



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

RENATA FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS ENVASADAS (ÁGUA MINERAL E
ADICIONADA DE SAIS)**

FORTALEZA

2016

RENATA FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS ENVASADAS (ÁGUA MINERAL E
ADICIONADA DE SAIS)**

Monografia apresentada à Banca examinadora,
com exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia, pela Universidade
Federal do Ceará.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Maria
Barros Souza

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

L71a	Lima, Renata Ferreira. Avaliação bacteriológica de águas envasadas (água mineral e adicionada de sais) / Renata Ferreira Lima. – Fortaleza, 2016. 51 f. : il. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016. Orientação: Profa. Dra. Francisca Maria Barros Souza. 1. Água Engarrafada. 2. Águas Minerais. 3. Qualidade da Água. I. Título.
------	---

CDD 615.1

RENATA FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS ENVASADAS (ÁGUA MINERAL E
ADICIONADA DE SAIS)**

Monografia apresentada à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia, pela Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Maria Barros Souza (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Patrícia Maria Pontes Thé
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Cristiani Lopes Capistrano G. de Oliveira
Universidade Federal do Ceará- UFC

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a qualidade microbiológica de águas envasadas (minerais e adicionada de sais) comercializadas em diferentes pontos da cidade de Fortaleza. Foram coletadas vinte amostras de águas, sendo onze (11) em garrafas de 500 mL e nove (9) em garrafas de 20 litros. A análise microbiológica contemplou a determinação do número total de bactérias (carga bacteriana) e a pesquisa de coliformes totais e fecais. Foram empregados três métodos para contagem bacteriana (contagem em tubos múltiplos, contagem em placas e método de filtração em membrana) e uma técnica para pesquisa de coliformes. Os métodos de contagem geral de bactérias através das três técnicas utilizadas, revelaram que 70% das amostras analisadas apresentaram níveis acima do limite estabelecido para águas potáveis, e dos 30% que estavam dentro dos limites aceitáveis, 10% não apresentaram contaminação microbiana. Os resultados evidenciaram como má qualidade bacteriológica resultados acima de 500 UFC/mL e a presença de coliformes, de acordo com a Portaria nº 2914, do MS, de 12 de dezembro de 2011. Na pesquisa de coliformes totais, 25% das amostras analisadas foram reprovadas, todas em garrafas de 20 litros, e nenhuma amostra apresentou coliforme fecal. Além da avaliação bacteriológica, foi avaliado o pH das amostras, onde somente 60% apresentaram pH dentro dos limites especificados nas normas vigentes. Logo, é importante adotar medidas preventivas na preparação das águas envasadas, seguindo as boas práticas de fabricação, acondicionamento, transporte e lavagem dos recipientes retornáveis, oferecendo ao consumidor um produto com segurança.

Palavras-chave: Água Engarrafada. Águas Minerais. Qualidade da Água.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological quality of bottled water (mineral and containing salts) marketed in different parts of the city of Fortaleza. Twenty water samples were collected, eleven (11) in 500 mL bottles and nine (9) in 20 liter bottles. Microbiological analysis included the determination of the total number of bacteria (bacterial load) and the survey for total and fecal coliform bacterias. Three methods were used for bacterial count: multiple-tube fermentation technique, aerobic plate count and membrane filter technique) and a specific technique to detect coliform bacteria. The bacteria count from these three techniques revealed that 70% of the samples showed above the safety limit for potable water, and between the 30% which were within acceptable limits, 10% of these showed no microbial contamination. The results showed bad bacteriological quality results, like above 500 CFU/mL and the presence of coliform bacteria, according to Regulation No. 2914, from Ministério da Saúde, released in 12 December 2011. According to the total coliform survey, 25% of the samples were disapproved, every one of them from the 20 liter bottles, and no sample showed fecal coliform bacteria. In addition to the bacteriological evaluation, the pH of the samples was also measured, and only 60% of them were within legal limits. Therefore, it is important to take preventive measures in the preparation of bottled water, following good manufacturing practices, packaging, transportation and washing of returnable containers, offering to the consumer a safe product.

