropatogênica têm sido bem documentada para águas de recreação e água para beber. Não existe indicação que a resposta de cepas de *E. coli* enteropatogênicas para tratamento de água e procedimentos de desinfecção diferem daqueles das outras *E. coli*. Portanto, teste convencional para *E. coli* (ou alternativamente, bactérias coliformes termotolerantes) fornece indicação apropriada para os sorotipos enteropatogênicos em água para beber (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a).

Baudizsova (1997), também encontrou que coliformes totais e outros termotolerantes foram capazes de multiplicar em águas de rios não poluídas enquanto a *E.coli* não foi, e manteve a recomendação para ela ser usada como indicador bacteriano unicamente para contaminação fecal recente.

A ocorrência de *E. coli* é considerada um indicador específico de contaminação fecal e a possível presença de patógenos entéricos (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a).

A presença de coliformes fecais em água potável é o melhor indicador que a saúde humana possa estar comprometida (CONBOY; GOSS, 2001).

### 3.8.2 Enterococos

Essas bactérias, antes um subgrupo do gênero *Streptococcus*, a partir de 1984 passaram a constituir o gênero *Enterococcus*, com 16 espécies reconhecidas atualmente (FRANCO; LANDGRAF, 2003). São bactérias gram-positivas e relativamente tolerantes ao cloreto de sódio e a pH alcalino; são anaeróbias facultativas e ocorrem de forma isolada, em pares e em pequenas cadeias (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a).

Os enterococos são encontrados no intestino de animais de sangue quente (SALYERS; WHITT, 2002), onde persistem mais que os coliformes (MASSA et al., 2001). Podem ser usados como indicadores de poluição fecal e apresentam importantes vantagens como, sobreviver mais tempo em ambientes aquáticos do que a *E. coli* (ou coliformes termotolerantes), são mais resistentes à seca e ao cloro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a). McFeters et al. (1974) em seu estudo observaram que os enterococos sobrevivem por mais tempo que os coliformes e a maioria dos patógenos entéricos em água.

Os enterococos são mais tolerantes as condições ambientais que os coliformes, sendo interessante seu uso como indicativo de possibilidade de enterovírus (LEITÃO et al., 1988; MOSSEL, 1976).

A utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Além disso, apresentam uma sobrevivência maior do que os enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os enterococos, em conjunto com os coliformes totais e fecais, são geralmente considerados como os indicadores mais úteis de poluição fecal, e seu uso está sendo internacionalmente recomendado (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

### **3.8.3 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* normalmente habita o solo, água e vegetais. Pode ser encontrada na pele e tem sido isolada das fezes e garganta de 3% a 5% dos indivíduos normais. Em pacientes hospitalizados, a taxa de portadores pode ser bastante elevada (SILVA, 1999; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

São bacilos Gram-negativos, aeróbios móveis por flagelos polares, oxidase e catalase positivas e que se multiplicam a 37° - 42°C. A sua tolerância a valores relativamente altos de pH, a sobrevivência em substratos com pequenas quantidades de nutrientes e a capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos, faz com que esta espécie mereça atenção especial (GUILHERME et al. 2000), pois têm grande capacidade de proliferar em água destilada e águas minerais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Está relacionada com infecções auditivas em usuários de águas recreativas contaminadas e em surtos de gastroenterites veiculadas também pela água, principalmente em indivíduos debilitados (GUILHERME et al. 2000). Alguns episódios de doenças de origem alimentar foram aparentemente causados por algumas espécies de *Pseudomonas* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).



A presença de altos números de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável, notavelmente em água engarrafada, pode estar associado com alteração de paladar, odor e turbidez (STIKCLER, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a). *Pseudomonas aeruginosa* têm capacidade de produzir diversas substâncias que influem desfavoravelmente no sabor dos alimentos. (SILVA, 2000). Além disso a *P. aeruginosa* produzem substâncias tóxicas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A presença da *P. aeruginosa* em água mineral não é aceitável porque é um patógeno oportunista capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos (HUNTER, 1993), além de apresentarem maior resistência do que os microrganismos patogênicos, sendo capaz de inibir as bactérias do grupo coliforme (GUILHERME et al., 2000).

A presença de bactérias patogênicas oportunistas em água de consumo humano representa um problema latente para a população em geral. Os mais afetados são os imunodeficientes, recém nascidos e idosos (QUIROZ, 2002).

As águas minerais são recomendadas para doenças do rim, assim como para problemas urinários e do coração. Assim ela é tipicamente consumida por indivíduos imunocomprometidos para quem a ingestão de bactérias oportunistas não é aconselhável (ROSENBERG, 2003).

Do ponto de vista higiênico a permanente contaminação da microbiota da água com *Pseudomonas aeruginosa* como principal representante é mais séria. Estas bactérias Gram-negativas são oligocarbotoleante e podem, portanto, multiplicar em água mineral com níveis de nutrientes extremamente baixos após uma certa adaptação (SCHMIDT-LORENZ, 1976).

Estudos tem encontrado números altos de *Pseudomonas aeruginosa* nos líquidos usados para enxaguar as garrafas de vidro retornáveis apresentando um risco de contaminação para água mineral (LEGNANI et al., 1999).

#### **3.8.4 Bactérias heterotróficas**

Bactérias heterotróficas são aquelas que utilizam a matéria orgânica ou compostos orgânicos como fonte de carbono para seu crescimento e para a síntese de material celular (TORTORA et al., 2000).

A contagem em placas é utilizada para se estimar a população de bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias facultativas presentes na água, que tem a capacidade de

se desenvolver nas condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação definidos para o teste. (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a).

A enumeração da contagem de heterotróficos é comumente usada como indicador da qualidade microbiológica (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

A maioria das bactérias heterotróficas, geralmente, não são patógenas. Entretanto alguns membros desse grupo, incluindo *Legionella* spp., *Micobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., podem ser patógenos oportunistas (QUIROZ, 2002). Populações substanciais de tais organismos, ocorrendo em suprimentos de água potável, podem representar riscos à saúde dos consumidores, evidenciando a necessidade do controle da população microbiana geral em água potável. (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a; JEENA et al., 2006).

Esses microrganismos presentes na água, quando em grande número, além de representarem um risco à saúde, podem ocasionar outros problemas, tais como: deterioração da qualidade da água, com desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis e produção de limo ou películas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a).

A influência inibidora de alguns organismos pode impedir a detecção de coliformes, seja devido à produção de fatores de inibição, seja por um desenvolvimento mais intenso destes organismos, sobrepujando uma menor população de coliformes (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a). Estudos realizados revelaram que quando o número de colônias aumenta até um nível de 500/mL, a frequência na detecção de coliformes também aumenta; porém, quando a população bacteriana excede a 1000/mL, a frequência na detecção de coliformes decresce. (BURBARELLI, 2004; COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a).

A presença destas bactérias na água pode indicar uma deterioração na qualidade da água de consumo ou um processo de desinfecção inadequado no sistema de produção (NASCIMENTO et al., 2000).

Como as águas minerais engarrafadas são consumidas sem qualquer tratamento, altas contagens de heterotróficos com possível presença de patógenos, especialmente formas resistentes a múltiplos antibióticos, podem representar sério risco à saúde de indivíduos imunocomprometidos (JEENA et al., 2006).

A contagem de bactérias heterotróficas em águas minerais deve ser realizada com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial (SABIONI; SILVA, 2006).

