

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS SEM GÁS E
GASEIFICADAS ARTIFICIALMENTE COMERCIALIZADAS EM
GARRAFAS INDIVIDUAIS.**

ROBERTA TEBALDI

Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. ADALBERTO FARACHE FILHO

ARARAQUARA – 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS SEM GÁS E
GASEIFICADAS ARTIFICIALMENTE COMERCIALIZADAS EM
GARRAFAS INDIVIDUAIS.**

ROBERTA TEBALDI

Nutricionista

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

Orientador: Prof. Dr. ADALBERTO FARACHE FILHO

ARARAQUARA – 2011

Dedico

Aos meus pais e meu irmão

pelo amor e confiança.

Ao meu namorado pelo incentivo.

Agradecimentos

À minha mãe Francisca Margarida e ao meu pai José Roberto pelo incentivo na minha realização profissional e pessoal.

Ao meu namorado Rodrigo, pela paciência, amor, dedicação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Adalberto Farache Filho, pela orientação para o desenvolvimento desta monografia, 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. Luiz Augusto do Amaral pelas sugestões e considerações que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

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

Aos meus amigos, pela amizade, força, compreensão.

Ao meu irmão, 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 agradeço a Deus por todas as conquistas, oportunidades e realizações, que me foram dadas na vida.

Obrigada!

Banca examinadora

Prof. Dr. Adalberto Farache Filho

(orientador)

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

(membro)

Prof. Dr. João Bosco Faria

(membro)

Araraquara 14 de Janeiro de 2011

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 – Água mineral.....	14
1.2 – Qualidade microbiológica da água mineral.....	16
1.3 – Doenças Transmitidas por Água e Alimentos (DTAA).....	18
1.4 – Microbiota Autóctone em águas minerais.....	20
1.5 – Microbiota Alóctone.....	21
1.6 – Microrganismos indicadores e sua ocorrência em água mineral.....	21
1.7 – <i>Escherichia coli</i>	22
1.8 – Microrganismos pesquisados na água.....	24
1.8.1 – Coliformes.....	24
1.8.2 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
1.8.3 – Bactérias Heterotróficas.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS SEM GÁS E GASEIFICADAS ARTIFICIALMENTE COMERCIALIZADAS EM GARRAFAS INDIVIDUAIS.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
1- INTRODUÇÃO.....	34

2- MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 - Amostragem.....	35
2.2 - Análises Bacteriológicas.....	36
2.2.1 – Determinação do número mais provável (NMP/100mL) de coliformes totais e <i>E. coli</i> nas amostras de água.....	36
2.2.2 – Contagem de bactérias heterotróficas.....	37
2.2.3 – Determinação do número mais provável (NMP/100mL) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4- CONCLUSÕES.....	48
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	52
ANEXO A.....	53
ANEXO B.....	54
ANEXO C.....	55
ANEXO D.....	56
ANEXO E.....	60

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1.	Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no primeiro lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.	40
Tabela 2.	Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no segundo lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.	41
Tabela 3.	Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no terceiro lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.	41
Tabela 4.	Relação das amostras não gaseificadas de acordo com lote e marca que apresentaram contaminação para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e para <i>E. coli</i> .	43
Gráfico 1.	Porcentagem de amostras não gaseificadas que não atenderam aos padrões para coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e bactérias heterotróficas estabelecidos pela legislação brasileira para águas minerais e para o padrão de potabilidade de água para o consumo humano	46
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.	53
ANEXO D	NMP/mL de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostra de água mineral não gaseificadas em garrafas de 300 a 510mL, comercializadas nas cidades de Ribeirão Preto-SP e Araraquara-SP.	56
ANEXO E	NMP/mL de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostra de água mineral gaseificadas em garrafas de 300 a 510mL, comercializadas nas cidades de Ribeirão Preto-SP e Araraquara-SP	60

RESUMO

A constante preocupação com a qualidade da água destinada ao consumo, a presença de sabores e odores desagradáveis decorrentes da adição de flúor e cloro nas águas de abastecimento público e a falta de suprimentos adequados de água potável, tem provocado uma contínua demanda por água mineral. A relativa escassez de estudos envolvendo a qualidade microbiológica da água mineral, principalmente na água mineral gaseificada artificialmente, gerou esta pesquisa que tem por objetivo, avaliar e comparar a qualidade bacteriológica de águas minerais sem gás e gaseificadas artificialmente, em embalagens descartáveis, de oito marcas comercializadas em supermercados das cidades de Ribeirão Preto e Araraquara - SP. As duzentos e quarenta amostras analisadas foram divididas em três lotes com cinco unidades gaseificadas e cinco sem gás de cada marca. Foram realizadas análises para determinação de bactérias do grupo coliforme, bactérias heterotróficas e *Pseudomonas aeruginosa*. Para análise de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se a técnica de substratos cromogênicos, para *Pseudomonas aeruginosa* utilizou-se a técnica de tubos múltiplos específica e para contagem de bactérias heterotróficas foi utilizada a técnica de cultivo em profundidade. Para as cento e vinte amostras não gaseificadas analisadas (100%), verificou-se a presença de coliformes totais em oito amostras (6,67%), presença de *E. coli* em seis amostras (5%), presença de *Pseudomonas aeruginosa* em cinco amostras (4,2%), e 102 amostras (85%) apresentaram contagem de bactérias heterotróficas maior que 500 UFC/mL. Para as cento e vinte amostras gaseificadas analisadas verificou-se que nenhuma delas apresentou contaminações para o grupo coliforme (totais e *E. coli*) e para *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas três amostras (2,5%) apresentaram contagens superiores a 500 UFC/mL para bactérias heterotróficas. Todas as marcas não gaseificadas analisadas (100%) apresentaram amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação em um ou mais parâmetros avaliados nesta pesquisa. Apenas duas marcas das amostras gaseificadas (25%) apresentaram amostras fora do padrão para bactérias heterotróficas.

Palavras chave: água mineral; qualidade bacteriológica; coliformes; bactérias heterotróficas; *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The constant concern with the water quality reserved to human consumption, the presence of tastes and odors caused by the addition of fluoride and chlorine in public water supplies and the destitution of adequate supplies of potable water has challenged a continuous demand for mineral water. The relative privation of studies on the bacteriological quality of mineral water, mainly in artificially carbonated mineral water generated this project that purpose to value and to compare the microbiological quality of mineral water without gas and carbonated artificially, in dismissible tacking, of eight types, sold in supermarkets in the cities of Araraquara/SP and Ribeirão Preto/SP. The two hundred forty analyzed samples were divided in shares with five unities carbonated mineral water and five without gas. There were put into practice analysis for determination of coliform bacteria, heterotrophic bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. To analysis of total coliform and *E. coli* it was used the chromogenic substrates technique, for *Pseudomonas aeruginosa* used the multiple tube specific technique and to counting heterotrophic bacteria, it was used the technique of growing in depth. To the one hundred twenty samples no carbonated water analyzed (100%), was checked the presence of total coliforms in eight samples (6,67%), presence of *E. coli* in six samples (5%), presence of *Pseudomonas aeruginosa* in five samples (4,2%), and one hundred two samples (85%) was with counts above 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. To the one hundred twenty carbonated water samples analyzed (100%), was checked that no samples analyzed was contaminated to the coliform group (total and *E. coli*) and to *Pseudomonas aeruginosa*. Just three samples (2,5%) present counts above 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. All the brands of the samples no carbonated water tested (100%) presents out of the specifications of Brazilian legislation in one or more parameters analyzed in this project. Just two brands of carbonated water samples (25%) presents out of the specifications to the heterotrophic bacteria.

Key words: mineral water, bacteriological quality, coliforms, heterotrophic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUÇÃO

A abundância de água no planeta gera uma falsa sensação de recurso inesgotável; no entanto, a água é um recurso finito e não tão abundante quanto parece. Esse fato fica evidenciado 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, restando apenas 0,007% da água doce disponível para o consumo em 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.

A cultura das águas minerais, data da era dos romanos, que eram amantes de banhos. No século XVII na França, o comércio de águas minerais foi regulamentado por Henrique IV, em maio de 1605. Ao longo do século XIX é que realmente nasceu a indústria de envasamento de água mineral, em função das suas propriedades medicinais. Com a expansão dos meios de transportes, principalmente as ferrovias, houve a abertura do comércio para os países vizinhos. 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 lançamento do garrafão de 20 litros, possibilitando sua ampliação. 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 plástico de policarbonato.

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captada de mananciais subterrâneos, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais e pela presença de oligoelementos e outros constituintes; pode também ser gaseificada artificialmente. Para que apresente a qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, deve ser captada, processada e envasada, obedecendo às condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação.

A constante preocupação com a qualidade da água destinada ao consumo tem provocado uma contínua demanda por água mineral em todos os países. Além disso, o sabor e odores desagradáveis decorrentes da adição de flúor e cloro nas águas de abastecimento público e a falta de suprimentos de água potável segura, durante viagens, têm também resultado em um aumento na demanda de água mineral.

A vigilância rotineira da qualidade bacteriológica da água é indispensável, tendo em vista a necessidade de proteger a saúde dos consumidores, uma vez que a água de consumo humano é um importante veículo de enfermidades de natureza infecciosa. Observando o aumento no consumo de água mineral gaseificada e não gaseificada; bem como o aumento no número de estabelecimentos que comercializam o produto, a falta de estudos com águas minerais gaseificadas, 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 de volumes maiores, optou-se pela continuidade a pesquisa da qualidade de águas minerais, com o objetivo de avaliar a qualidade bacteriológica de águas minerais, sem gás e gaseificadas artificialmente, em embalagens descartáveis de 300 a 510ml provenientes de oito marcas comercializadas em supermercados das cidades de Ribeirão Preto e Araraquara - SP.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - Água mineral

Águas minerais são definidas como aquelas provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas, de mananciais subterrâneos que possuem composições químicas e propriedades físicas ou físico-químicas, capazes de lhe conferir uma ação medicamentosa (BRASIL, 2000; BRASIL, 2005).