Keywords: Bottled Water. Mineral Waters. Water Quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aparelho de medição do pH.....	22
Figura 2	Esquema representando a metodologia por Tubos Múltiplos.....	25
Figura 3	Esquema representando o método de Contagem em Placa.....	26
Figura 4	Esquema representando o método de filtração em membrana.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Relação de amostras de água mineral e adicionada de sais coletadas e analisadas.....	21
Tabela 2-	Resultado da determinação de pH para todas as amostras em análise.....	28
Tabela 3-	Tabela demonstrando a forma de expressar os resultados da contagem por tubos múltiplos –Número mais provável e limites de confiança 95%.....	29
Tabela 4-	Contagem bactéria em tubos múltiplos para garrafas de 500 mL de águas minerais e adicionadas de sais.....	30
Tabela 5-	Contagem bacteriana em tubos múltiplos para garrafas de 20litros.....	31
Tabela 6-	Contagem bacteriana por filtração em membranas das amostras de água em garrafas de 500mL.....	32
Tabela 7-	Contagem bacteriana por filtração em membranas das amostras de água em garrafas de 20 litros.....	33
Tabela 8-	Contagem bacteriana em placas das amostras de água em garrafas de 500mL em diferentes diluições.....	34
Tabela 9-	Contagem bacteriana em placa das amostras de água em garrafas de 20 litros m diferentes diluições.....	35
Tabela 10-	Resultado da análise pelo método de cromogênio para garrafa de 500mL...	36
Tabela 11-	Resultado da análise pelo método de cromogênio para garrafa de 20 litros.	37
Tabela 12-	Resultados das águas minerais de recipiente de 500mL.....	38
Tabela 13-	Resultados encontrados das águas adicionada de sais de recipiente de 500mL.....	39
Tabela 14-	Resultados das águas minerais de recipiente de 20 litros.....	40
Tabela 15-	Resultados das águas adicionadas de sais em recipiente de 20litros.....	40
Tabela 16-	Resultado geral das amostras analisadas.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1	Legislação relacionada à qualidade da água para consumo humano.....	11
3.1.1	Antecedentes da legislação brasileira de potabilidade de água para consumo humano	11
3.2.	Água potável.....	12
3.2.1	Padrão de potabilidade.....	12
3.3	Águas envasadas.....	13
3.3.1	Água mineral.....	14
3.3.2	Água adicionadas de sais.....	14
3.4	Controle de qualidade microbiológico.....	15
3.4.1	Indicadores de contaminação.....	15
3.4.2	Métodos de análise.....	17
3.4.2.1	<i>Método rápido.....</i>	<i>17</i>
3.4.2.2	<i>Contagem Em Placa.....</i>	<i>18</i>
3.4.2.3	<i>Número Mais Provável.....</i>	<i>18</i>
3.4.2.4	<i>Contagem por Filtração em Membrana.....</i>	<i>19</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
7	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS	
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A água é essencial à vida e ao desenvolvimento humano, pois está presente em todos os seguimentos da vida (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007). A água é uma reserva mineral barata e de direito de todos, devendo atender as necessidades humanas, tais como: fisiológicas, econômicas e domésticas com continuidade, cobertura e custo, mas não basta que a população apenas tenha acesso à água, é necessário também que esse recurso tenha qualidade assegurada (MATTOS; SILVA, 2002).

A água sendo de má qualidade pode trazer riscos à saúde do homem, contendo vários agentes biológicos e químicos (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007). Doenças transmitidas pela água são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, de animais e humanos, transmitidos quando são excretados nas fezes de indivíduos infectados e depois ingeridos na forma de água ou alimento contaminado (GRABOW, 1996).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças transmitidas pela água, principalmente crianças menores de cinco anos de idade, idosos e pacientes imunocomprometidos. Doenças estas que poderiam ser prevenidas apenas melhorando a cobertura e a qualidade dos serviços de saneamento. Em média 80% das doenças que acometem países subdesenvolvidos provem de água contaminada. No Brasil, em média 30% dos habitantes consomem água de origem insegura e a população que recebe a cobertura dos serviços públicos de abastecimento nem sempre recebe água com qualidade exigida e em quantidade suficiente (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010).

É dever do Estado o controle da qualidade da água, garantindo primeiramente a gestão adequada dos recursos hídricos e o uso consciente do recurso, pois a garantia da segurança da água potável depende do bom funcionamento de diversas etapas de abastecimento, que vão desde o tratamento até a distribuição e, caso alguma delas apresente falhas, pode desencadear um processo de contaminação (BRASIL, 2011).