### 3.9 Ocorrência de microrganismos indicadores em água mineral

Coelho et al. (1998), ao avaliar a qualidade microbiológica de seis marcas de água mineral envasadas e destinadas ao mercado consumidor de Curitiba, encontraram que duas marcas (33%) estavam contaminadas com coliformes totais, mas apresentavam ausência de *E. coli*. A presença de coliformes na água mineral pode indicar ausência de cuidados sanitários, problemas nas operações de captação, canalização, filtração, envasamento ou outros que possam alterar as propriedades características e a composição das mesmas.

Alves et al. (2002), analisaram dezoito amostras de diferentes marcas de água mineral, em embalagens de diferentes tamanhos, comercializadas em Marília-SP. Encontraram uma amostra (5,6%) de água mineral contaminada por coliformes totais e nenhuma contaminada por coliformes fecais. O fato de ser encontrada uma amostra de água mineral contaminada permite afirmar que sua contaminação pode ter sido durante a fase de captação e/ou processamento do produto.

Wendpap et al. (1999) avaliaram 180 amostras de água mineral em embalagens de diversos tamanhos, da região central de Cuiabá-MT. Detectaram contaminação por coliformes totais em vinte e uma delas (11,7%), em dezessete (9,4%), detectou-se coliformes fecais.

Sant'Ana et al. (2003), analisaram quarenta e quatro amostras de água mineral envasadas, de diferentes marcas, originárias do Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Encontraram 25% das amostras contaminadas por coliformes totais e 20,4% por *E. coli*, sugerindo falhas higiênicas ao longo do processo e contaminação fecal recente. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e enterococos.

Guilherme et al. (2000), pesquisaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em quarenta e quatro amostras de água mineral enviadas ao Laboratório de Saúde Pública "Noel Nutels" no Rio de Janeiro. Encontraram em dez (22,7%) amostras a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Eiroa et al. (1996), ao avaliarem as características microbiológicas de 92 amostras de água mineral de diferentes pontos da linha de envase de quatro indústrias engarrafadoras no Estado de São Paulo, não detectaram a presença de microrganismos do grupo coliforme, clostrídios e estreptococos fecais, mas encontraram *Pseudomonas aeruginosa* em 60% das amostras. Esses autores observaram que, dependendo da época de amostragem, *P. aeruginosa* podia ou não estar presente nas fontes e que mesmo não havendo a contaminação da fonte por

este microrganismo, ocasionalmente a bactéria esteve presente nas envasadoras e produto final.

Nascimento et al. (2000), avaliando a qualidade microbiológica de 70 amostras de águas minerais comercializadas em São Luís-MA, observaram que trinta e cinco (50%) das amostras, não apresentavam contaminação por coliformes totais, fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas, e os outros trinta e cinco (50%), não apresentavam contaminação por coliformes totais e fecais, mas apresentavam-se impróprias para o consumo humano devido a contagem de *P. aeruginosa* e de bactérias heterotróficas acima dos padrões, colocando em risco a saúde dos consumidores.

Farache Filho et al. (2003) analisaram cento e dez amostras de águas minerais em garrafas de 1500 mL, de vinte e duas marcas comercializadas na cidade de Araraquara-SP. Encontraram 100% das amostras negativas para coliformes fecais e coliformes totais, cinco amostras (4,54%) estavam contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* e quarenta amostras (38,1%) apresentaram contagens para heterotróficos maior que 500 UFC/mL.

Farache Filho et al. (2005) realizaram um estudo para avaliar alguns aspectos de qualidade microbiológica de águas minerais em galões de vinte litros, e analisaram oitenta e quatro amostras, sendo quatro de cada uma das vinte e uma marcas comercializadas no mercado de Araraquara e Américo Brasiliense-SP. Encontraram duas amostras (2,4%) contaminadas com coliformes fecais, treze amostras (15,5%) contaminadas com coliformes totais, oito amostras (9,5%) contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* e cinquenta e duas amostras (62%) apresentaram contagens de heterotróficos maiores que 500 UFC/mL.

Amaral et al. (2005) analisaram duzentos e vinte e cinco amostras de águas minerais de três marcas, cinco lotes e três volumes de embalagens (200mL, 1500mL e 20 litros) comercializadas no município de Jaboticabal-SP. Foram encontradas quarenta amostras (18%) contaminadas com enterococos.

David et al. (1999), avaliaram quatro amostras de águas minerais, de diferentes marcas, comercializadas em Recife-PE. Encontraram em duas amostras (50%) coliformes totais e *Pseudomonas*. Todas as amostras apresentaram contagem de heterotróficos superiores a 300UFC/mL, sugerindo possível contaminação durante o engarrafamento e armazenamento.

Sabioni e Silva (2006) avaliaram cinquenta amostras de águas minerais, em embalagens de 500mL, 1500mL e 20litros, de diferentes marcas, comercializadas em Ouro Preto-MG. Em sete amostras (14%) foi encontrada *Pseudomonas aeruginosa* e em vinte e cinco amostras (50%) foi encontrada contagem de heterotróficos maior que 500UFC/mL. Em nenhuma das amostras foram detectados coliformes totais, fecais e enterococos.

Guo-Jane Tsai e Shou-Chin Yu (1997), avaliaram a qualidade microbiológica de cento e trinta e seis amostras de água mineral não carbonatada, em garrafas de 1500mL e 500mL, comercializadas em Taiwan. Coliformes e enterococos não foram detectados nas amostras analisadas, porém, quatro amostras (2,9%) estavam contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

Cabrini e Gallo (2001) analisaram vinte e uma amostras de água mineral natural de sete marcas comercializadas na cidade de Piracicaba-SP, em garrafões de 10L, 1,5L e 500mL. Das 21 amostras apenas duas (9,5%), apresentaram-se contaminadas por coliformes totais. Em 71% das amostras foram encontradas contagens de heterotróficos maiores que 500UFC/mL; todas as amostras de 500 mL apresentaram altas contagens de heterotróficos, o que sugere maiores cuidados com relação às condições higiênicas das unidades industriais, a fim de assegurar a boa qualidade do produto. Coliformes fecais, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* não foram encontrados nas amostras analisadas.

Reis et al. (2006), avaliaram amostras de águas minerais envasadas de diferentes marcas, vendidas em São José do Rio Preto-SP. Nas vinte amostras analisadas não encontraram a presença de coliformes totais, fecais e *E. coli*. Porém em quatro amostras (20%) foram encontradas contagens de heterotróficos maiores que 500 UFC/mL.

Apesar da preocupação crescente com a qualidade da água para consumo humano, ainda são poucos os dados disponíveis no Brasil sobre a qualidade microbiológica das águas minerais (SANT'ANA et al., 2003).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Amostragem**

Foram utilizadas 69 amostras de água mineral natural, não carbonatada, embaladas em garrafas para uso individual com volume entre 330mL e 600mL, provenientes de 17 marcas comercializadas em supermercados na cidade de Araraquara-SP. As amostras foram adquiridas aleatoriamente, em épocas e estabelecimentos diferentes para que fossem originadas de lotes diversos. Ocorreu variação entre o número de amostras provenientes das diversas marcas estudadas, pois algumas nem sempre eram encontradas sistematicamente nos supermercados; isso fez com que o número de amostras em cada marca variasse entre uma e cinco considerando que algumas não foram mais encontradas para repetir as análises durante o período de estudo - Julho a Dezembro de 2006.

Depois de adquiridas, as amostras foram conduzidas ao laboratório na embalagem original e assim mantidas em temperatura ambiente até o momento da análise.

### **4.2 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Saúde Pública/Análise de Água do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara – UNESP. Foram avaliados os seguintes parâmetros: coliformes totais, coliformes fecais/*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos e bactérias heterotróficas.