Palhares, 2004, define água mineral como a água que contém substâncias minerais e gasosas dissolvidas e, conforme o mineral dissolvido, a água pode ser, alcalina, sulfurosa, salobra, acídula ou magnésiana, decorrendo daí suas propriedades medicinais.

Ramires *et. al.*, 2004 considera como água mineral a que conseguiu atingir profundidades maiores e, dessa forma, se enriqueceu em sais, adquirindo novas características físico-químicas.

Cada água mineral tem sua composição físico-química obtida ao longo de centenas ou milhares de anos, decorrente dos diversos tipos de rochas por onde são filtradas, assim como radioatividade e temperatura de cada fonte (ZAMPERO, 2008).

Durante muito tempo, acreditou-se que as águas minerais tinham uma origem diferente da água subterrânea; sabe-se hoje que ambas têm a mesma origem. São águas de superfície que infiltram no subsolo e cujo conteúdo em sais está diretamente relacionado com o calor pois a capacidade de dissolver minerais e de incorporar solutos aumenta com a temperatura (RAMIRES *et. al.*, 2004).

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

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

Esse setor se tornou o mais dinâmico do mercado mundial de bebidas, representando um total de 35% desse mercado. Por ano, 138 bilhões de litros são consumidos no planeta - média de 22 litros por pessoa. A venda de água obteve, na última década, o maior crescimento anual e tem expectativa de permanecer em alta de 7 a 9%. Em 2010, é esperado que esse mercado dobre (ABIR, 2009).

Um levantamento apresentado no 3º Congresso Mundial de Águas, realizado em setembro de 2006, na Itália, revelou que, da produção total de águas envasadas no mundo, 58% foi de produtos naturais e 42% de águas processadas. As águas gaseificadas representaram 16% em volume e 28% em faturamento (CRESPO, 2007).

A água mineral natural pode ser classificada em água sem gás, que é a água mineral natural a qual não foi adicionada de dióxido de carbono e em água gaseificada artificialmente, que é a água mineral natural a qual foi adicionada de dióxido de carbono (BRASIL, 2000).

A grande maioria das marcas encontradas à venda é gaseificada artificialmente em um processo industrial idêntico ao dos refrigerantes; retira-se o oxigênio presente no líquido e injeta-se, em seu lugar, gás carbônico. A água tem de ser resfriada para absorvê-lo. A carbonatação consiste na reação química entre CO_2 e H_2O através do borbulhamento de dióxido de carbono em água líquida, cujo produto desta reação o ácido carbônico (H_2CO_3) – um ácido fraco que é o responsável pela redução do pH da água (LIRA, 2010). Já o processo natural de formação de água carbogásosa ou carbonatada, surge do aquecimento subterrâneo. As fontes estão situadas em regiões onde ocorreram vulcões ou onde a camada de magma está mais próxima da superfície. Existe ainda outra possibilidade: "O gás carbônico também pode ser formado pela oxidação da matéria orgânica presente no aquífero", afirma o hidrogeólogo Ricardo Hirata, da USP. De qualquer forma, muitas águas gasosas naturais podem apresentar teor de gás carbônico baixo para as convenções comerciais e, nesse caso, recebem artificialmente um reforço de CO_2 (MORAES, 2002).

Sendo um produto nobre, a água mineral deve ser acondicionada em embalagem que, acima de tudo, proteja de contaminações, pois a qualidade microbiológica do produto é o que mais se preza. A embalagem não pode permitir que haja interação da água com elementos externos ou que haja vazamentos, mas deve também apresentar uma boa imagem do produto junto ao consumidor. A diversidade dentro desse segmento das embalagens plásticas é grande; os tipos existentes são o polietileno (PE), o polipropileno (PP), o policarbonato (PC), polietileno tereftalato (PET) e o PVC. Essas embalagens apresentam baixo custo, evitam ferrugens, possuem leveza, facilidade no manuseio e transporte, são recicláveis e práticas. Na Europa, em função do preço, a embalagem PVC tem diminuído e o PET está sendo utilizado, sendo essa uma tendência em todo o mundo (MACÊDO, 2001).

No Brasil, 70% da água envasada utiliza PVC, mas o PET já está tendo sua participação, especialmente em água com gás que exige esse tipo de embalagem, pois, além do acabamento, transparência, brilho e flexibilidade de moldes, o PET também apresenta resistência interna à pressão, além de retardar a perda de gás carbônico, permite lavagem a quente e aceita pigmentação (MACÊDO, 2001).

Acompanhando a tendência mundial, o mercado brasileiro de águas minerais continua em ascensão, consolidando-se como um dos setores da economia que mais crescem no país (ABINAM, 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 (ABINAM, 2006^a). Em 2007, a produção cresceu 6%, chegando a 206 bilhões de litros, fazendo com que no *ranking* dos dez maiores produtores internacionais, o Brasil ficasse na 7ª posição, com produção de 10 bilhões de litros, segundo a Zenith International. A liderança continuou com os Estados Unidos, que produziram 34 bilhões de litros em 2007. Em relação ao consumo mundial de águas minerais, a projeção da consultoria para 2011 é de 250 bilhões de litros, superando o volume global de refrigerantes, estimado em cerca de 220 bilhões de litros. Mantidas essas projeções, o consumo de água assinalará, entre 2001 e 2011, crescimento de 124% contra 36% das bebidas carbonatadas. No mesmo período, os chás terão crescido 100%, os leites, 58%, as cervejas, 34% e os sucos, 11%. O levantamento da Zenith revelou que, no segmento de embalagens descartáveis, as águas carbonatadas representaram 14% da produção mundial e as sem gás, 49%. Os garraões ficaram com 37% (ABINAM, 2010).

1.2 Qualidade microbiológica da água mineral

A qualidade microbiológica da água mineral engarrafada é de grande interesse, pois, pode tornar-se um importante veículo de transmissão de parasitas e doenças infecciosas, já que muitos consumidores a usam como uma alternativa para a água de abastecimento público (RAMALHO *et. al.*, 2001; FRANCO e CANTUSIO NETO, 2002). A água engarrafada também deve ter boa qualidade microbiológica, especialmente se o uso for destinado à população vulnerável, como no caso de pessoas doentes, idosos, gestantes e crianças (WARBURTON, 1993).

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

Além dos microrganismos de importância para saúde pública é necessário que seja observado, em especial, os microrganismos que podem deteriorar o produto (alterando sabor e/ou coloração) e aos indicadores de condições higiênicas (SANT'ANA *et. al.*, 2003).

Acredita-se que maior número de microrganismos é encontrado em águas de garrafas plásticas devido à característica do plástico de permitir a passagem de O₂, proporcionando superfície de crescimento adequada para as bactérias (COELHO *et. al.*, 1998).

Para que a água mineral natural apresente a qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, deve ser captada, processada e envasada obedecendo as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação (BRASIL, 2000; BRASIL 2005). Portanto, devem ser realizadas periodicamente análises microbiológicas na fonte e no produto final envasado, tanto pelo produtor como pelo órgão fiscalizador (BUZZETTI, 1998).

Os padrões de identidade e características mínimas de qualidade para águas são estabelecidos de acordo com o uso pretendido dessa água. No Brasil, o órgão responsável pela determinação desses padrões é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2000; BRASIL, 2005).

Os possíveis tratamentos aplicados de forma a reduzir ou eliminar os microrganismos são os métodos químicos (cloração, ozonização) e processos ou agentes físicos como no caso de 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" já que o CO₂ apresenta efeito bactericida por reduzir o pH da água. No entanto, não pode ser considerado um meio de melhorar a qualidade microbiológica das águas minerais que contenham populações elevadas de microrganismos (SANT'ANA *et. al.*, 2003).

1.3 Doenças transmitidas por água e alimentos (DTAA)

A mudança nos hábitos alimentares, principalmente nas populações urbanas em áreas industrializadas, permitiu o aumento da disponibilidade de alimentos em boa parte do globo e uma substancial elevação dos riscos relacionados a doenças transmitidas por água e alimentos (DTAA) (KÄFERSTEIN, 2003).

Doenças transmitidas por água e alimentos são aquelas causadas por alimentos e água contaminados com microorganismos e/ou suas toxinas e por outros contaminantes químicos e físicos. Os principais patógenos emergentes identificados nas últimas cinco décadas são: *Campylobacter* sp, *E. coli* enterohemorrágica e o *Cryptosporidium*, assim como cepas resistentes de enterobactérias entre as quais destaca-se a *Salmonella* sp. A principal manifestação das DTAA é a diarreia, no entanto, há patógenos ou substâncias químicas que podem afetar outros órgãos, causando sintomas neurológicos ou comprometimento hepático, renal e respiratório, entre outros (EDUARDO, 2005; KÄFERSTEIN, 2003).

Até vinte anos atrás, os surtos de DTAA estavam associados a eventos sociais, com início rápido e restrito às pessoas presentes ao evento, freqüentemente a investigação identificava um erro na manipulação do alimento e as medidas de controle eram de âmbito local. No entanto, atualmente, são comumente identificados surtos com distribuição espacial difusa, envolvendo muitos municípios e estados, alterando de forma expressiva as características dessas epidemias, devido à contaminação de alimentos industrializados distribuídos pelo comércio em ampla área geográfica (WALDMAN, 2010).