A constante preocupação com a qualidade da água de abastecimento público, decorrente da progressiva poluição hídrica, o cidadão passou a consumir cada vez mais águas envasadas como: água mineral natural e água purificada adicionada de sais (LECLERC; MOREAU, 2002). Dados da empresa de consultoria internacional *Beverage Marketing Corporation* (BMC) divulgados pelo Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM)

indicam que o país é o quarto maior mercado consumidor de água envasada no mundo, tendo consumido 17,4 bilhões de litros em 2012, representando crescimento de 2,4% em relação a 2011 (REIS, BEVILACQUA, CARMO, 2014).

Para atender a esse aumento na demanda, as indústrias aumentaram a produção, bem como o número de empresas novas no mercado. Assim, torna-se necessário investigar se a qualidade da água paga pelo consumidor realmente atende aos parâmetros de potabilidade já regulamentados (SABIONI; SILVA, 2006).

Parte da população muitas vezes imagina que a água envasada é um produto puro e seguro, o que não é necessariamente verdadeiro. A preocupação da comunidade científica na temática da qualidade da água envasada vem aumentando bastante nos últimos anos. São muitos os registros de estudos que comparam a qualidade da água envasada com a água proveniente da torneira, considerando a contaminação microbiológica (QUEIROZ, 2011).

O Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária dos Alimentos (PNMQSA) foi criado pela ANVISA em 2000, com objetivo de controlar e fiscalizar amostras de diversos alimentos expostos ao consumo, avaliando o padrão sanitário e a adequação da rotulagem. Em 2002, dados do programa revelou que a qualidade microbiológica foi insatisfatória em 10,5% das 714 amostras analisadas de águas minerais comercializadas em todo o país. Outros estudos também apontam que as águas envasadas não são fontes necessariamente seguras, podendo oferecer riscos à saúde dos consumidores (BRASIL, 2002).

Diante do exposto, com aumento no consumo de águas envasadas, cujas características higiênico-sanitárias adequadas estão relacionadas à saúde dos consumidores, torna-se necessária a realização das análises microbiológicas no âmbito da saúde coletiva, pois a água é um meio para o crescimento microbiano e o mercado deve oferecer produtos de qualidade garantida em conformidade com os padrões rigorosos do Ministério da Saúde.

2 OBJETIVOS:

2.1 GERAL:

Avaliar a qualidade microbiológica das águas envasadas das diferentes marcas comercializadas no município de Fortaleza.

2.2 ESPECÍFICOS:

Determinar a carga bacteriana empregando três métodos de análise

Pesquisar a presença de coliformes como indicativo da qualidade da água.

Avaliar o (pH) das águas envasadas minerais e adicionada de sais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente existem diversas tipologias de águas envasadas, entretanto, nota-se uma associação da terminologia água envasada com água mineral no Brasil. Diante disso, buscou-se investigar diversos aspectos relacionados às águas envasadas, com base nas legislações vigentes, categorizando os agentes que fazem parte atualmente desse campo (QUEIROZ, 2011).

3.1 Legislação relacionada à qualidade da água para consumo humano.

3.1.2 Antecedentes da legislação brasileira de potabilidade de água para consumo humano.

A qualidade da água se tornou uma questão de interesse para a saúde pública no final do século XIX e início do século XX. Anteriormente, essa qualidade era associada apenas a aspectos estéticos e sensoriais, tais como: a cor, o sabor e o odor (FREITAS; FREITAS, 2005). Na atualidade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a instituição que acompanha e recomenda os valores máximos permitidos da qualidade da água, a partir dos estudos toxicológicos realizados em todo o mundo e publicados em diferentes revistas e eventos científicos especializados no tema. Nos Estados Unidos, no Canadá, e na Comunidade Europeia, apesar de se basearem também nas recomendações da OMS, estimulam pesquisas e bioensaios que acabam servindo de referência tanto para a OMS como para os demais países. Todas as normas de potabilidade no Brasil seguem basicamente os padrões recomendados pela Organização Mundial de Saúde no *Guidelines for Drinking-Water Quality* (WHO) (FREITAS; FREITAS, 2005).