#### **4.2.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes fecais/*E.coli*.**

Para determinação da presença (NMP/100mL – número mais provável em 100 mL de amostra) de coliformes totais e coliformes fecais/*E. coli* utilizou-se a técnica de substratos cromogênicos (definidos), empregando-se o produto da marca comercial Colillert/IDEXX, seguindo as orientações da American Public Health Association (1998) e do fabricante.

Parte da amostra (100mL), preservada na embalagem original até o momento da análise, foi transferida para frasco descartável estéril, em condições assépticas, adicionando-se o conteúdo de um flaconete contendo o substrato do TSD-C (Técnica de substratos cromogênicos-definidos). Após fechado e lacrado agitou-se vigorosamente o frasco, até que todos os grânulos fossem dissolvidos. Com auxílio de pipeta estéril, transferiu-se 10mL da amostra de água com substrato para cada um dos 10 tubos de ensaio com tampa de rosca, estéreis, posteriormente incubados a 35-37<sup>0</sup>C por 24 h.

Após esse período foram feitas as leituras e o aparecimento de coloração amarelada nos tubos indicava positividade para coliformes totais. A partir do número de tubos positivos em cada amostra calculava-se o número mais provável de coliformes totais (NMP/100mL) empregando-se Tabela apropriada (Anexo A).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP/100mL) de coliformes fecais/*E. coli* em 100mL de amostra, os tubos positivos para coliformes totais (com coloração amarela) foram expostos à luz ultravioleta (360nm de comprimento de onda) para a verificação de fluorescência azul, o que indica positividade para coliformes fecais/*E. coli*. A partir dos tubos positivos, ou seja com fluorescência, calculou-se o NMP/100mL utilizando-se a tabela apropriada (Anexo A).

#### **4.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de enterococos.**

Para determinação da presença (NMP/100mL – número mais provável em 100 mL de amostra) de enterococos foi empregada a técnica de tubos múltiplos específica, nas provas presuntiva e confirmatória, seguindo as orientações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1978b).

Para a prova presuntiva foi inoculada uma alíquota de 10 mL de amostra em cada um de dez tubos contendo caldo azida dextrose preparado em concentração dupla. Os tubos inoculados foram incubados em estufa à temperatura entre 35 - 37°C. Após 24 h e novamente

após 48 h de incubação, os tubos foram examinados e o aparecimento de turbidez constituiu teste presuntivo positivo.

Para o teste confirmatório foi inoculado 0,1mL da cultura dos tubos positivos na prova presuntiva em tubos correspondentes contendo caldo etil violeta azida. A presença de enterococos foi confirmada pelo aparecimento de precipitação roxa após 48 h de incubação a 35 - 37°C.

A partir do número de tubos positivos na prova confirmatória calculou-se o número mais provável de enterococos (NMP/100mL) empregando-se tabela apropriada (Anexo A).

#### **4.2.3 Determinação do número mais provável (NMP) de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Para determinação da presença (NMP/100mL – número mais provável em 100 mL de amostra) de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada a técnica de tubos múltiplos específica, seguindo as orientações da American Public Health Association (1998).

Para o teste presuntivo foram inoculadas alíquotas de 10 mL, da amostra em cada um de dez tubos contendo caldo asparagina em concentração dupla. Os tubos inoculados foram incubados em estufa à temperatura entre 35 - 37°C. Após 24 h e novamente após 48 h de incubação, os tubos foram examinados sob luz ultravioleta (360nm de comprimento de onda) em uma câmara escura. O aparecimento de pigmento esverdeado fluorescente constituiu teste presuntivo positivo.

Para o teste confirmatório foram inoculados 0,1mL da cultura dos tubos positivos em tubos contendo caldo acetamida. A reação confirmatória positiva é dada pelo desenvolvimento de pH elevado indicado pela coloração púrpura em 24 a 36 h de incubação a 35 - 37°C.

A partir dos tubos positivos na prova confirmatória calculou-se o número mais provável de *Pseudomonas aeruginosa* (NMP/100mL) empregando-se tabela apropriada (Anexo A).

#### **4.2.4 Contagem de bactérias heterotróficas.**



Para contagem de bactérias heterotróficas foi utilizada a técnica de cultivo em profundidade empregando-se placas em duplicata, seguindo as orientações da American Public Health Association (1998) e Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1978a).

Em cada placa foi distribuído 1,0mL da amostra, em seguida adicionou-se o meio Plate Count Agar (PCA) fundido e resfriado; e as placas foram homogeneizadas e incubadas em posição invertida, por  $72 \pm 3$  h a  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ .

Após a incubação, foi realizada a leitura do número de colônias nas duas placas e calculou-se a média das contagens obtidas, o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificação da qualidade microbiológica da água mineral, quanto aos parâmetros coliformes totais e fecais/*E. coli*, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa*, foram adotados os padrões estabelecidos pela Resolução RDC nº 54 de 15 de junho de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural (BRASIL, 2000). A Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, que estabelece a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004), foi adotada como base para o padrão referente a bactérias heterotróficas que não é adotado pela legislação para água mineral.

De acordo com a Resolução nº 54, na fonte, poço ou local de surgência e na sua comercialização, a água mineral natural não deve apresentar risco à saúde do consumidor (ausência de microrganismos patogênicos) e estar em conformidade com as características microbiológicas descritas no quadro dos critérios microbiológicos (Anexo B), (BRASIL, 2000).

Os resultados das análises microbiológicas estão apresentados na tabela 1 que expressa respectivamente o número mais provável de bactérias (NMP/100mL) coliformes totais, coliformes fecais/*E.coli*, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e a contagem de bactérias heterotróficas, expressa em UFC/mL. Observa-se a ausência de coliformes fecais/*E. coli* em todas as amostras, 2 amostras (2,9%) apresentaram coliformes totais, 2 amostras (2,9%) apresentaram enterococos, 3 amostras (4,3%) apresentaram *Pseudomonas aeruginosa* e 40 amostras (58%) apresentaram contagem de bactérias heterotróficas maior que 500 UFC/mL.

Nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 são apresentados os resultados obtidos referentes ao número e porcentagem de amostras e marcas estudadas que atenderam ou não ao padrão estabelecido, em relação à coliformes totais, coliformes fecais/*E. coli*, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas.

Tabela 1 - NMP/mL de coliformes totais, coliformes fecais/*E.coli*, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostras de água mineral em garrafas de 330 à 600mL, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

Marca	Amostra	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Fecais/ <i>E.coli</i> (NMP/mL)	Enterococos (NMP/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/mL)	Bactérias Heterotróficas (UFC/mL)
A	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	4300
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
B	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	910
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3.000
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	250
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	260
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3.600
C	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
D	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6.500
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1.400
E	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	6
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
F	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6.500
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1400
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500

Marca	Amostra	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Fecais/ <i>E.coli</i> (NMP/mL)	Enterococos (NMP/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/mL)	Bactérias Heterotróficas (UFC/mL)
G	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	2000
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	4800
	5	<1,1	<1,1	1,1	1,1	1800
H	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1100
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	5300
	5	<1,1	<1,1	2,2	<1,1	3600
I	1	<1,1	<1,1	<1,1	>23,0	2100
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	3	<1,1	<1,1	<1,1	1,1	3700
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
J	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	2400
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	2200
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3400
K	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	2	1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	4	9,2	<1,1	<1,1	<1,1	2400
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1800
L	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3200
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	540
	4	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1300
	5	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1100
M	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
N	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
O	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
P	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
Q	1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>6500
	3	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3500

## 5.1 Coliformes Fecais/*E.coli*

De acordo com a tabela 2 verifica-se que todas as amostras de todas as marcas (100%) atenderam ao padrão para coliformes fecais/*E.coli*, ou seja, ausência deste grupo microbiano. Esses resultados também foram observados nos estudos realizados por Alves et al. (2002); Cabrini e Gallo (2001); Coelho et al. (1998); David et al. (1999); Eiroa et al. (1996); Farache Filho et al. (2003); Nascimento et al. (2000); Reis et al. (2006); Sabioni e Silva (2006); Guo-Jane Tsai e Shou-Chin Yu (1997); Wendpap et al. (1999). Entretanto, Farache Filho et al. (2005) em 2,4% das amostras e Sant´Ana et al. (2003) em 20,4%, constataram a presença de coliformes fecais.