A avaliação de dados sobre as causas e vias de transmissão de surtos de diarreia, no período de 1992 a 2002, no estado de São Paulo, mostrou que dos 1.143 surtos de diarreia, 124 surtos (10,9%) estavam associados com água. Uma análise mais detalhada para os surtos de diarreia notificados no período de 2000 a 2002 apontou os seguintes resultados: dos 728 surtos de diarreia envolvendo 17.181 casos, 36 (5%) foram devido exclusivamente à exposição a água, com 2.338 casos, 1 (0,1%) por água e transmissão pessoa a pessoa, 32 (4,4%) por água e alimentos. No período em questão foram identificados ainda 69 surtos de diarreia envolvendo exposição a água (9,5%), 384 (52,7%), devido exclusivamente a alimentos; e em 275 (37,7%) não foi possível identificar a via de transmissão (ignorada). Entre os 69 surtos associados a água, 13 (18,8%) foram atribuídos a falhas no sistema público de abastecimento de água; 6

(8,7%), devido ao uso de fontes alternativas (poço, mina, água mineral etc.); 1 (1,4%) por água recreacional; 49 (71%) devido a caixa d'água doméstica com problemas. Os agentes etiológicos encontrados nos surtos associados a água foram: *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Norwalk, rotavírus, *Salmonella*, *Shigella sonnei*, *E. coli* enteropatogênica e adenovírus. Entre 2000 e 2008 foram registrados, em média, 400 mil casos de doenças diarreicas por ano em São Paulo (EDUARDO, 2005; HADDAD, 2010).

A hepatite A, freqüentemente associada à veiculação hídrica nos países em desenvolvimento, tem no alimento, nas áreas desenvolvidas, a principal via de transmissão. Em São Paulo, os dados da vigilância epidemiológica mostram que a doença se apresenta em picos cíclicos de surtos, a cada 3 ou 4 anos, e sua maior ocorrência é registrada em creches, escolas e outros espaços fechados, afetando o grupo de 1 a 4 anos de idade. Entre 1999 e 2004, foram notificados 1.379 surtos relacionados a doenças transmitidas por água e alimentos; destes, 217 (16%) foram diagnosticados como de hepatite A. Entre os surtos de hepatite A 5% foram associados à água, 2% pessoa a pessoa, 3% contato com *esgoto* e em 90% ignorado, isto é, a investigação epidemiológica não conseguiu determinar a via de transmissão. Outra patologia importante, a febre tifóide, é causada pela *Salmonella Typhi*, e veiculada por água e alimentos contaminados com esgoto/dejetos humanos e também por falta de higiene adequada de portadores assintomáticos. Provoca transtornos abdominais (cólicas, constipação) e febre alta, e nos casos mais graves, várias complicações que podem levar ao óbito. (CVE-SES-SP, 2004; BASSIT *et. al.*, 2004).

Entre os anos de 2000 e 2008 no Brasil ocorreram 15 surtos de febre tifóide, sendo 8 casos no Estado da Bahia, 3 no Estado de São Paulo, 1 no Amazonas, 1 no Maranhão, 1 em Sergipe e 1 no Rio Grande do Sul. De um total de 128 pessoas enfermas, uma foi a óbito. Dos 15 surtos, 14 foram de origem alimentar, sendo 64% relacionados à ingestão de água, 14% com o consumo de sanduíche, 7% com a ingestão de maionese e 7% com a ingestão de múltiplos alimentos (SVS, 2010).

Quando a água para o consumo humano é o fator de risco identificado devem ser rastreadas todas as etapas de sua produção, da captação ao domicílio, ou o uso de fontes alternativas pela população, assim como a utilização de águas recreacionais (parques de águas, lagos, rios, mar, piscinas, poças). Essas últimas, além de diarreias, podem causar

dermatites, conjuntivites, meningoencefalites e esquistossomose, entre outras (EDUARDO, 2005).

1.4 Microbiota autóctone em águas minerais

As águas minerais naturais não são estéreis, apresentando microrganismos que lhe são próprios, isto é, existentes antes de qualquer tratamento ou processamento. Esses microrganismos são conhecidos como autóctones e embora permaneçam num nível baixo em termos populacionais enquanto a água está em seu ambiente natural, logo após o engarrafamento começam a se multiplicar rapidamente (COELHO *et. al.*, 1998). Pertencem a esse grupo de microrganismos as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Bacillus* (SANT'ANA *et. al.*, 2003). Juntamente com as bactérias autóctones desenvolvem-se as indígenas, principalmente em águas com alto conteúdo mineral em temperaturas próximas a 20 °C (COELHO *et. al.*, 1998).

Para a saúde pública, o impacto das bactérias indígenas tem sido muito discutido. Alguns autores sugerem que essas bactérias são incapazes de colonizar o trato digestivo, possivelmente devido à sua inabilidade em sobreviver em potencial redox baixo e em temperatura de 37°C; no entanto, algum interesse tem sido expressado sobre a habilidade dessas bactérias em converter o nitrato das águas minerais em nitrito (COELHO *et. al.*, 1998).

A preocupação está na possível e ocasional presença de patógenos como *Vibrio cholerae*, *Shigella SP*, *Aeromonas hydrophilla*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, vírus entéricos e protozoários (VARNAM *et. al.*, 1994).

Normalmente a qualidade da água mineral é avaliada pela presença de microrganismos indicadores e patogênicos; no entanto, mudanças na população bacteriana após o engarrafamento ou durante a estocagem pode também indicar alterações na água da fonte ou modificações durante o engarrafamento; por isso a necessidade de se examinar e caracterizar a população bacteriana na fonte e na água engarrafada como uma adição ao controle do processo (MORAES, 2002).

1.5 Microbiota alóctone

A microbiota alóctone é outro grupo de microrganismos que pode surgir na água mineral. Ao contrário da microbiota autóctone, esta não é encontrada preferencialmente na água, mas pode surgir durante as etapas prévias ao engarrafamento ou durante o processamento. O aumento significativo da população dessas bactérias é raro, principalmente devido a seus requerimentos nutricionais. Os tipos mais persistentes de bactérias alóctones apresentam características fisiológicas semelhantes às espécies autóctones. Essas incluem espécies mesófilas Gram negativas, tais como: *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas multivorans*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. As espécies patogênicas de interesse primário em águas minerais são: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Pseudomonas cepacia*, vírus entéricos e alguns protozoários. Esses organismos podem chegar até a água por contaminação fecal ou outras vias. Isso ocorre diretamente na fonte ou durante o engarrafamento. As características de multiplicação e sobrevivência desses organismos nas águas minerais requerem mais estudos (COELHO *et. al.*, 1998).

As bactérias contaminantes apresentam pouca sobrevivência em águas engarrafadas e podem se tornar fisiologicamente prejudicadas com a exposição ao meio aquático por não se adaptarem bem 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 ingeridos (RAMALHO *et. al.*, 2001).

1.6 Microrganismos indicadores e sua ocorrência em água mineral

São grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, provável presença de patógenos, deterioração do alimento ou indicar condições sanitárias inadequadas (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A avaliação da qualidade e a higiene empregada no processamento da água são determinadas na presença ou ausência de um organismo indicador e sua respectiva população. O isolamento e a identificação de cada tipo de microrganismo exige uma metodologia diferente e a ausência ou presença de um patógeno não exclui a presença de outros (BETTEGA *et. al.*, 2006; SANT'ANA *et. al.*, 2003).

Os microrganismos considerados indicadores de contaminação em águas minerais são: coliformes totais, coliformes fecais/termotolerantes/ *Escherichia coli*, clostrídios sulfito redutores a 46°C, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e a contagem de bactérias heterotróficas (SANT'ANA *et. al.*, 2003).

Para que um microorganismo seja considerado indicador deve apresentar algumas características como: ser aplicável a todos os tipos de água, ter uma população mais numerosa no ambiente que outros patógenos, sobreviver melhor que os possíveis patógenos, possuir resistência aos processos de autodepuração equivalente a dos patogênicos e ser detectado por uma metodologia simples e de baixo custo. Infelizmente, não existe um indicador ideal de qualidade sanitária da água, mas sim alguns organismos que se aproximam das exigências referidas (BETTEGA *et. al.*, 2006).

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 do ser humano e de animais domésticos; 3. Apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral; 4. Ser detectado através de técnicas rápidas, simples e precisas.

1.7 *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram negativas, formada por seis gêneros e inúmeras espécies de microrganismos, sendo que alguns são habitantes do trato intestinal de animais de sangue quente como a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* e o *Proteus mirabilis*, enquanto outros são agentes causadores de toxinfecções, febre entérica e desintérias como *Salmonella typhi*, *Shigella sp* e *Yersinia pestis* (GONÇALVES, *et. al.*, 2002).

A *Escherichia coli* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras de fezes por pertencer à microbiota intestinal normal de indivíduos saudáveis. Geralmente não está associada a efeitos prejudiciais à saúde, no entanto, sob certas circunstâncias, pode provocar doenças graves. Cepas patogênicas são responsáveis por infecções do trato urinário, sistema nervoso e sistema digestivo em humanos. Quatro grupos de *E. coli* causadoras de diarreia são conhecidos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva

(EIEC). Outros grupos de *E. coli* associados à diarreia existentes são *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente (DAEC), mas seu significado não está, ainda, bem esclarecido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Alguns sorotipos de EHEC, particularmente *E. coli* O157:H7, causam doenças que podem incluir desde diarreia moderada a colite hemorrágica e/ou síndrome urêmico-hemolítica. A *E. coli* O157:H7 é, atualmente, considerada uma séria ameaça à saúde pública, com formas de infecção que provocam sérias complicações clínicas (GUIMARÃES e SERAFINI, 2006).

EPEC produz enterotoxinas termolábeis ou termoestáveis e é importante causa de diarreia em países em desenvolvimento, especialmente em crianças de pouca idade. Os sintomas da infecção por EPEC incluem distúrbios abdominais, com ou sem diarreia aquosa moderada, náuseas e dor de cabeça. A infecção por EPEC tem sido associada com severa diarreia não sanguinolenta, vômito e febre em crianças que ocorre freqüentemente em países em desenvolvimento, especialmente em crianças desnutridas, com perda de peso ou retardo no crescimento. A EIEC causa diarreia aquosa e ocasionalmente sanguinolenta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Os bovinos são o principal reservatório de *E. coli* patogênica, mas a bactéria pode também ocorrer em suínos, caprinos e aves domésticas como galinhas. A transmissão ocorre principalmente através da ingestão de alimentos ou água contaminados, no entanto, pode ser transmitida, ainda, por contato com animais ou indivíduos contaminados (GONÇALVES *et. al.*, 2002).