No Brasil, a normatização da qualidade da água para consumo humano foi iniciada na década de 1945. Diante da necessidade de se padronizar o aproveitamento das águas minerais utilizadas para a comercialização por meio do engarrafamento e para outros fins, foi assinado o Decreto-Lei, nº 7.841, publicado no Diário Oficial da União (DOU), de 20 de agosto de 1945, conhecido como "Código das Águas Minerais", em vigor até hoje, com algumas alterações (BRASIL, 1945). Já a primeira legislação nacional que normatizou uma composição microbiológica definida da água foi o decreto federal nº 79.367 de 9 de março de 1977, que estabeleceu a competência do Ministério da Saúde sobre a definição do padrão de potabilidade da água para consumo humano, a ser observado em todo território nacional,

através da portaria nº 56 BSB publicada em 14 de março de 1977 (FREITAS; FREITAS, 2005; BRASIL, 1977).

A Portaria BSB nº 56/1977 foi revisada em 1990 e resultou na Portaria GM nº 36/1990, seguida da Portaria MS nº 1469 de 29 de dezembro de 2000. Em função do novo ordenamento na estrutura do Ministério da Saúde com a instituição da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), a Portaria MS nº 1469/2000 foi extinta passando a vigorar a Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004 (FERNANDES, SARCINELLI, 2014; BRASIL, 2001).

Em 14 de dezembro de 2011, o Ministério da Saúde publicou no Diário Oficial da União, Seção 1, a Portaria Nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011, a qual dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A OPAS/OMS do Brasil cooperou com todo processo de revisão, vale destacar que a elaboração desta normativa teve como base as guias de qualidade de água potável da OMS. Conforme art. 53 desta nova portaria “Fica revogada a Portaria nº 518/GM/MS, de 25 de março de 2004, publicada no Diário Oficial da União, Seção 1, do dia 26 seguinte, página 266” ((BETTEGA *et al.*, 2006; BRASIL, 2011).

3.1 Água potável

Água potável é a água para consumo humano destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem, atendendo ao padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria nº 2.914, do MS, de 12 de dezembro de 2011 e que não ofereça riscos à saúde (BRASIL, 2011).

3.2.1 Padrões de potabilidade

Padrão de potabilidade é o conjunto de valores permitidos como parâmetro da qualidade da água para consumo humano, conforme definido na Portaria nº 2.914, do MS, de 12 de dezembro de 2011. A mesma não deve conter microrganismos patogênicos e deve estar livre de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Os indicadores de contaminação fecal, tradicionalmente aceitos, pertencem a um grupo de bactérias denominadas coliformes fecais. O principal representante desse grupo é a espécie *Escherichia coli* (FUNASA, 2004).

Contagem de bactérias heterotróficas determina a densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriada, sob condições pré-estabelecidas de incubação: $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para identificação de irregularidade e providências devem ser adotadas para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL (BRASIL, 2011).

O termo pH representa a concentração de íons hidrogênio em uma solução. Na água, esse fator é de excepcional importância, principalmente nos processos de tratamento. Na rotina dos laboratórios das estações de tratamento ele é medido e ajustado sempre que necessário para melhorar o processo de coagulação/floculação da água e também o controle da desinfecção. O valor do pH varia de 0 a 14. Abaixo de 7 a água é considerada ácida e acima de 7, alcalina. Água com pH 7 é neutra. A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde recomenda que o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5 (FUNASA, 2004).

3.2 Águas envasadas

O enchimento e a vedação com tampa da embalagem com água são definidos como processo de envase, resultando no produto chamado “água envasada”. Após o envase, a água passa a ser considerada um alimento e é regulada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2006). As águas envasadas devem apresentar qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, devendo ser captadas, processadas e envasadas obedecendo às condições higiênico-sanitárias e às Boas Práticas de Fabricação, conforme as legislações vigentes (REIS, BEVILACQUA, CARMO, 2014).

De acordo com a RDC nº 173/2006, o envase e o fechamento das embalagens devem ser realizados por equipamentos automáticos, garantindo a vedação das embalagens para evitar vazamentos e contaminação da água (BRASIL, 2006). O estabelecimento industrial que produz água mineral natural ou água natural deve estabelecer e executar plano de amostragem, envolvendo as diversas etapas da industrialização e prevendo, obrigatoriamente, coletas de amostras no ponto de captação e no reservatório de armazenamento e definir limites de aceitação. Essa resolução também determina que a água envasada

só pode ser vendida em estabelecimentos comerciais de alimentos ou bebidas (IWERSEN *et al.*, 2009).