Tabela 2 – Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para coliformes fecais/*E.coli*, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

Resultados	Amostras		Marcas	
	Nº	%	Nº	%
Não atenderam	-	-	-	-
Atenderam	69	100	17	100
Total	69	100	17	100

Nota: Sinais convencionais utilizados:  
- valor nulo

A enumeração de coliformes fecais/*E. coli* é importante, pois sua presença indica a possibilidade de ocorrência de outros microrganismos patogênicos entéricos na água e a possibilidade de contaminação fecal. Por outro lado, alguns sorotipos de *E. coli* são responsáveis por gastroenterites, tendo a diarreia como o principal sintoma. (SILVA, 2000).

Entretanto, resultado negativo de coliformes fecais não significa ausência de contaminação fecal porque esse resultado é influenciado pelo número e tamanho da amostra, sensibilidade da metodologia, quantidade presente de coliformes, interação sinérgica com *Pseudomonas aeruginosa*, além de haver cepas de *Salmonella* mais resistentes do que os coliformes (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

## 5.2 Coliformes totais

Verifica-se na tabela 3 que 2 amostras (2,9%) de 1 marca (5,9%) foram positivas para coliformes totais, não atendendo ao padrão da legislação. Esses resultados positivos em 2,9% das amostras são inferiores aos encontrados por Alves et al. (2002) em 5,6% das amostras; Cabrini e Gallo (2001) em 9,5%; Coelho et al. (1998) em 33%; David et al. (1999) em 50%; Farache Filho et al. (2005) em 15,5%; Sant'Ana et al. (2003) em 25%; Wendpap et al. (1999) em 11,7%. Entretanto, em pesquisas realizadas por Eiroa et al. (1996); Farache Filho et al. (2003); Nascimento et al. (2000); Reis et al. (2006); Sabioni e Silva (2006); Guo-Jane Tsai e Shou-Chin Yu (1997), não foram encontradas amostras positivas para coliformes totais.

Tabela 3 - Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para coliformes totais, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

<b>Resultados</b>	<b>Amostras</b>		<b>Marcas</b>	
	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Não atenderam</b>	2	2,9	1	5,9
<b>Atenderam</b>	67	97,1	16	94,1
<b>Total</b>	69	100	17	100

A presença de coliformes nas águas engarrafadas evidencia que houve uma contaminação de origem externa visto que estas bactérias não fazem parte da composição do produto (WENDPAP et al., 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a). Esta contaminação pode ter ocorrido na fonte, no envase, no transporte ou armazenamento no caso da embalagem não ser absolutamente estanque (WENDPAP et al., 1999).

A presença de coliformes totais na água mineral pode indicar ausência de cuidados sanitários, problemas nas operações de captação, canalização, filtração, envasamento ou outros que possam alterar as propriedades características e a composição das mesmas (COELHO et al., 1998). Isso demonstra certa vulnerabilidade do sistema industrial frente às contaminações, o que não é desejável (CABRINI; GALLO, 2001).

A presença de coliformes totais em duas amostras de uma mesma marca demonstra a possibilidade de ocorrência de problemas em uma determinada fonte e/ou indústria

engarrafadora, indicando a necessidade de cuidados na proteção da fonte e/ou melhorias nas condições higiênicas durante as etapas do processo.

### 5.3 Enterococos

De acordo com a tabela 4 observa-se que 2 amostras (2,9%), de 2 marcas (11,8%) apresentaram enterococos, não estando, portanto, de acordo com a legislação vigente. Esses resultados positivos em 2,9% das amostras são inferiores aos encontrados por Amaral et al. (2005) em 18% das amostras. Estudos realizados por Cabrini e Gallo (2001); Eiroa et al. (1996); Sabioni e Silva (2006); Sant´Ana et al. (2003); Guo-Jane Tsai e Shou-Chin Yu (1997), não encontraram a presença de enterococos nas amostras de água mineral analisadas.

Tabela 4 - Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para enterococos, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

<b>Resultados</b>	<b>Amostras</b>		<b>Marcas</b>	
	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Não atenderam</b>	2	2,9	2	11,8
<b>Atenderam</b>	67	97,1	15	88,2
<b>Total</b>	69	100	17	100

A utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal apresenta algumas restrições, pois eles também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Além disso, apresentam uma sobrevivência na água, maior do que os coliformes e a maioria dos patógenos entéricos (MCFETERS et al., 1974).

Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Além disso, os enterococos são mais tolerantes às condições ambientais que os coliformes, sendo interessante seu uso como indicativo da presença de enterovírus (LEITÃO et al., 1988; MOSSEL, 1976).

Portanto, a presença de enterococos em águas minerais como foi detectado nessas amostras indica a necessidade de intensificação de cuidados nas indústrias engarrafadoras para evitar a presença desses microrganismos no produto final, pois podem causar danos à saúde dos consumidores.

#### 5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 5 – Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para *Pseudomonas aeruginosa*, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

Resultados	Amostras		Marcas	
	Nº	%	Nº	%
<b>Não atenderam</b>	3	4,3	2	11,8
<b>Atenderam</b>	66	95,7	15	88,2
<b>Total</b>	69	100	17	100

Na tabela 5 observa-se que em 3 amostras (4,3%) de 2 marcas (11,8%) foi detectada a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, estando fora do padrão estabelecido pela legislação. Esses resultados positivos em 4,3% das amostras são inferiores aos encontrados por David et al. (1999) em 50% das amostras; Eiroa et al. (1996) em 60%; Farache Filho et al. (2003) em 4,5%; Farache Filho et al. (2005) em 9,5%; Guilherme et al. (2000) em 22,7%; Nascimento et al. (2000) em 50%; Sabioni e Silva (2006) em 14%; Entretanto, esses resultados são superiores aos encontrados por Guo-Jane Tsai e Shou-Chin Yu (1997) em 2,9% das amostras; na pesquisa de Cabrini e Gallo (2001) não foi encontrada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em nenhuma das amostras de água mineral analisadas.

A presença da *P. aeruginosa* em água mineral não é aceitável por ser um patógeno oportunista capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos (HUNTER, 1993).



Apesar do poder medicinal das águas minerais muitas vezes ser apenas resultado de campanhas promocionais (RIEDEL, 1992), segundo Rosenberg (2003) as águas minerais são recomendadas para doenças do rim, assim como para problemas urinários e do coração, portanto, são consumidas por indivíduos imunocomprometidos, para quem a ingestão de bactérias oportunistas não é aconselhável.

A presença de elevados números de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável, principalmente em água engarrafada, pode estar relacionado a mudanças no paladar, odor e turbidez dessas águas (STICKLER, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a).

*Pseudomonas aeruginosa* apresenta maior resistência do que os microrganismos patogênicos, sendo capaz de inibir as bactérias do grupo coliforme (GUILHERME et al., 2000). Isto pode ter ocorrido nesta pesquisa, pois verificou-se que todas as amostras contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa* não apresentaram contaminação por coliformes.