A transmissão de *E. coli* patogênica através da água tem sido documentada tanto para águas recreacionais quanto para água de consumo humano. Um surto envolvendo *E. coli* O157:H7 ocorreu em um sistema de suprimento de água da comunidade agrícola de Walkerton, em Ontário, no Canadá, em 2000, resultando na morte de sete pessoas e mais de 2300 ficaram doentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O impedimento da contaminação da água mineral por *E. coli* é importante uma vez que alguns pesquisadores já documentaram sua sobrevivência no produto. Pesquisadores verificaram que o microrganismo é capaz de aderir à superfície interna das garrafas e consideraram que este fato poderia explicar seu longo tempo de sobrevivência na água mineral (GUIMARÃES e SERAFINI, 2006).

Estudos demonstraram que a *E. coli* O157:H7 é capaz de sobreviver de 50 a 300 dias em água engarrafada. Portanto, supõe-se que esta bactéria é capaz de sobreviver

por mais tempo em água mineral que outras cepas de *E. coli* (GONÇALVES *et. al.*, 2002).

1.8 Microrganismos pesquisados na água

A seguir serão abordados os microrganismos envolvidos neste trabalho para avaliação bacteriológica da água mineral.

1.8.1 Coliformes

O grupo coliforme é dividido em coliformes totais e coliformes termotolerantes. Os coliformes totais são todas as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram negativas, não esporuladas e na forma de bastonete, que fermentam a lactose com formação de gás dentro de 48h a 35°C e são capazes de metabolizar o nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Neste grupo estão incluídos cerca de 23 espécies, que diferem em suas características bioquímicas, sorológicas e no seu habitat, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal como diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como a *Serratia* por exemplo (APHA, 2005; CETESB, 1997; CONSOLI, *et. al.*, 2006).

Os coliformes termotolerantes que são originários do trato gastrointestinal têm praticamente a mesma definição que os totais; no entanto, se diferem na capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a 44,5 – 45,5°C. Nesse grupo estão incluídos pelo menos 4 gêneros; *Escherichia*, *Enterobacter* (multiplica-se em ambiente livre), *Citrobacter* e *Klebsiella*, dos quais os 3 últimos não são de origem exclusivamente fecal; por este motivo, a enumeração direta de *Escherichia coli* como indicação de contaminação fecal é mais representativa que os demais (MACÊDO, 2001).

Para enumeração das bactérias do grupo coliforme são preconizadas três técnicas. Destas técnicas, duas quantificam os coliformes através do uso de tubos múltiplos e revelam a densidade bacteriana através do número mais provável (NMP). A terceira, conhecido como membrana filtrante, permite visualização do número de

colônias de microrganismos existentes e o resultado é expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) (COELHO *et. al.*, 1998).

O uso da técnica do substrato cromogênico permite determinar simultaneamente os coliformes totais e *Escherichia coli* presentes em uma determinada amostra, reconhecendo como coliformes totais as cavidades com bactérias que alteram a coloração do meio, de incolor para amarelo, por metabolizar o nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG), e como *Escherichia coli*, quando as cavidades positivas apresentam além da coloração amarela, fluorescência azul sob luz ultravioleta (360 nm), por metabolizar a ONPG e o MUG (COELHO *et. al.*, 1998; CONSOLI, I. *et.al.*, 2006).

Somente a *Escherichia coli*, ou seja, o principal componente do grupo dos coliformes termotolerantes é produtor da enzima b-glucoronidase que cliva o b-D-glucoronido-4-metil-mbeliferona (MUG) no qual se baseia o método cromogênico, caracterizado pela sua velocidade em fornecer resultados simultâneos para coliformes totais (ONPG positivas) e *Escherichia coli* (ONPG e MUG positivas). De fato, o uso deste teste significa considerar os coliformes termotolerantes como sendo todos *Escherichia coli* (SOARES, *et. al.*, 2000).

1.8.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa está presente no solo, na água e em alimentos como os vegetais; no ser humano pode ser encontrada na pele, causando diversos tipos de doenças, principalmente em indivíduos imunologicamente debilitados, por produzirem substâncias tóxicas. Provoca manifestações clínicas como meningite, infecções nos ouvidos, olhos, em ferimentos, queimaduras e no trato urinário, pneumonia necrosante e até mesmo necrose hemorrágica da pele (MACÊDO, 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

São bacilos Gram negativos, móveis através de flagelos polares, oxidase e catalase positivos, não esporulados, aeróbios estritos e, geralmente, produzem pigmentos verdes, azuis ou amarelo-esverdeados que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 37°- 42°C; a 55°C são completamente inativadas. As propriedades fisiológicas mais notáveis são a tolerância a valores relativamente altos de pH, a sobrevivência em substratos com poucos nutrientes

e a capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos (GUILHERME *et. al.*, 2000; MACÊDO, 2001).

A presença de altos números de *Pseudomonas aeruginosa* em água engarrafada pode estar associada a alterações no paladar, odor e turbidez, por produzirem diversas substâncias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

1.8.3 Bactérias heterotróficas

As bactérias heterotróficas são microrganismos que requerem carbono como fonte de nutriente, são mesófilas, aeróbias ou facultativas, estão presentes em grande número e são indicadoras da qualidade bacteriológica da água de uma forma ampla (DOMINGUES *et. al.*, 2007; COELHO *et. al.*, 2010).

A maioria dessas bactérias, geralmente, não é patogênica; no entanto, alguns membros desse grupo, incluindo *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., podem ser patógenos oportunistas (QUIROZ, 2002).

Mesmo que a maioria das bactérias heterotróficas da microbiota natural da água não seja considerada patogênica é importante que sua população seja mantida sob controle, pois populações muito elevadas dessas bactérias na água podem causar riscos à saúde do consumidor. A contagem padrão de bactérias heterotróficas para água potável não deve exceder a 500 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (BRASIL, 2004; DOMINGUES *et. al.*, 2007; COELHO *et. al.*, 2010).

A presença dessas bactérias também pode indicar uma deterioração na qualidade da água de consumo ou um processo de desinfecção inadequado no sistema de produção, entretanto, essas bactérias não são utilizadas como parâmetro de qualidade pela legislação brasileira para água mineral (QUIROZ, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES E BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS. Quem disse que água é tudo igual?. Disponível em: <http://www.abir.org.br/article.php3?id_article=385>. Acesso em: 14 jan. 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 th. ed. Washington, D.C.: APHA, 2005. p.9-140.

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. 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. Preços caem, mas mercado mundial de águas continua em expansão. Disponível em: <http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=48>. Acesso em: 23 ago. 2010.

BASSIT N.P, Katsuya E.M, Eduardo M.B.P. Vigilância epidemiológica dos surtos de hepatite A no Estado de São Paulo, 1999-2003. Anais do VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia; Jun. 2004; Recife, Brasil.

BETTEGA, J.M.P.R.; MACHADO, M. R.; PRESSIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C.A. Métodos Analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.30, n.5, set./out. 2006.

BRASIL. Resolução n° 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 n° 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.

BRASIL, Resolução n°275 de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 set. 2005, Seção 1.

BUZZETTI, A.R. Como montar uma empresa de água mineral. **Revista Engarrafador Moderno**, São Paulo, n°60, p.32-37, out.1998.

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.

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.

COELHO, M. I. S.; MENDES, E. S.; CRUZ, M. C. S.; BEZERRA, S. S.; SILVA, R. P. P. Avaliação microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Maringá**, v.32, n.1, p. 1-8, 2010.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Controle da qualidade da água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo; 1997. p. 152-4.

CONSOLI, M. A. F. et al. Estudo introdutório sobre o uso de petrifilm como meio base para a utilização de membrana filtrante na análise de água. **Revista analytica**. n.25. out./nov., 2006.

CRESPO, A. Água: com gás ou sem gás?. 2007. Disponível em: <<http://blog.estadao.com.br/blog/advdefesa/?p=7800&more=1page=2>>. Acesso em: 12 jan. 2009.

CVE-SES-SP/Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Tabelas de Dados — 1992 a 2004. [Documento técnico]; São Paulo, 2004.

DOMINGUES, V. O. *et. al.* Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 15-19, 2007.

EDUARDO, M. B. P. Doença diarreica e outras relacionadas à transmissão hídrica e alimentar – aspectos programáticos, metodológicos e situação epidemiológica. Boletim Epidemiológico Paulista. n.21; Set. 2005.

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.

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

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.

GUIMARÃES, A. P. R. C.; SERAFINI, A. B. **Água Mineral: Aspectos Históricos e Microbiológicos**. GO. 2006.

GONÇALVES, E. S., et.al. A segurança alimentar e os consumidores: Um breve estudo sobre a *Escherichia coli*. **CESUMAR – Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**. v.7, n.1. dez. 2002.

HADDAD, C. Guarujá registra surtos de diarreia. Jornal o Estadão de São Paulo. 8 jan. 2010. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100108/not_imp492331,0.php>. Data de acesso: 23 ago. 2010.

KÄFERSTEIN, F. K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. Food Control 2003; 14: 101-109.

LIRA, J. C. L. **Carbonação**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/reacoes-quimicas/carbonacao/>> Data de acesso: 29 Dez. 2010.

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

MORAES, C. Como se produz água com gás. **Revista Super Interessante**. Edição nº181. Out. 2002.

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.

PALHARES, J. C. P. Definições Técnicas – Água – Versão 1.0. Comunicado Técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Concórdia-SC, 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: 15 jun. 2009.

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.

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.

SOARES, N. S. C. et. al. Distribuição espaço temporal de bactérias indicadoras de contaminação e vírus num riacho do trópico semi-árido. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. PB, 2000. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil21/vii-014.pdf>>. Data de acesso: 23 ago. 2010.

SVS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância Epidemiológica da Febre Tifóide. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre_tifoide.pdf>. Data de Acesso: 23 ago. 2010.