3.2.1 Água mineral

Água mineral natural é aquela obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, considerando as flutuações naturais conforme a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 274, de setembro de 2005, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). Segundo essa mesma Resolução, as etapas às quais a água mineral natural deve ser submetida, desde a captação até o armazenamento, não podem produzir, desenvolver e/ou agregar substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor e/ou alterem a composição original do produto. Os únicos tratamentos que ela pode receber é a filtração ou a decantação (e a adição de gás, caso seja necessário). Portanto, os sais minerais que ela possui vieram naturalmente da fonte de onde ela foi obtida (FREITAS; FREITAS, 2005).

A composição da água mineral é basicamente sódio, cloreto, sulfato, bário, nitrato, zinco e lítio, podendo sofrer pequenas variações dependendo da fonte. A razão pela qual a água adquire essa composição definida de sais minerais, oligoelementos e outros constituintes são porque a água da chuva penetra no solo e atravessa diversas camadas até chegar às impermeáveis, onde estacionam. Nesse trajeto por baixo do solo, a água passa por várias rochas cheias de substâncias minerais, como carbonato e sulfato de cálcio, que se diluem na água enriquecendo-a. Quando a água acumulada no subterrâneo sofre pressão de um novo volume d'água, ela sobe para a superfície e surge em locais específicos chamados nascentes (CASTRO; CARVALHO; VALE, 2010).

Atualmente existe uma resolução específica de controle de qualidade microbiológico de águas minerais: RDC n° 275, de 22 de setembro de 2005 que trata do "REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL" (BRASIL, 2005).

3.2.2 Água adicionadas de sais

Água Adicionada de Sais é a água para consumo humano preparada e envasada, contendo um ou mais dos compostos previstos no Regulamento da Diretoria Colegiada (RDC) nº 274/2005. Não deve conter açúcares, adoçantes, aromas ou outros ingredientes, ou seja, água adicionada de sais ou "Água adicionada de vitaminas e minerais", como também é chamada, é a bebida processada artificialmente e que possui adição de produtos químicos no caso sais minerais em quantidade mínima e máxima já definida pela resolução (BRASIL, 2005). Já o controle de qualidade microbiológico e físico-químico de águas adicionadas de sais é regulamentado pela Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde como para qualquer água potável (BRASIL, 2011).

Em outras palavras, água adicionada de sais é qualquer água potável, de “torneira”, de água de surgência ou de poço tubular, por exemplo, tratada através de diversos mecanismos (filtração, floculação, adição de flúor, cloro, etc), onde em seu processo final há adição, de forma artificial, de alguns sais minerais, para deixá-la mais parecidas com a água mineral. A água adicionada de sais é uma “invenção” americana e em alguns países, como a França e a Itália, sua produção é proibida.

3.3 Controle de qualidade microbiológico

O controle de qualidade pode ser definido como o conjunto de operações (programação, coordenação e execução) realizadas com o objetivo de verificar a conformidade das preparações com as especificações estabelecidas (FUNASA, 2004).

Na análise ou monitoramento da qualidade microbiológica da água avalia-se a contagem e a presença de organismos patogênicos, determinados pela presença ou ausência de indicadores biológicos específicos e suas respectivas populações, de acordo com a Portaria nº 2914, do MS, de 12 de dezembro de 2011. Os mais importantes organismos patogênicos da água são as bactérias, vírus, protozoários e helmintos que veiculados pela água causam diversas doenças (BETTEGA *et al.*, 2006; VILHENA *et al.*, 2009). As bactérias do grupo coliformes, bastonetes gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*, são os indicadores biológicos mais comumente utilizados ao estudo de qualidade da água (BETTEGA *et al.*, 2006; MATTOS; SILVA, 2002)

3.3.1 Indicadores de contaminação

Não existe um indicador ideal de qualidade sanitária da água, mas sim alguns organismos que se aproximam das exigências referidas (BETTEGA *et al.*, 2006). Um deles é o grupo dos coliformes totais que inclui todas as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35° C. Neste grupo incluem-se microrganismos de diferentes características bioquímicas. São formados pelos gêneros *Escherichia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e outros gêneros menos comuns. Esta definição é a mesma para o grupo de coliformes fecais ou termotolerantes, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5 a 45,5°C. O índice de coliformes totais avalia as condições higiênicas e o de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal e condições higiênico-sanitárias, visto que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *Escherichia coli*, o principal representante desse grupo (FREITAS, FREITAS, 2001; VILHENA, DUARTE, SILVEIRA, 2009; CARDOSO *et al.*, 2003; MOURA; ASSUMPÇÃO; BISCHOFF, 2009).