A presença de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral da mesma marca pode ser explicada pela capacidade de aderência a superfícies que este microrganismo apresenta, pois de acordo com Hunter (1993); McFeters et al. (1974); Schimdt-Lorenz (1976), no primeiro contato de *Pseudomonas aeruginosa* com a linha de engarrafamento, pode haver colonização dos tanques ou de outras partes, de modo a fornecer uma contaminação constante para as águas que passem por esse ponto. Assim, podendo formar focos de contaminação em diversos pontos da linha que, se não forem removidos por um programa adequado de limpeza e sanitização do sistema de adução e engarrafamento podem propiciar a presença da bactéria no produto final (EIROA et al., 1996).

O fato de que outras amostras da mesma marca não estavam contaminadas, pode ser explicado pela diferença na época de amostragem e porque os focos de contaminação foram eliminados através de limpeza correta. Eiroa et al. (1996), ao avaliarem as características microbiológicas de 92 amostras de água mineral em diferentes pontos da linha de envase de quatro indústrias engarrafadoras no Estado de São Paulo, observaram que, dependendo da época de amostragem, *P. aeruginosa* estava presente ou ausente nas fontes e que mesmo não havendo a contaminação da fonte por este microrganismo, ocasionalmente a bactéria esteve presente nas envasadoras e produto final.

A presença desse microrganismo em águas engarrafadas pode ser explicada por sua capacidade de aderência a superfície das garrafas e por sua grande capacidade de proliferar em água destilada e águas minerais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Portanto, são necessárias medidas adicionais de controle na proteção da fonte e na limpeza do sistema de adução e engarrafamento para garantir ausência de *Pseudomonas aeruginosa* no produto final.

## 5.5 Bactérias heterotróficas

Apesar da inexistência de padrão na legislação brasileira para águas minerais, no que se refere a bactérias heterotróficas, as amostras foram submetidas a essa análise, para avaliar as condições higiênico-sanitárias das águas minerais que, muito provavelmente, poderão refletir as condições da matéria prima, do ambiente e do pessoal envolvido na produção. Observou-se que vários outros autores também utilizaram esses microrganismos como parâmetro de qualidade para água mineral em suas pesquisas.

Verifica-se na tabela 6 que 40 amostras (58%) de 12 marcas (70,6%) apresentaram contagens elevadas (>500UFC/mL) para bactérias heterotróficas, estando em desacordo com o padrão utilizado como base nesta pesquisa, que estabelece o limite de 500 UFC/mL para água de consumo humano proveniente de sistemas de abastecimento público. Esses resultados positivos em 58% das amostras são superiores aos encontrados por Cabrini e Gallo (2001) em 38% das amostras; Farache Filho et al. (2003) em 38,1%; Nascimento et al. (2000) em 50%; Reis et al. (2006) em 20%; Sabioni e Silva (2006) em 50% e inferiores aos resultados encontrados por Farache Filho et al. (2005) em 62% das amostras.

Tabela 6 – Número e porcentagem de amostras nas diferentes marcas de água mineral em garrafas de 330 a 600mL, que atenderam e não atenderam ao padrão para bactérias heterotróficas, comercializadas na cidade de Araraquara – SP. No período de jul. a dez. de 2006.

Resultados	Amostras		Marcas	
	Nº	%	Nº	%
<b>Não atenderam</b>	40	58	12	70,6
<b>Atenderam</b>	29	42	5	29,4
<b>Total</b>	69	100	17	100

A maioria das bactérias heterotróficas, geralmente, não é patogênica. Entretanto alguns membros desse grupo, incluindo *Legionella* spp., *Micobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., podem ser patógenos oportunistas (QUIROZ, 2002).

Como as águas minerais engarrafadas são consumidas sem qualquer tratamento, contagens elevadas de heterotróficos podem indicar a possível presença de patógenos,

especialmente formas resistentes a múltiplos antibióticos, o que pode representar sério risco a saúde de indivíduos imunocomprometidos (JEENA et al., 2006).

Os microrganismos heterotróficos presentes na água, quando em grande número, além de representarem um risco à saúde, podem ocasionar outros problemas, tais como: deterioração da qualidade da água, com desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis e, ainda, formação de limo ou películas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a).

Algumas bactérias heterotróficas podem exercer influência inibidora sobre alguns organismos, podendo impedir a detecção de coliformes, seja devido à produção de fatores de inibição, seja por um desenvolvimento mais intenso destes organismos, sobrepujando uma menor população de coliformes (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a). Estudos realizados revelaram que quando a contagem deste grupo aumenta até um nível de 500UFC/mL, a frequência na detecção de coliformes também aumenta; porém, quando a população bacteriana excede a 1000UFC/mL, a frequência na detecção de coliformes decresce (BURBARELLI, 2004; COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1978a). A maioria das amostras analisadas neste trabalho apresentaram contagem de heterotróficos acima de 1000UFC/mL, o que pode representar a inibição da detecção de coliformes e conseqüentemente a possível presença de contaminação fecal e de enteropatógenos.

A contagem de bactérias heterotróficas em águas minerais deve ser realizada com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial (SABIONI; SILVA, 2006).

Devido aos problemas causados pelas altas contagens de heterotróficos em água mineral e para se avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial, seria interessante a inclusão desse parâmetro na legislação brasileira para água mineral de forma a fornecer água mais segura para o consumidor. No entanto, o fato da água mineral apresentar microrganismos autóctones que variam conforme a fonte e se multiplicam após o engarrafamento, dificulta o estabelecimento de limites.

De acordo com Morais e Costa (1990) as características das fontes influenciam a população bacteriana das águas minerais. No entanto, limites sugeridos de 500 UFC/mL para água mineral são problemáticos, já que a água de diferentes fontes terão diferentes quantidades de matéria orgânica (ROSENBERG, 2003). A Comunidade Econômica Européia estabelece limites para a contagem a 20-22 °C de 100 microrganismos/mL e a 37°C de 20 microrganismos/mL, exclusivamente para a água na fonte ou 12 horas após o engarrafamento

e armazenamento a 4°C. Por outro lado o Codex Alimentarius considera que o valor máximo para contagem por mL da água na fonte ou em pontos críticos de controle a 20-22°C e a 37°C depende das características da fonte ou dos limites determinados pela autoridade local (EIROA et al., 1997).

Em nossa opinião o limite de 500 UFC/mL estabelecido pela legislação para água de consumo humano, pode ser adotado também para as águas minerais após o engarrafamento, pois independente da característica da fonte, é um limite considerado seguro para não causar danos a saúde humana e deterioração da água.

Entretanto, para diminuir as elevadas contagens de heterotróficos e melhorar a qualidade do produto que chega aos consumidores é preciso controlar a multiplicação dessas bactérias autóctones e reduzir o risco de contaminação no processo de engarrafamento.

A primeira medida seria melhorar as condições higiênicas do pessoal, das embalagens e tampas e dos equipamentos usados no processo de engarrafamento, com isso além de diminuir a quantidade de matéria orgânica que entra em contato com a água e assim possivelmente reduzir a população dos microrganismos autóctones, também evita-se contaminações. Para Eiroa et al. (1996) a multiplicação dos microrganismos em água engarrafada é devido ao contato com compostos orgânicos, que podem estar presentes em tubulações, reservatórios ou nas embalagens e tampas.

A fotodegradação da matéria orgânica dissolvida é um fenômeno comum. Assim a exposição à luz do dia estimula a multiplicação dos microrganismos, já que substâncias complexas podem tornar-se biodisponíveis (LECLERC; MOREAU, 2002). É preciso estar atento a este fato, já que muitas vezes as garrafas de água mineral são armazenadas em áreas não protegidas da luz do sol o que favorece esta multiplicação.