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

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Bebidas: tecnologia, química y De acordo com o padrão para bactérias heterotróficas utilizado nesta pesquisa, 29 amostras não gaseificadas (72,5%) e duas amostras gaseificadas (2,5%) de oito marcas (100%) analisadas no primeiro lote, apresentaram contagens acima de 500UFC/mL. microbiologia (série alimentos básicos 2). Acribia. Zaragoza. 487p. 1994.

WALDMAN, E. A.; Freitas, F. R. M. A Vigilância epidemiológica e sua interface com as práticas da vigilância sanitária. 2010.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2003. WHO's Guidelines for Drinking-Water Quality. 3th ed. Disponível em: www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/gdwq3_1.pdf. Acesso em: 05/09/09.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Water and Public Health. 2006. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S01.pdf>. Acesso em: 02 fev 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. 2006a. Disponível em: [http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq_0506 .pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq_0506.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2009.

ZAMPERO R. Água: antes de ser tratada como mineral é um recurso hídrico. **Revista Científica Aprender.** 2ª ed. Nov.2008.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS MINERAIS SEM GÁS E GASEIFICADAS ARTIFICIALMENTE COMERCIALIZADAS EM GARRAFAS INDIVIDUAIS

Roberta TEBALDI

Adalberto FARACHE FILHO

RESUMO

A escassez de estudos envolvendo qualidade microbiológica da água mineral, principalmente gaseificada artificialmente, gerou este estudo que tem por objetivo, avaliar e comparar a qualidade bacteriológica de águas minerais sem gás e gaseificadas artificialmente. Foram avaliadas oito marcas comercializadas nas cidades de Ribeirão Preto/SP e Araraquara/SP. As duzentos e quarenta amostras analisadas foram divididas em três lotes com cinco unidades gaseificadas e cinco sem gás de cada marca. Foram realizadas análises para determinação de bactérias do grupo coliforme, bactérias heterotróficas e *Pseudomonas aeruginosa*. Para análise de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se a técnica de substratos cromogênicos, para *Pseudomonas aeruginosa* utilizou-se a técnica de tubos múltiplos específica e para contagem de bactérias heterotróficas foi utilizada a técnica de cultivo em profundidade. Para as cento e vinte amostras não gaseificadas analisadas (100%), verificou-se a presença de coliformes totais em oito amostras (6,67%), presença de *E. coli* em seis amostras (5%), presença de *Pseudomonas aeruginosa* em cinco amostras (4,2%), e 102 amostras (85%) apresentaram contagem de bactérias heterotróficas maior que 500 UFC/mL. Para as cento e vinte amostras gaseificadas analisadas (100%) verificou-se que nenhuma das amostras apresentaram contaminações para o grupo coliforme (totais e *E. coli*) e para *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas três amostras (2,5%) apresentaram contagens superiores a 500 UFC/mL para bactérias heterotróficas. Todas as marcas das amostras não gaseificadas analisadas (100%) apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação em um ou mais parâmetros avaliados nesta pesquisa. Apenas duas marcas das amostras gaseificadas (25%) apresentaram-se fora dos padrões apenas para bactérias heterotróficas.

Palavras chave: água mineral; qualidade bacteriológica; coliformes; bactérias heterotróficas; *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The privation of studies on the microbiological quality of mineral water, mainly in artificially carbonated mineral water generated this study that purpose to value and to compare the microbiological quality of mineral water without gas and carbonated artificially, of eight types, sold in the cities of Araraquara/SP and Ribeirão Preto/SP. The two hundred forty analyzed samples were divided in shares with five unities carbonated mineral water and five without gas. There were put into practice analysis for determination of coliform bacteria, heterotrophic bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. To analysis of total coliform and *E. coli* it was used the chromogenic substrates technique, for *Pseudomonas aeruginosa* used the multiple tube specific technique and to counting heterotrophic bacteria, it was used the technique of growing in depth. To the one hundred twenty samples no carbonated water analyzed (100%), was checked the presence of total coliforms in eight samples (6,67%), presence of *E. coli* in six samples (5%), presence of *Pseudomonas aeruginosa* in five samples (4,2%), and one hundred two samples (85%) was with counts above 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. To the one hundred twenty carbonated water samples analyzed (100%), was checked that no samples analyzed was contaminated to the coliform group (total and *E. coli*) and to *Pseudomonas aeruginosa*. Just three samples (2,5%) present counts above 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. All the brands of the samples no carbonated water tested (100%) presents out of the specifications of Brazilian legislation in one or more parameters analyzed in this project. Just two brands of carbonated water samples (25%) presents out of the specifications to the heterotrophic bacteria.

Key words: mineral water microbiological quality, coliforms, heterotrophic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*.

1- INTRODUÇÃO

A abundância de água no planeta gera uma falsa sensação de recurso inesgotável; no entanto, a água é um recurso finito e não tão abundante quanto parece (MACÊDO, 2001). Esse fato fica evidenciado considerando que 97,5% da água existente no planeta é salgada (oceanos e mares) e dos 3% restantes, 2,493% da água doce está em geleiras ou regiões subterrâneas de difícil acesso, restando apenas 0,007% da água doce disponível para o consumo em rios, lagos e atmosfera (ALVES, *et. al.*, 2002).

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).

A cultura das águas minerais, data da era dos romanos, que eram amantes de banhos. No século XVII na França, o comércio de águas minerais foi regulamentado por Henrique, em maio de 1605. Ao longo do século XIX é que realmente nasceu a indústria de envasamento de água mineral, em função das suas propriedades medicinais. Com a expansão dos meios de transportes, principalmente as ferrovias, houve a abertura do comércio para os países vizinhos. 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 lançamento do garrafão de 20 litros, possibilitando a ampliação do mercado. Em 1970, outra novidade da indústria de águas minerais, que conquistou o consumidor, foi a garrafinha plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD). Em 1979, o crescimento do mercado aumentou ainda mais com a introdução do garrafão de plástico de policarbonato (MACÊDO, 2001).

A constante preocupação com a qualidade da água destinada ao consumo tem provocado uma contínua demanda por água mineral em todos os países. Além disso, o sabor e odores desagradáveis decorrentes da adição de flúor e cloro nas águas de abastecimento público e a falta de suprimentos de água potável segura durante viagens têm também resultado em um aumento na demanda de água mineral (AMARAL, *et. al.*, 2005; COELHO, *et. al.*, 1998; JEENA, *et. al.*, 2006; LIMA, 2003).

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captada de mananciais subterrâneos, caracterizada pelo conteúdo definido e constante

de sais minerais e pela presença de oligoelementos e outros constituintes; pode também ser gaseificada artificialmente (BRASIL, 2000).

Para que a água mineral natural apresente a qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, deve ser captada, processada e envasada, obedecendo às condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação (BRASIL, 2000; MACÊDO, 2001).

A vigilância rotineira da qualidade bacteriológica da água é indispensável, tendo em vista a necessidade de proteger a saúde dos consumidores, uma vez que a água de consumo humano é um importante veículo de enfermidades de natureza infecciosa. Observando o aumento no consumo de água mineral gaseificada e não gaseificada; bem como o aumento no número de estabelecimentos que comercializam o produto, a falta de estudos com águas minerais gaseificadas, 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 de volumes maiores, optou-se pela continuidade a pesquisa da qualidade de águas minerais em embalagens descartáveis com volumes menores, gaseificadas e não gaseificadas, geralmente consumidas individualmente.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostragem

Foram utilizados três lotes de águas minerais, sem gás e gaseificadas artificialmente, comercializadas em embalagens descartáveis em volumes de 300ml a 510ml. Para cada lote foram utilizadas cinco unidades de água mineral gaseificada artificialmente e cinco unidades não gaseificada, provenientes de mesma fonte, para cada marca; as amostras utilizadas foram provenientes de oito marcas diferentes adquiridas bimestralmente em supermercados das cidades de Ribeirão Preto e Araraquara-SP, totalizando 240 amostras que foram divididas em três lotes de 80, sendo 40 amostras com gás e 40 sem gás.

As amostras adquiridas foram conduzidas ao laboratório e mantidas em temperatura ambiente até o momento da análise, respeitando-se os prazos de validade.

2.2- Análises bacteriológicas

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

2.2.1 Determinação do número mais provável (NMP/100mL) de coliformes totais e *E.coli* nas amostras de água.

Para determinação da presença e NMP/100mL (número mais provável em 100 mL de amostra) de coliformes totais e *E.coli* utilizou-se a técnica de substratos cromogênicos (definidos), seguindo as orientações do APHA (2005) e do fabricante. Parte da amostra (100 mL), 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 o frasco foi agitado vagarosamente, até que todos os grânulos se dissolvessem. Com auxílio de uma pipeta estéril, transferiu-se 10mL da amostra de água mineral com substrato para cada um dos 10 tubos de cultura com tampa de rosca, estéreis, posteriormente incubados à temperatura de 35-37°C por 24 h.

Após esse período foram realizadas as leituras e o aparecimento de coloração amarelada nos tubos indicou positividade para coliformes totais. A partir do número de tubos positivos em cada amostra estimou-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 *E.coli*, 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 indicou positividade para *E.coli*. A partir dos tubos positivos, foi estimado o NMP/100mL utilizando-se a tabela apropriada (ANEXO A).

2.2.2 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 (2005) e Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1978).

Em cada placa foi distribuído 1,0mL da amostra adicionando em seguida cerca de 12 a 15mL do meio Plate Count Agar (PCA) fundido e resfriado (44 – 45°C); as placas foram homogeneizadas e, após solidificação do meio, incubadas em posição invertida por 48 ± 3 h a 35 - 37°C.

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

2.2.3 Determinação do número mais provável (NMP/100mL) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para determinação do NMP/100mL de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada a técnica de tubos múltiplos específica, seguindo as orientações do APHA (2005).

Para o teste presuntivo inocularam-se alíquotas de 10mL da amostra em cada um dos dez tubos contendo caldo asparagina em concentração dupla. Os tubos inoculados foram incubados em estufa à temperatura entre 35 – 37°C. Após 24h e novamente após 48hs 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, inoculou-se 0,1mL da cultura dos tubos positivos em tubos contendo caldo acetamida. A reação confirmatória positiva deu-se pelo desenvolvimento de pH elevado indicado pela coloração púrpura do meio em 24 – 36h de incubação a 35 – 37°C.