A *Escherichia coli* é o microrganismo mais estudado em todo o mundo. Responsável por patologias como: pneumonias, meningites e infecções intestinais, que podem causar diarreias moderadas a severas levando o indivíduo à morte quando o tratamento não é eficaz (ZIESE *et al.*, 1996). Considerado o principal representante do grupo e o indicador específico de contaminação fecal e apresenta-se como um dos habitantes mais comuns do trato gastrointestinal. Sua presença na água e alimentos é um indicativo de contaminação de dejetos humanos ou de animais de sangue quente contaminados. Dessa forma, *E. coli* são bactérias indicadoras de qualidade da água e devem estar ausentes nas águas destinadas ao consumo humano (TORTORA; BERDELL; CASE 2005).

A contagem de bactérias heterotróficas (carga bacteriana) também é bastante utilizada como indicador de qualidade da água, pois indicam a necessidade de desinfecção da água quando encontrada em altas concentrações. O termo bactérias heterotróficas inclui todas as bactérias que usam nutrientes orgânicos para o seu crescimento. Elas estão presentes em todos os tipos de água, alimento, solo, vegetação e ar e para apresentar risco à saúde devem estar presentes em altas concentrações. A sua contagem representa diversos microrganismos isolados que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes e fornece informação da

qualidade bacteriológica da água de forma ampla, servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre eventuais falhas principalmente na desinfecção e a qualidade higiênico-sanitário (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2004).

3.3.2 Métodos de análise

Dentre os métodos utilizados para determinar a qualidade microbiológica de água envasadas, destacam-se o método convencional de fermentação em tubos múltiplos (FTM), contagem em placa, contagem por filtração em membrana e os métodos rápidos Colilert e Colitag. O método FTM, contagem por filtração em membrana e a contagem em placa apresenta como desvantagem o fato de ser muito trabalhoso e demorado (até 96 horas). Já os métodos rápidos Colilert e Colitag se tornam vantajosos por utilizarem somente um meio e demorarem apenas 24 horas para darem o resultado da análise, possibilitando ações corretivas, caso seja detectada a contaminação da água, impedindo o consumo de uma água possivelmente contaminada (MARQUEZI; GALO; DIAS; 2010).

3.3.2.1 Métodos rápidos

Método substrato cromogênico/fluorogênico é um método qualitativo que se baseia na utilização de substratos análogos à lactose (glicopiranosídeos) específicos para coliformes. Por exemplos ONPG (Orto Nitrofenil galactopiranosídeo) MUG (Metil-Umbeliferone Galactopiranosídeo). Colilert®-Substrato Cromogênico Definido ONPG MUG, com resultados confirmativos para presença de Coliformes Totais e *E.coli* em 24 horas pelo desenvolvimento de coloração amarela e observação de fluorescência, sem necessidade da adição de outros reagentes para confirmação (CEBALLOS; PELLIZARI; KONIG; CATÃO, 1999).

O princípio do método se baseia na utilização, pelos coliformes de um substrato cromogênico (b-Dgalactopiranosido) através do emprego da enzima b-D- galactosidase, liberando-se uma substância que muda a cor do meio (o cromógeno onitrofenol amarelo forte). Pode-se então dizer que o teste determina a produção desta enzima (ONPG) normalmente presente nas estirpes de coliformes e indica em 24 horas coliformes totais positivos. Por sua vez, *E. Coli* possui a enzima b-glucoronidase que cliva o b-D-glucoronido-4-metilumbelliferona liberando (MUG) 4-metil-umbelliferona que é fluorescente sob a luz

Ultravioleta $\lambda=366\text{nm}$, ou seja após 24 horas é possível também determinar a presença de *E.coli* (CEBALLOS; PELLIZARI; KONIG; CATÃO, 1999).