A temperatura também é um fator importante para a multiplicação das bactérias após o engarrafamento, pois a temperatura durante o período de estocagem é geralmente maior que na fonte (SCHIMDT-LORENZ, 1976). Se a água é estocada em temperatura ambiente, como é comum nos mercados e residências, em apenas alguns dias as contagens bacterianas atingirão concentrações elevadas como  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL, a refrigeração retarda esse processo (ROSENBERG, 2003). Outro problema da estocagem em temperatura ambiente é que, todas as bactérias patogênicas são mesófilas (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Estudos realizados por Eiroa et al. (1997) em amostras de água mineral em temperatura ambiente, encontraram um aumento da população dos microrganismos heterotróficos nos primeiros 30 dias de armazenamento para depois diminuir de maneira irregular e ficar aproximadamente constante até completar 6 meses de observação. Uma medida para prevenir isso seria o

armazenamento em baixas temperaturas nos mercados e nas casas, o que diminuiria a multiplicação dos autóctones e impediria a multiplicação dos patogênicos; também poderia ser utilizado o binômio tempo/temperatura, diminuindo a temperatura e o tempo de estocagem podendo retardar a multiplicação microbiana.

Vários autores explicaram essa multiplicação após o engarrafamento devido ao fato das bactérias aderirem a superfície das garrafas (BISCHOFBERGER et al., 1990; JAYASEKARA et al., 1998; SCHIMDT-LORENZ, 1976; ZOBELL; ANDERSON, 1936). Para Bischofberger et al. (1990); Schimdt-Lorenz (1976), a explicação para isto é que os nutrientes presentes em baixas concentrações são adsorvidos e concentrados na superfície, assim estão mais disponíveis para as bactérias que, provavelmente, fixam-se na superfície. Jayasekara et al. (1998) consideram que a aderência à superfície interna das garrafas pode explicar o longo tempo de sobrevivência dos microrganismos na água mineral. Para Zobel e Anderson (1936) as garrafas pequenas podem facilitar ainda mais a multiplicação das bactérias devido ao maior contato da água com a área superficial do recipiente. Nos estudos feitos por Cabrini e Gallo (2001) foi observado que todas as amostras de 500 mL apresentaram elevadas contagens de heterotróficos, o que sugere maiores cuidados com relação às condições higiênicas das garrafas utilizadas principalmente as de pequeno volume, a fim de assegurar a boa qualidade do produto.

Principalmente em ambientes com poucos nutrientes é uma tendência normal das células microbianas, quando elas entram em contato com uma superfície sólida, fixarem na superfície para competir eficientemente com outras células microbianas por espaço e nutrientes para resistir a qualquer condição ambiental desfavorável, resultando assim em formação de biofilme (JONES et al., 1999; RAY, 1996). Para Jones et al. (1999) a rugosidade da superfície do frasco é muito importante na determinação da adesão da bactéria à superfície. O uso de garrafas menos rugosas como o PET e o vidro poderiam diminuir essa adesão a superfície.

Estudos têm mostrado que as bactérias geralmente ocorrem em maior número nas garrafas plásticas do que nas de vidro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000b). Para Coelho et al. (1998); Rosenberg (2003) isso ocorre devido à característica do plástico em permitir a passagem de O<sub>2</sub>. Os nutrientes liberados do plástico são também um possível contribuinte para o aumento da multiplicação bacteriana na água (ROSENBERG, 2003). Leclerc e Moreau (2002); Bischofberger et al. (1990), concluíram que a principal causa das baixas contagens de colônias da mesma água mineral, em garrafas de vidro mecanicamente limpas do que nas garrafas plásticas foi devido

ao efeito bacteriostático dos agentes de limpeza residual. O uso de garrafas de vidro pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade das águas minerais.

Quando um organismo muda de um ambiente para outro, ele pode sofrer transformações. Cada adaptação pode favorecer que o microrganismo sobreviva no novo ambiente (ROSENBERG, 1998). Isso poderia explicar o longo tempo de sobrevivência dos microrganismos após o engarrafamento e sua grande capacidade de multiplicação.

Neste estudo foram encontradas algumas amostras da mesma marca com altas contagens de heterotróficos e outras não, isso pode ter ocorrido devido a um maior cuidado sanitário no processo, o que não possibilitou que os microrganismos presentes na fonte após o engarrafamento se multiplicassem ou não permitiu que ocorresse contaminação durante o engarrafamento, pois segundo Leclerc e Moreau (2002) não se sabe exatamente se essa multiplicação das bactérias na água depois do engarrafamento é devido à ressuscitação de um grande número de células dormentes não cultiváveis presente na fonte de água ou no sistema de engarrafamento, ou se ela é resultado da divisão celular e multiplicação de poucas células cultiváveis inicialmente presente.

Nesta pesquisa observou-se que, das 69 amostras analisadas, apenas 6 amostras (8,7%) de 4 marcas (23,5%) apresentaram-se contaminadas com um ou mais dos indicadores especificados pela legislação brasileira para águas minerais. Entretanto, considerando os padrões para água mineral e o padrão para bactérias heterotróficas estabelecido pela legislação para água de consumo humano, 40 amostras (58%) de 12 marcas (70,6%) apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões. Isto mostra que a maioria das águas apesar de estarem em acordo com os padrões da legislação para águas minerais, apresentaram contagens elevadas para bactérias heterotróficas apresentando, portanto, qualidade duvidosa para consumo humano.

Para garantir uma água mineral de boa qualidade é necessário proteger as fontes, ter rigorosos cuidados higiênico-sanitários com o ambiente e o pessoal envolvidos na produção, com todos os equipamentos usados durante o processo de engarrafamento e dos reservatórios de estocagem e também com as embalagens e tampas.

A implantação de sistemas de controle como, Boas Práticas de Fabricação (BPF's) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) podem garantir que as propriedades da água mineral sejam mantidas, pois estes sistemas estabelecem pontos de monitoramento em toda a produção (LIMA, 2003).

É também fundamental a conscientização do distribuidor quanto ao armazenamento, e do consumidor quanto ao seu direito em adquirir um produto de boa qualidade (WENDPAP et

al., 1999). É necessário também que se tenham fiscalizações mais efetivas por parte dos órgãos responsáveis, tanto nas fábricas quanto nos pontos de distribuição.

## 6 CONCLUSÕES

Todas as sessenta e nove amostras estudadas (100%) e todas as dezessete marcas (100%) atenderam ao padrão para coliformes fecais/*E.coli*.

Duas amostras (2,9%) de uma marca (5,9%) foram positivas para coliformes totais, não atendendo ao padrão da legislação em vigor.

Duas amostras (2,9%), de duas marcas (11,8%) foram positivas para enterococos, não atendendo ao padrão estabelecido pela legislação em vigor.

Três amostras (4,3%) de duas marcas (11,8%) apresentaram *Pseudomonas aeruginosa*, estando fora do padrão estabelecido pela legislação.

De acordo com o padrão para bactérias heterotróficas utilizado nesta pesquisa, quarenta amostras (58%) de doze marcas (70,6%) apresentaram contagens acima de 500UFC/mL.

Verificou-se que, das 69 amostras analisadas seis (8,7%) apresentaram-se contaminadas com um ou mais dos indicadores estabelecidos pela legislação brasileira para águas minerais, utilizados nessa pesquisa.

Considerando os padrões para água mineral utilizados nessa pesquisa e o padrão para bactérias heterotróficas estabelecido pela legislação para água de consumo humano, quarenta amostras (58%) de doze marcas (70,6%) podem estar inadequadas para consumo humano.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, S.P. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n. 6, p.749-751, 2002.