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

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a verificação da qualidade da água mineral, quanto aos parâmetros para coliformes totais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram adotados os padrões estabelecidos pela Resolução nº275 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que aprova o Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. (BRASIL, 2005). Como a legislação específica para água mineral não faz referência a bactérias heterotróficas, foi adotado como padrão o limite de 500UFC/mL citado na Portaria nº518 de 25 de março de 2004, que estabelece a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004).

De acordo com a Resolução nº 275, a água mineral não deve apresentar risco à saúde do consumidor, isto é, ser ausente de microrganismos patogênicos, seja na fonte, poço ou local de origem e na sua comercialização e estar em conformidade com as características microbiológicas descritas no quadro dos critérios microbiológicos (ANEXO B). Quanto à impropriedade para consumo humano, a amostra indicativa será condenada quando for constatada a presença de *E. coli* ou coliformes termotolerantes ou quando o número de coliformes totais e/ou *Pseudomonas aeruginosa* for maior que o limite estabelecido para amostra indicativa, que é menor que 1 UFC (unidade formadora de colônia)/100mL. A amostra representativa fornece informação a respeito da qualidade de um lote ou partida. Assim, um lote ou partida será rejeitado quando for detectada a presença de *E. coli* em qualquer uma das cinco unidades da amostra representativa, ou quando a contagem de coliformes totais e/ou *P. aeruginosa* ultrapassar o limite superior permitido que é de 2 UFC/100 mL em pelo menos uma das unidades amostrais, ou, ainda, quando ultrapassar o limite inferior permitido que é menor que 1 UFC/100 mL em mais de uma das unidades amostrais (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas para 120 amostras não gaseificadas (100%) estão apresentados na Tabela 5 (ANEXO D), que expressa respectivamente o número mais provável de bactérias (NMP/100mL) coliformes totais, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e a contagem de bactérias heterotróficas, expressa em UFC/mL. Observa-se a presença de coliformes totais em oito amostras (6,67%), referentes a três marcas (37,5%) analisadas, presença de *E. coli* em seis amostras (5%) referente a duas marcas (25%), presença de *Pseudomonas aeruginosa* em cinco amostras (4,2%), referente a quatro marcas (50%) e 102 amostras (85%) apresentaram

contagem de bactérias heterotróficas maior que 500 UFC/mL. Já os resultados das análises bacteriológicas para as amostras gaseificadas estão relacionados na Tabela 6 (ANEXO E), observa-se que nenhuma das 120 amostras analisadas (100%) apresentou contaminações para o grupo coliforme (totais e *E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas três amostras (2,5%) apresentaram contagens superiores a 500 UFC/mL.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 são apresentados os resultados obtidos referentes ao número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas estudadas em cada um dos três lotes, que atenderam ou não aos padrões estabelecidos pela legislação vigente, em relação a coliformes totais, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas.

A Tabela 4 relaciona o número de amostras por lote e marca que apresentaram contaminação para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

O Gráfico 1 demonstra o número de amostras por marcas que não atenderam aos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira para coliformes totais, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e Bactérias Heterotróficas.

Na Tabela 1 verifica-se a distribuição de amostras não gaseificadas bem como a de amostras gaseificadas analisadas no primeiro lote. Das 40 amostras não gaseificadas analisadas, todas não apresentaram contaminação para coliformes totais e para *E. coli*. Do total de 40 amostras analisadas para o parâmetro *Pseudomonas aeruginosa* verificou-se que 38 amostras (95%) não se apresentaram contaminadas, enquanto que, 2 amostras (5%) apresentaram contaminação. Para o parâmetro de bactérias heterotróficas foi constatado que apenas 11 amostras (27,5%) atenderam ao padrão estabelecido por legislação, enquanto que 29 amostras (72,5%) apresentaram contagens superiores a 500 UFC/ml. Para as amostras gaseificadas foi verificado que todas as amostras analisadas não apresentaram contaminação para coliformes totais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, atendendo aos padrões estabelecidos pela legislação de águas minerais. No entanto, verificou-se que apenas 2 amostras (5%) apresentaram contagens acima de 500UFC/mL para heterotróficos, estando em desconformidade com a legislação para potabilidade de água de consumo humano.

Tabela 1: Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no primeiro lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.

Parâmetros	Amostras Não Gaseificadas				Amostras Gaseificadas			
	Atenderam		Não Atenderam		Atenderam		Não Atenderam	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Coliformes Totais	40	100	0	0	40	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	40	100	0	0	40	100	0	0
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	38	95	2	5	40	100	0	0
Bactérias Heterotróficas	11	27,5	29	72,5	38	95	2	5

A Tabela 2 mostra a distribuição de amostras não gaseificadas e gaseificadas analisadas no segundo lote. Das 40 amostras não gaseificadas analisadas, verificou-se que 32 amostras (80%) não apresentaram contaminação e 8 amostras (20%) apresentaram contaminação para coliformes totais, não atendendo ao padrão estabelecido na legislação. Para *E. coli* verificou-se que 34 amostras (85%) não apresentaram contaminação, enquanto que 6 amostras (15%) apresentaram contaminação. Todas as 40 amostras analisadas não apresentaram contaminação para *Pseudomonas aeruginosa*, atendendo aos padrões estabelecidos pela legislação. Para bactérias heterotróficas, apenas 4 amostras (10%) apresentaram-se adequadas quanto à legislação, enquanto que 36 amostras (90%) apresentaram contagens elevadas para heterotróficos. Para as amostras gaseificadas foi verificado que todas as amostras analisadas não apresentaram contaminação para coliformes totais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, atendendo aos padrões estabelecidos pela legislação de águas minerais. No entanto, verificou-se que apenas 1 amostras (2,5%) apresentaram contagens acima de 500UFC/mL para heterotróficos, estando em desconformidade com a legislação para potabilidade de água de consumo humano.

Tabela 2: Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no segundo lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.

Parâmetros	Amostras Não Gaseificadas				Amostras Gaseificadas			
	Atenderam		Não Atenderam		Atenderam		Não Atenderam	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Coliformes Totais	32	80	8	20	40	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	34	85	6	15	40	100	0	0
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	40	100	0	0	40	100	0	0
Bactérias Heterotróficas	4	10	36	90	39	97,5	1	2,5

Na Tabela 3, verifica-se a distribuição de amostras não gaseificadas bem como a de amostras gaseificadas analisadas no terceiro lote. Todas as 40 amostras não gaseificadas não apresentaram contaminação para o grupo coliforme (coliformes totais e *E. coli*). Para *P. aeruginosa*, verificou-se que 37 amostras (92,5%) estavam de acordo com o padrão determinado pela legislação, enquanto que, 3 amostras (7,5%) apresentaram contaminação. Das 40 amostras analisadas para bactérias heterotróficas, verificou-se que apenas 3 amostras (7,5%) atenderam ao padrão, enquanto que 37 amostras (92,5%), estavam inadequadas. Para as amostras gaseificadas foi verificado que todas as amostras analisadas não apresentaram contaminação em nenhum dos parâmetros analisados nesta pesquisa.

Tabela 3: Número e porcentagem de amostras não gaseificadas e gaseificadas de águas minerais em embalagens individuais de 300 a 510mL no terceiro lote que atenderam e não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, comercializadas nas cidades de Araraquara - SP e Ribeirão Preto - SP.

Parâmetros	Amostras Não Gaseificadas				Amostras Gaseificadas			
	Atenderam		Não Atenderam		Atenderam		Não Atenderam	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Coliformes Totais	40	100	0	0	40	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	40	100	0	0	40	100	0	0
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	37	92,5	3	7,5	40	100	0	0
Bactérias Heterotróficas	3	7,5	37	92,5	40	100	0	0

Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa para ausência de coliformes totais foram descritos por Resende (2008) que em 10 marcas de águas minerais avaliadas (100%), nenhuma apresentou resultados positivos para a presença de coliformes totais e por Farache Filho *et. al.* (2008) que não constatarem contaminação para coliformes totais em 110 amostras de 1,5 litros de água mineral provenientes de 22 marcas diferentes. Para o parâmetro *E. coli*, resultados semelhantes foram descritos por Alves *et. al.* (2002) em garrafões de 20 litros, Resende (2008), e por Farache Filho *et. al.* (2008) em amostras de 1,5 litros, Dias (2008) em amostras de águas minerais em volumes de 330 a 600mL, Cabrini; Gallo (2001); Coelho *et. al.* (1998) e Nascimento *et. al.* (2000). O valor de 20% para presença de coliformes totais desta pesquisa foi inferior aos encontrados por Coelho *et. al.* (2010) que constatou a presença de bactérias do grupo coliformes totais em 38,33% das amostras, por Tancredi; Marins (2003) em 57,14%, Sant´Ana *et. al.* (2003) em 25% das amostras, Cabrini; Gallo (2001) em 26,7% e superior aos encontrados por Farache Filho; Dias (2008) em 15,3%, Alves *et. al.* (2002) que constatou presença de coliformes totais em 5,5% das amostras analisadas, Resende (2008) em 10% das amostras e por Dias (2008) com 2,9% das amostras positivas.

A ocorrência de coliformes totais em água mineral pode estar relacionada à ausência de cuidados sanitários, problemas nas operações de captação, canalização, filtração, envasamento ou outros, que possam alterar as propriedades e composição destas (COELHO *et. al.*, 1998). Isso revela a vulnerabilidade do setor industrial frente às contaminações.

A presença de coliformes totais em 8 amostras de quatro marcas (50%) analisadas demonstra a possibilidade de ocorrência de problemas em uma determinada fonte e/ou indústria de envasamento, o que sugere a necessidade de cuidados na fonte e/ou melhorias nas condições higiênicas durante as etapas do processo.