3.4.2.2 Contagem em placa

O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios, mesófilos, aeróbios psicrófilos, termófilos, bolores e leveduras, variando o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação. Por este método, amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas em séries, em diluente apropriado, plaqueadas com ou sobre um meio de ágar apropriado e incubadas, após isso todas as colônias visíveis são contadas. O procedimento se baseia na premissa de que cada célula presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe permita crescer (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

3.4.2.3 Número Mais Provável

A técnica do Número Mais Provável (NMP), também chamada de técnica dos tubos múltiplos, é outra maneira bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos, como coliformes fecais, coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Na técnica do Número Mais Provável (NMP), o produto a ser analisado, após homogeneização, é submetido a pelo menos três diluições decimais seriadas. De cada uma dessas diluições, alíquotas iguais são transferidas para três ou para cinco tubos contendo o meio de cultura escolhido. Todos os tubos são incubados, e em seguida, os positivos são identificados. Pelo número de tubos positivos em cada uma das diluições empregada determina-se o Número Mais Provável por grama de produto, tendo como base a tabela estatística de Hoskins para três ou para cinco tubos. O NMP é estimado a partir de resultados relatados como positivos e negativos em uma ou mais diluições decimais da amostra (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

3.4.2.4 Contagem por Filtração em Membrana

A filtração por membrana é uma técnica que utiliza uma barreira física, sob a forma de membrana porosa ou filtro, para separar as partículas num fluído. Estas partículas são separadas com base no seu tamanho e forma, utilizando para tal o efeito da pressão e membranas especialmente desenhadas para o processo, apresentando poros com diferentes diâmetros (THOMET; GALLMANN, 2003).

São utilizados equipamentos de filtração que permitam a transferência da membrana para os meios de cultura. As membranas de nitrato de celulose, por exemplo, podem ser utilizadas para soluções aquosas, oleosas ou fracamente alcoólicas e as membranas de acetato de celulose para soluções fortemente alcoólicas. Preparar a amostra usando método mais adequado previamente determinado (BRASIL, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Pinça metálica
- Placas de Petri nas dimensões de 60 x 15 mm
- Unidade de Filtração
- Membranas celulose com Porosidade de 0,45 μm (47 mm de diâmetro)
- Erlenmeyer de 50 mL, 150 mL e 250 mL
- Kitassato 1000 mL
- Pipetas graduadas de 1mL, 5 mL e 10 mL
- Placa de Petri de 20 x 100 mm
- Estantes para Tubos de Ensaio
- Tubos de ensaios com tampa rosqueável

4.2 Meios de Cultura

- Ágar Caseína Soja
- Caldo Caseína Soja

4.3 Diluentes/ Reagente

- Água Destilada
- Água Peptonada tamponada
- Álcool 70%

4.4 Equipamentos

- Balança analítica
- Banho-Maria
- Capela de Fluxo Laminar

- Estufa de cultura (Marca/Modelo: LabTrade / EB-100)
- Geladeira
- pHmetro
- Bomba a Vácuo

4.5 Amostras

As amostras foram adquiridas com recurso próprio, em estabelecimentos comerciais de diferentes bairros de Fortaleza no período do mês de julho a agosto de 2015, o considerando as marcas mais comercializadas de água mineral e adicionadas de sais em embalagens de 500 mL e de 20 litros disponíveis para venda. Foram analisadas 20 marcas, sendo 11 de 500mL (6 minerais e 5 adicionada de sais) e 9 de garrações de 20 litros (4 minerais e 5 adicionada de sais).

Foram codificadas por letras de A1-A6 (águas minerais de 500mL), B1-B5 (águas adicionadas de sais de 500mL), C1-C4 (águas minerais de 20 litros) e D1-D5 (águas adicionadas de sais de 20 litros) (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de amostras de água mineral e adicionada de sais coletadas e analisadas

Marcas	Envase	Tipos de água
A1	500 mL	Água Mineral
A2	500 mL	Água Mineral
A3	500 mL	Água Mineral
A4	500 mL	Água Mineral
A5	500 mL	Água Mineral
A6	500 mL	Água Mineral
B1	500 mL	Água Adicionada de Sais
B2	500 mL	Água Adicionada de Sais
B3	500 mL	Água Adicionada de Sais
B4	500 mL	Água Adicionada de Sais
B5	500 mL	Água Adicionada de Sais
C1	20 Litros	Água Mineral
C2	20 Litros	Água Mineral
C3	20 Litros	Água Mineral
C4	20 Litros	Água Mineral
D1	20 Litros	Água Adicionada de Sais
D2	20 Litros	Água Adicionada de Sais
D3	20 Litros	Água Adicionada de Sais
D4	20 Litros	Água Adicionada de Sais
D5	20 Litros	Água Adicionada de Sais

Para as garrafas de 500 mL, foram coletadas duas amostras de cada marca para a primeira análise laboratorial sempre verificado data de fabricação, validade e se apresentava alguma violação no lacre das embalagens. As amostras foram mantidas sob refrigeração, em sua embalagem de origem.