AMARAL, L. A.; GIACOMETTI, L.; MUTTON, M. J. R. Qualidade microbiológica de águas minerais vendidas no município de Jaboticabal-SP. **Hig. Alim.**, v.19, n.133, p.58-62. 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: APHA, 1998. p.9-140.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS. **Mercado**. Disponível em: <<http://www.abinam.com.br/site/artigos.asp?pg=artigo02>>. Acesso em: 20 nov. 2006a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS. **Setor de água mineral continua em franca expansão no país**. Disponível em: <<http://www.abinam.com.br/032004not04.asp>>. Acesso em: 2 abr. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS. **Versatilidade impulsiona o uso do PET no mercado de águas**. Disponível em: <<http://www.abinam.com.br/032004not08.asp>>. Acesso em: 20 nov. 2006b.

BAUDIZSOVA, D. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. **Wat. Sci. Tech.**, v.35, p.333-336, 1997.

BISCHOFBERGER, T.; CHA, S. K.; SCHMITT, R.; KONIG, B.; SCHMIDT-LORENZ, W. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. **Int. J. Food Microbiol.**, v.11, p.51-71, 1990.

BRASIL. Resolução nº 54, de 15 de junho de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jun. 2000, Seção 1.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Legislação para águas de consumo humano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de mar. 2004. Seção 1.

BURBARELLI, R. C. **Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em área irrigada com efluente de lagoa anaeróbia.** 2004. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas. **Hig. Alim.**, v.15, n.90/91, p.83-92, 2001.

CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne diseases.** California: Academic Press, 1990. 395p.

COELHO, D. L.; PIMENTEL, I. C.; BEUX, M. R. Uso do método cromogênico para quantificação do NMP de bactérias do grupo coliforme em águas minerais envasadas. **Bol. CPPA**, v.16, n.1, p.45-54, 1998.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Contagem padrão de colônias de bactérias.** São Paulo, 1978a. 11p. (Normalização Técnica – L5.201).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Determinação do N.M.P. de Streptococos fecais pela técnica de tubos múltiplos.** São Paulo, 1978b. 12p. (Normalização Técnica – L5.205).

CONBOY, M. J.; GOSS, M. J. Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. **Water, Air, and Soil Pollution.** v.129, p.101–118, 2001.

COSTA E SILVA, A. C. da. Polêmica: saneamento com novas regras. **Rev. CONFEA.** nov/dez 2001. Disponível em: <<http://www.confea.org.br/revista>>. Acesso em : 30 jan. 2007.

CSUROS, M.; CSUROS, C. **Microbiological examination of water and wastewater.** Florida: Lewis, 1999. 324p.

DAVID, P. R. B. S.; MENDES, A. C. R.; CUNHA NETO, A. da.; COSTA, S. M. S. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento de alguns pontos da cidade do Recife, PE. **Hig. Alim.**, v.13, n.60, p.36-42, 1999.

DEFIVES, C.; GUYARD, S.; OULARÉ, M. M.; MARY, P.; HORNEZ, P. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a french mineral water: a case study. **J. Appl. Microbiol.**, v.86, n.6, p.1033, 1999.

EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A. Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 1996.

EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A. Variação da microbiota natural e de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral não carbonatada embalada em diferentes materiais durante o armazenamento a 30°C ± 1°C. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n.2, p.167-171, 1997.

FARACHE FILHO, A.; DIAS, M. F. F.; LUIZ, T. F.; DUQUE, J. G. Qualidade microbiológica em águas minerais envasadas em garrações de 20 litros, comercializadas nas cidades de Araraquara e Américo Brasiliense-SP. In: CONGRESSO PAULISTA DE SAÚDE PÚBLICA, 9, 2005, Santos. **Resumos...** Ribeirão Preto: Associação Paulista de Saúde Pública, 2005. 1 CD-ROM.

FARACHE FILHO, A.; TAROMARU, P. H.; DIAS, M. F. F.; DUQUE, J. G. Qualidade sanitária de águas minerais em embalagens de 1,5 litros, comercializadas na cidade de Araraquara-SP. In: CONGRESSO PAULISTA DE SAÚDE PÚBLICA, 8, 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: Associação Paulista de Saúde pública, 2003. 1 CD-ROM.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.

FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of Cryptosporidial Oocysts and Giardia Cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of Sao Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.2, p.205-207, 2002.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4<sup>a</sup> ed. Zaragoza : Acribia, 1993. 681p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. A água: um problema de segurança nacional. **Hig. Alim.**, v.15, n.90/91, p. 15-18, 2001.

GIOMBELLI, A.; RECH, H.; TORRES, V. S. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da Região do Alto Uruguai Catarinense. **Hig. Alim.**, v.12, n.56, p.49-51, 1998.

GONZALEZ, C.; GUTIERREZ, C.; GRANDE, T. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. **Can. J. Microbiol.**, v.33, n.12, p.1120-1125, 1987.

GUILHERME, E. F. M.; SILVA, J. A. M. da.; OTTO, S. S. *Pseudomonas aeruginosa*, como indicador de contaminação hídrica. **Hig. Alim.**, v.14, n.76, p.43-47, 2000.

GUO-JANE TSAI; SHOU-CHIN YU. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. **Int. J. Food Microbiol.**, v.37, p.137-143. 1997.

HILUY, D. J.; PERDIGÃO, G. de O.; ARAGÃO, M. A. P.; PEIXOTO, T. de J. Avaliação da qualidade das águas minerais comercializadas em Fortaleza. **Hig. Alim.**, v.8, n.33, p.17, 1994.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 376p.

HUI, Y. H. et al. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. New York: M. Dekker, 1994.

HUNTER, P. R. A. Review: the microbiology of bottled natural mineral waters. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 74, p. 345-352. 1993.

JAYASEKARA, N. Y.; HEARD, G. M.; COX, J. M.; FLEET, G. H. Populations of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. **Food Microbiol.**, v.15, p.167-176, 1998

JEENA, M. I.; DEEPA, P.; MUJEEB RAHIMAN, K. M.; SHANTHI, R. T.; HATHA, A. A. M. Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v.209, p.191-196, 2006.

JONES, C. R.; ADAMS, M. R.; ZHDAN, P. A.; CHAMBERLAIN, A. H. L. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. **J. Appl. Microbiol.**, v.86, p.917-927, 1999.

LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.26, p.207-222, 2002.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. **Int. J. Food Microbiol.**, v.53, p. 153-158, 1999.

LEITÃO, M. F. F. et al. (Ed). **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 186p.

LESER, W. S. et al. **Elementos de epidemiologia geral**. São Paulo: Atheneu, 1988. 177p.

LIMA, C. C. **Industrialização da água mineral**. 2003. 65f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás-UCG, Goiânia-GO, 2003.

MACÊDO, J. A. B. de. **Águas & águas**. São Paulo: Varela, 2001. 263p.

MACIEL FILHO, A. A. et al. Interfaces da Gestão de Recursos Hídricos e Saúde Pública. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/interfaces.pdf>> Acesso em: 4 mar. 2007.

MASSA, S.; BROCCHI, G. F.; PERI, G.; ALTIERI, C.; MAMMINA, C. Evaluation of recovery methods to detect faecal streptococci in polluted waters. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.32, p.298-302, 2001.

MCFETERS, G. A.; BISSONNETTE, G. K.; JEZESKI, J. J.; THOMSON, C. A.; STUART, D. G. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. **Appl. Microbiol.**, v.27, n.5, p.823-829, 1974.

MORAES, D. S. de L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MORAIS, P. V.; COSTA, M. S. da. Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. **J. Appl. Bact.**, v.69, n.5, p.750-757. 1990.