Para o parâmetro *E. coli*, o valor de 15% de contaminação, foi superior ao descrito por Farache Filho; Dias (2008) que constatarem presença de *E. coli* em apenas 2,4% e inferior aos achados por Sant´Ana *et. al.* (2003) em 20,4% das amostras analisadas em volumes de 20 litros.

A enumeração de *E. coli* é importante, pois sua presença indica poluição fecal e possibilidade da presença de outros microrganismos entéricos. Entretanto, o resultado negativo não implica em ausência de risco de contaminação fecal, pois este pode ser influenciado pelo número e tamanho da amostra, sensibilidade da metodologia utilizada,

quantidade presente de coliformes e a interação sinérgica com *Pseudomonas aeruginosa*, através da produção de uma substância denominada “Pseudocin” (PLS), que tem efeito bacteriostático sobre a *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella* sp., podendo dificultar o isolamento destes, alterando os resultados laboratoriais (COELHO *et. al.*, 2010; TANCREDI, 2002), além de haver cepas de *Salmonella* mais resistentes do que os coliformes (COELHO *et. al.*, 2010 e FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A interação sinérgica entre *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pode ter ocorrido nesta pesquisa como mostra a Tabela 5, de forma que, as amostras que apresentaram-se contaminadas por *E. coli* não estavam contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa* e vice versa.

Tabela 4: Relação das amostras não gaseificadas de acordo com lote e marca que apresentaram contaminação para *Pseudomonas aeruginosa* e para *E. coli*.

Marca	Amostra	Lote	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100mL)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)
B	5	1	2,2	0
	1	2	0	> 23
E	4	2	0	9,2
	1	2	0	> 23
	2	2	0	23
F	4	2	0	> 23
	5	2	0	> 23
G	3	3	5,1	0
	5	1	> 23	0
	5	3	1,1	0

Este mesmo efeito sinérgico foi descrito por Farache Filho *et. al.*, 2008, avaliando a qualidade microbiológica de águas minerais não carbonatadas em volumes de 1,5 litros e por Dias; Farache Filho, 2007, em águas minerais comercializadas na cidade de Araraquara SP.

Os valores de 5% e 7,5%, encontrados nesta pesquisa para *Pseudomonas aeruginosa* são inferiores aos achados por Coelho *et. al.* (2010) com positividade em 18,33% das amostras, Farache Filho; Dias (2008) em 9,5%, Guilherme *et. al.* (2000) em 22,7% e Nascimento *et. al.* (2000) em 50% das amostras analisadas e superiores aos valores encontrados por Dias (2008) com 4,3% e Farache Filho *et. al.* (2008) em 4,5%.

A pesquisa de Cabrini; Gallo (2001) revelou que não foi encontrada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em nenhuma das amostras de água mineral analisadas. Guimarães (2006) encontrou contaminação por *P. aeruginosa* em uma das cinco unidades de uma das marcas analisadas.

A *Pseudomonas aeruginosa* tem aparecido freqüentemente em exames bacteriológicos de águas cloradas, não-cloradas e até minerais naturais. Levando-se em conta que esse microrganismo inibe o crescimento dos coliformes, temos que estar alerta quanto à sua presença em águas de consumo humano (GUILHERME *et. al.*, 2000). Este fato pode ter ocorrido nesta pesquisa pois as cinco amostras que estavam contaminadas por *Pseudomonas* não apresentaram contaminação por coliformes.

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

Em águas engarrafadas, a presença desse microrganismo 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).

Por todas essas razões, são necessárias medidas adicionais de controle na proteção da fonte e na limpeza em todas as etapas do engarrafamento para garantir ausência de *Pseudomonas aeruginosa* no produto final.

Em relação às bactérias heterotróficas, índices elevados de contaminação também foram descritos por Coelho, *et. al.* (2010) que detectaram contagens superiores a 500UFC/mL em 65% das amostras; Domingues *et. al.* (2007) em 53,5%; Farache Filho, *et. al.* (2008) em 36,4%; Dias (2008) em 58%; Cabrini; Gallo (2001) em 38%; Nascimento *et. al.* (2000) em 50%; e Farache Filho; Dias (2008) em 61,9% das amostras; no entanto, Guimarães; Serafini, (2006) constatou que apenas quatro marcas (26,7%) apresentaram bactérias heterotróficas, mas em número inferior a de 500 UFC/mL.

Os achados nesta pesquisa para presença de bactérias heterotróficas em amostras gaseificadas é devido à ausência do gás carbônico no momento da análise para as três amostras, uma vez que o gás carbônico é um fator de proteção em relação à contaminação por bactérias heterotróficas (ANEXO C).

Mesmo que a maioria das bactérias heterotróficas da microbiota natural da água não seja considerada patogênica, é importante que sua densidade seja mantida sob controle, pois altas densidades dessas bactérias na água podem causar riscos à saúde do

consumidor. Algumas dessas bactérias podem atuar como patógenos oportunistas, deteriorantes da qualidade da água, ocasionando odores e sabores desagradáveis e produzindo limbo e películas, além de apresentarem influência inibidora para alguns microrganismos. Quando presentes em números elevados, podem impedir a detecção de coliformes (CABRINI; GALLO, 2001).

Leclerc; Moreau, 2002 e Sabioni; Silva, 2006, consideram a contagem total de microrganismos heterotróficos de grande importância em água mineral natural, uma vez que ajuda a monitorar prováveis alterações desde a fonte até o produto final envasado, isto é, permite avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial. Além disso, os mesmos autores relataram que esse tipo de análise pode auxiliar na identificação de fontes de contaminação ou se o produto foi adulterado por agentes sanitizantes, haja vista que a água mineral natural deve apresentar contaminação por bactérias indígenas.

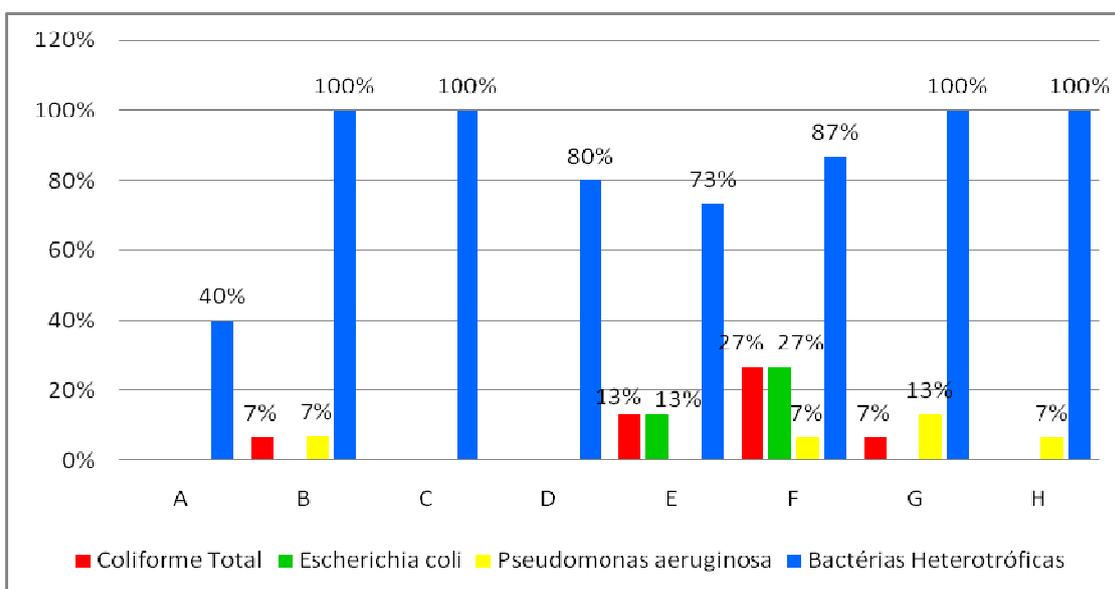
Estudos têm mostrado que as bactérias geralmente ocorrem em maior número em garrafas plásticas que nas de vidro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000b). Para Coelho *et. al.* (1998); Rosenberg (2003) isso ocorre devido à característica do plástico em permitir a passagem de O₂, além dos nutrientes liberados pelo plástico ser igualmente um possível contribuinte para o aumento da multiplicação bacteriana na água.

Nesta pesquisa observou-se ainda que algumas amostras da mesma marca apresentaram contagens elevadas de heterotróficos, enquanto que, 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; 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 é resultado da divisão celular e multiplicação de poucas células cultiváveis inicialmente presente.

No Gráfico 1 é possível se verificar a porcentagem de amostras não gaseificadas de acordo com a marca, que não atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira para águas minerais (coliformes totais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e ao padrão de potabilidade para água de consumo humano. Das 15 amostras analisadas (100%) para cada marca, a marca “A” apresentou-se fora dos padrões utilizados nesta

pesquisa apenas para bactérias heterotróficas com 40% das amostras com contagens superiores a 500 UFC/mL. Este valor foi inferior aos apresentados pelas marcas “C” e “D” que também apresentaram-se contaminadas apenas para heterotróficos, cuja contaminação foi em 100% e 80% das amostras, respectivamente. A marca “B” apresentou 7% de amostras contaminadas com coliformes totais, 7% de amostras contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* e 100% de amostras com contagens para heterotróficos acima de 500UFC/mL. Para a marca “E”, verificou-se que 13% das amostras apresentaram contaminação para coliformes totais e *Escherichia coli*, 73% para bactérias heterotróficas acima de 500UFC/mL e ausência de *Pseudomonas aeruginosa*. A marca “F” apresentou contaminações para todos os parâmetros avaliados nesta pesquisa, sendo, 27% das amostras contaminadas com coliformes totais e termotolerantes, 7% das amostras com *Pseudomonas aeruginosa* e 87% de amostras com contagens superiores a 500UFC/mL para bactérias heterotróficas. A marca “G” apresentou 7% de amostras contaminadas por coliformes totais, 13% de amostras contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa* e 100% das amostras com contagens elevadas de bactérias heterotróficas. A marca “H” apresentou-se contaminada apenas por *Pseudomonas aeruginosa* (7%) e com contagens elevadas para bactérias heterotróficas em 100% das amostras analisadas.

Gráfico 1: Porcentagem de amostras não gaseificadas que não atenderam aos padrões para coliformes totais, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas estabelecidos pela legislação brasileira para águas minerais e para o padrão de potabilidade de água para o consumo humano.



Observou-se ainda nesta pesquisa que, do total de 240 amostras gaseificadas e não gaseificadas analisadas (100%), 105 amostras (43,75%) de todas as 8 marcas (100%) apresentaram-se fora do padrão em um ou mais dos indicadores especificados pela legislação brasileira para águas minerais e ao padrão de potabilidade para água de consumo humano adotado. Esse fato evidencia que apesar da maioria das águas minerais analisadas estarem em acordo com os padrões da legislação para águas minerais, têm qualidade duvidosa para consumo humano por apresentarem contagens elevadas para bactérias heterotróficas.

A legislação para águas minerais não considera a contagem de bactérias heterotróficas como um indicador de contaminação, no entanto a legislação para águas potáveis sugere que essa contaminação não ultrapasse a 500 UFC/mL. Como que podemos ingerir água mineral sem ser potável?

4 – CONCLUSÕES

Apenas as amostras não gaseificadas apresentaram contaminações para coliformes totais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* bem como maior contaminação por bactérias heterotróficas.

A menor contaminação por bactérias heterotróficas e a ausência dos demais indicadores de contaminação avaliados nesta pesquisa em amostras de água mineral gaseificada artificialmente mostra que o gás carbônico constitui fator de proteção para contaminação bacteriológica nessas águas.

As amostras gaseificadas que apresentaram contaminação para bactérias heterotróficas, estavam sem gás no momento da análise, o que pode ter contribuído para contagens superiores a 500 UFC/mL.

Todas as marcas não gaseificadas tiveram amostras contaminadas por um ou mais dos indicadores de contaminação bacteriológicos estabelecidos pelas legislações de água mineral ou apresentaram contagem para bactérias heterotróficas acima do estabelecido pelo padrão de potabilidade da água para consumo humano utilizados nesta pesquisa.

As análises realizadas mostraram que a marca “A” foi considerada a menos contaminada e a marca “F” a que mais apresentou contaminações das águas minerais avaliadas.

O grande número de amostras com contagem para bactérias heterotróficas superior a 500UFC/mL evidencia a importância do estabelecimento de um padrão para esse grupo de microrganismo como indicador de contaminação para águas minerais.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 th. ed. Washington, D.C.: APHA, 2005. p.9-140.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise Microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento. **Rev. Saúde Pública.**, Marília, São Paulo, v. 36. n.6. dez. 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.

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.

BRASIL, Resolução nº275 de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 set. 2005, Seção 1.

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.

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.

COELHO, M. I. S.; MENDES, E. S.; CRUZ, M. C. S.; BEZERRA, S. S.; SILVA, R. P. P. Avaliação microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. *Maringá*, v.32, n.1, p. 1-8, 2010.

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

DIAS, M. F. F. Qualidade microbiológica de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara, SP. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

DIAS, M. F. F. Qualidade microbiológica de águas minerais em embalagens individuais comercializadas em Araraquara-SP. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 18, n. 2, p. 177-181, abr./jun., 2007.

DOMINGUES, V. O. *et. al.* Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 15-19, 2007.

FARACHE FILHO, A.; DIAS, M. F. F. Qualidade microbiológica em águas minerais em galões de 20 litros. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 3. p. 243-248, 2008.

FARACHE FILHO, A.; DIAS, M. F. F.; TAROMARU, P. H.; CERQUEIRA, C. de S.; DUQUE, J. G. Qualidade microbiológica de águas minerais não carbonatadas em embalagens de 1,5 litros, comercializadas em Araraquara-SP. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 4. p. 421-425, 2008.

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

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.

GUIMARÃES, A. P. R. C.; SERAFINI, A. B. **Água Mineral: Aspectos Históricos e Microbiológicos**. GO. 2006.

JEENA, M. I. *et. al.* Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v.209, p.191-196, 2006.

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

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

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

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.

RESENDE, A. Perfil Microbiológico da água mineral comercializada no Distrito Federal. SaBios: **Rev. Saúde e Biol.**, v. 3, n.2, p. 16-22. 2008.

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

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.

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.

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

TANCREDI, R. C. P.; CERQUEIRA, E.; MARINS, B. R. Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro: avaliação da qualidade sanitária. Boletim de Divulgação Técnica e Científica, ano 4, n.13, 2002.

TANCREDI, R. C. P.; MARINS, B. R. Avaliação da qualidade sanitária de águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro. **Rev. Hig. Alim.**, v. 17, n. 104-105, p. 107-108, 2003.

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>. Acesso em: 7 jan 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bottled Drinking water. 2000b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs256/en/index.html>>. Acesso em: 30 mar. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Water and Public Health. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S01.pdf>. Acesso em: 02 fev 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. 2006a. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq_0506.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2009.

ANEXOS

ANEXO A

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.

N° 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, 2005

ANEXO B

Quadro dos Critérios Microbiológicos definidos para água natural mineral e água natural.

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

ANEXO C

Cálculo do Teste Q-Quadrado para verificação da segurança do gás carbônico frente à contaminação para bactérias heterotróficas:

Hipótese H0 (nulidade):

O gás carbônico não apresenta-se como fator de proteção para as amostras gaseificadas em relação à contaminação por bactérias heterotróficas.

Hipótese H1:

O gás carbônico apresenta-se como fator de proteção para as amostras gaseificadas em relação à contaminação por bactérias heterotróficas.

	Atendeu	Não Atendeu	Total
Sem gás	18	102	120
Com gás	117	3	120
Total	135	105	240

$$X^2 = 165,95$$

O $\alpha = 5\%$ e 1 grau de liberdade

$$X^2 \text{ tabela} = 3,841.$$

Como $x^2 > x^2 \text{ tabela}$, aceita-se H1. Portanto o gás carbônico apresenta-se como fator de proteção para as amostras gaseificadas em relação à contaminação por bactérias heterotróficas.

ANEXO D

Tabela 5 - NMP/mL de coliformes totais, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostras de água mineral não gaseificadas em garrafas de 330 à 510mL, comercializadas nas cidades de Ribeirão Preto - SP e Araraquara – SP.

Marca	Lote	Amostra	Coliformes Totais (NMP/100ml)	<i>E. coli</i> (NMP/100ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100ml)	Bactérias Heterotróficas (UFC/mL)	
A	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0	
		1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2
		1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		1	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		2	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
		2	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
		2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	10
		3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.300
		3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.100
		3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
		3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
		3	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
B	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	720	
		1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.100
		1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	710
		1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.600
		1	5	< 1,1	< 1,1	2,2	1.400
		2	1	1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
		2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
		2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.300
		2	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
		2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
		3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.700

C	3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.100
	3	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.000
	1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.300
	1	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.500
	2	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.600
	2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.500
	2	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	D	3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1
3		2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.300
3		3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.700
3		4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.000
3		5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.500
1		1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	124
1		2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1
1		3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.200
1		4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
1		5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	92
2		1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.100
2		2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.500
2		3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.600
2		4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.500
2		5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.700
3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.800	
3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.700	
3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.600	
3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.100	

E	3	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.000
	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
	1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.700
	1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
	1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	25
	1	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
	2	1	>23	>23	< 1,1	>6.500
	2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
	2	4	9,2	9,2	< 1,1	>6.500
	2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0
	3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
	F	3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1
3		5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.200
1		1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.300
1		2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.400
1		3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
1		4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	870
1		5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
2		1	>23	>23	< 1,1	1.800
2		2	>23	23	< 1,1	1.900
2		3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.600
2		4	>23	>23	< 1,1	1.300
2		5	>23	>23	< 1,1	1.100
3		1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1
3		2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.600
3		3	< 1,1	< 1,1	5,1	>6.500
3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.000	
3	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0	
G	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500

	1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.600
	1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.300
	1	5	< 1,1	< 1,1	>23	1.600
	2	1	>23	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.400
	2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.300
	2	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1.400
	3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.100
	3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	5	< 1,1	< 1,1	1,1	2.800
H	1	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	1	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	2	5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	>6.500
	3	1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.800
	3	2	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
	3	3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	3.200
	3	4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2.700
	3	5	< 1,1	< 1,1	9,2	2.900

ANEXO E

Tabela 6 - NMP/mL de coliformes totais, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e UFC/mL de bactérias heterotróficas, por marcas e amostras de água mineral gaseificadas em garrafas de 330 à 510mL, comercializadas nas cidades de Ribeirão Preto - SP e Araraquara – SP.

Marca	Lote	Amostra	Coliformes Totais (NMP/100ml)	<i>E. coli</i> (NMP/100ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100ml)	Bactérias Heterotróficas (UFC/mL)	
A	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0	
		1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
		1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
		1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
		1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	1	<1,1	<1,1	<1,1	2
		2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
		3	1	<1,1	<1,1	<1,1	21
		3	2	<1,1	<1,1	<1,1	4
		3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
		3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
		3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
B	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0	
		1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
		1	3	<1,1	<1,1	<1,1	4
		1	4	<1,1	<1,1	<1,1	11
		1	5	<1,1	<1,1	<1,1	1
		2	1	<1,1	<1,1	<1,1	23
		2	2	<1,1	<1,1	<1,1	24
		2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
		2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
		3	1	<1,1	<1,1	<1,1	0

	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
C	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	1.900
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	700
	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	1
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
D	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	2
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	3
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	1
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	1
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0

	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	3
E	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	2
	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	8
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	3
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
F	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	1
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	2
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	4
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	1
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	29
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
G	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0

	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
H	1	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	2	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	1	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	2	<1,1	<1,1	<1,1	4.500
	2	3	<1,1	<1,1	<1,1	1
	2	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	2	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	1	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	2	<1,1	<1,1	<1,1	1
	3	3	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	4	<1,1	<1,1	<1,1	0
	3	5	<1,1	<1,1	<1,1	0