MOSSEL, D. A. Various taxo- and ecogroups of bacteria as index organisms for the enteric contamination of bottled waters: their significance and enumeration. **Ann. Ist. Super. Sanita**, v.12, p. 177-190, 1976.

NASCIMENTO, A. R.; AZEVEDO, T. K. L.; MENDES FILHO, N. E.; ROJAS, M. O. A. I. Qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na cidade de São Luís-MA. **Hig. Alim.**, v. 14, n. 76, p. 69-72, 2000.

NISHIARA, L.; ALABURDA, J.; MAIO, F. D. Características físico-químicas das águas de fontes minerais da região da grande São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.57, n. 2, p. 19-25, 1998.

NSANZE, H.; BABARINDE, Z. Microbiological quality of bottled drinking water in the UAE and effect of storage at different temperatures. **Environ. Int.**, v.25, p.53-57, 1999.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA-UNESCO. **A ética do uso da água doce**: um levantamento. 2001. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001271/127140por.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2007.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Água e Saúde**. Disponível em : <<http://www.opas.org.br/ambiente/UploadArq/água.pdf> >. Acesso em: 6 nov. 2006b.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dia interamericano da água**. Disponível em: <[http://www.opas.org.br/ambiente/UploadArq/DIAA-tema\\_port\\_1.pdf](http://www.opas.org.br/ambiente/UploadArq/DIAA-tema_port_1.pdf) >. Acesso em: 6 nov. 2006a.

PELCZAR JUNIOR, M. J. et al. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v.2. 517p.

PONTES, C. A. A.; SCHRAMM, F. R. Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável. Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.5, p. 1319-1327, set./out. 2004 ?pag?

QUINTELA, M. M. Saberes e práticas termais: uma perspectiva comparada em Portugal (Termas de S. Pedro do Sul) e no Brasil (Caldas da Imperatriz). Rio de Janeiro. **Hist. Ciênc. Saúde-Manguinhos**, v.11, suppl. 1, p. 239-260, 2004.

QUIROZ, C. C. Água embotellada y su calidad bacteriológica. **Água Latinoamérica**. Set/out. 2002. Disponível em: <<http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/9-10-02aguaemb.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2007.

RAMALHO, R.; AFONSO, A.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Survival characteristics of pathogens inoculated into bottled mineral water. **Food Control**, v.12, p.311-316. 2001.

RAMIRES, I.; GREC, R. H. da C.; CATTAN, L.; MOURA, P. G. de. Avaliação da concentração de flúor e do consumo de água mineral. **Rev. Saúde Pública**, v.38, n.3, p.459-465, 2004.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton : CRC Press, 1996. 516p.

REIS, J. A. dos.; HOFFMANN, P.; HOFFMANN, F. L. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, em amostras de águas minerais envasadas, comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. **Hig. Alim.**, v.20, n.145, p.109-116, 2006.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1992. 320p.

ROSENBERG, E. (Ed.). **Microbial ecology and infectious disease**. Washington, DC: ASM Press, 1998. 319p.

ROSENBERG, F. A. The microbiology of bottled water. **Clin. Microbiol. Newslett.**, v.25, n.6, p.41-44, 2003.

ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e saúde**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 570p.

SABIONI, J. G.; SILVA, I. T. Qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em Ouro Preto, MG. **Hig. Alim.**, v.20, n.143, p.72-78. 2006.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. 2<sup>nd</sup>ed. Washington, DC: ASM Press, 2002. 539p.

SANT'ANA, A.; SILVA, S. C. F. L.; FARANI, I. O. Jr.; AMARAL, C. H. R.; MACEDO, V. F. Qualidade Microbiológica de águas minerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.23 suppl, p.190-194, 2003.

SCHMIDT-LORENZ, W. Microbiological characteristics of natural mineral water. **Ann. Ist. Super Sanita**, v.12, p. 93-112, 1976.

SCHRAFT, H.; WATTERWORTH, L. A. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> plates with standard plating procedures. **J. Microbiol. Methods**, v.60, p.335-342, 2005.

SILVA, C. H. P. de M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999. 531p.

SILVA, J.A. **Tópicos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 227p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SOLSONA, F. **Control de la calidad de águas de bebida: la solución a um grave problema sanitário o la indiferencia de todos?** 2001. Disponível em: <<http://www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc14582.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2007.

SOUNIS, E. **Epidemiologia**: parte geral. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. 111p.

STICKLER, D. J. Microbiology of bottled natural mineral waters. **J. Royal Soc. Health**. v.109, n.4, p.118-124, 1989.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TUNDIZI, J. G.; BRAGA, B.; REBOUÇAS, A. da C. **Águas doces no Brasil**: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo: Escrituras, 1999. 717p.

UNIVERSIDADE DA ÁGUA. **Água, o ouro do futuro**. 2004. Disponível em: <[http://www.uniagua.org.br/website/default.asp?tp=1&pag=entr\\_220304.htm](http://www.uniagua.org.br/website/default.asp?tp=1&pag=entr_220304.htm)>. Acesso em: 7 out. 2006.

URMENETA, J.; NAVARRETE, A.; SANCHO, J. Isolation and identification of autochthonous microbiota from a granitic aquifer and its variation after the bottling process. **Curr. Microbiol.**, v.41, p.379-383, 2000.

VILENA, R. S.; BORGES, D. G.; CURY, J. A. Avaliação da concentração de flúor em águas minerais comercializadas no Brasil. **Rev. Saúde Pública**. v.30, n. 6, p. 512-518., 1996.

WARBURTON D. W. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2- The need for more stringent standards and regulations. **Can. J. Microbiol.** v. 39, p.158-168. 1993.

WENDPAP, L. L.; DAMBROS, C. S. K.; LOPES, V. L. D. Qualidade das águas minerais e potável de mesa, comercializadas em Cuiabá-MT. **Hig. Alim.**, v.13, n.64, p.40-44, 1999.



WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Almost Half the World's People have no Acceptable Means of Sanitation.** 2000a. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-pr-2000/en/pr2000-73.html>>. Acesso em: 8 nov. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bottled Drinking water.** 2000b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs256/en/index.html>>. Acesso em: 22 jan. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emerging issues in water and infectious disease.** 2003. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/emerging.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality.** 2006a. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq0506.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water and Public Health.** 2006b. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/S01.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S01.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2006.

ZOBELL, C. E.; ANDERSON, Q. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. **Biol. Bull.**, v.71, p.324-342, 1936.

**ANEXOS**

**ANEXO A** – Tabela dos índices de NMP e limites de 95% de confiança para várias combinações de resultados positivos e negativos quando dez alíquotas de 10mL são usadas.

Nº de tubos positivos	NMP/100mL	Limites de confiança	
		Inferior	Superior
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,8
10	>23,0	13,5	Infinito

Fonte: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998.

**ANEXO B** – Quadro dos Critérios Microbiológicos definidos para água natural mineral e água natural.

Microrganismo	Amostra indicativa limites	Amostra representativa			
		n	c	m	M
<i>E. coli</i> ou coliforme (fecais) termotolerantes, em 100 mL	Ausência	5	0	-.-	Ausência
Coliformes totais, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
Enterococos, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
Clostrídios sulfito redutores ou <i>C. perfringens</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP

Fonte: BRASIL, 2000.

(n): é o número de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente.

(c) é o número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores "m" e "M".

(m) é o limite inferior (mínimo) aceitável. É o valor que separa uma qualidade satisfatória de uma qualidade marginal. Valores abaixo do limite "m" são desejáveis.

(M) é o limite superior (máximo) aceitável. Valores acima de "M" não são aceitos.