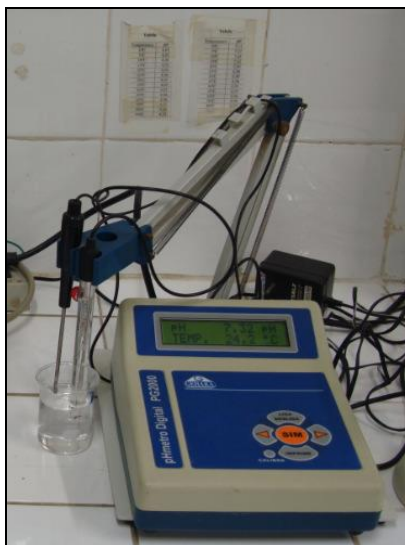
Já para os garrafões de 20 litros, foram coletadas duas alíquotas de cada marca com aproximadamente 200 mL cada, de lugares previamente estabelecidos pela autora. No momento do recebimento dos garrafões, foram coletados em frascos devidamente esterilizados e levados ao laboratório para análise imediata. Foi realizada avaliação geral, observando a validade e condições da embalagem. Após a homogeneização dos galões, procedia-se à higienização das mãos, parte externa e da parte superior do galão (gargalo e base do gargalo) com álcool à 70% para realizar a amostragem.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

4.6 Determinações do pH

Para a determinação do pH foi utilizado potenciômetro Digital (a 25 °C) – marca GEHAKA, modelo PG2000 (Figura 1), pertencente ao laboratório de controle de qualidade da Farmácia-Escola da Universidade Federal do Ceará.

Figura 1 –Aparelho de medição do pH



4.7 Metodologias para Controle Microbiológico

As Técnicas utilizadas para o controle de qualidade microbiológico foram baseadas na Farmacopeia Brasileira V, 5ª edição, 2010 e no Manual Prático de Análise de Água (FUNASA).

A análise da carga bacteriana (também denominada de contagem de bactérias heterotróficas) em amostras de água pode ser dada pela contagem de microrganismos totais. Este método é capaz de determinar o número total de bactérias presente em produtos e matérias-primas não-estéreis. O método consistiu na contagem da população de microrganismos que apresentem crescimento visível, em 4 dias, em caldo ou ágar caseína-soja a 30-35° C. A determinação pode ser efetuada através do método de contagem em placas, método dos tubos múltiplos e filtração em membrana.

O método de contagem em placa consistiu em transferir 1 mL das diluições da amostra em placas de Petri com posterior adição de 15-20 mL de meio de cultura adequado (ágar caseína-soja) seguida de incubação. O método dos tubos múltiplos consiste em transferir assepticamente 1 mL das diluições da amostra em 9 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo de caseína-soja seguido de incubação a 30-35°C durante 4 dias. Já para o método de filtração em membrana, transfere-se 10 mL, ou a quantidade de diluição que represente 1g ou 1 mL da amostra a ser testada, para uma membrana e filtrar imediatamente. Lavar as membranas pelo menos três vezes com aproximadamente 100mL do fluido de lavagem adequado. Transferir uma das membranas para a superfície de uma placa contendo ágar caseína-soja, incubar a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 3 a 5 dias, para determinação do número de microrganismos heterotróficos totais. Calcular o número de UFC por grama ou mililitro do produto.

Realizou-se também em todas as amostras a pesquisa de coliformes através do método cromogênio (método rápido).

4.7.1 Procedimentos

Prevendo a quantidade de meios necessários para três análises, foram preparados, aproximadamente:

- 400 mL de Água Peptonada
- 300 mL de Caldo Soja Caseína – 10 mL por tubo (30 tubos)
- 400 mL de Ágar Soja Caseína

Utilizou-se a autoclave para esterilizar o material do experimento e os meios previamente preparados, conforme instrução do fabricante.

Todos os experimentos foram realizados na capela de fluxo laminar com materiais e vidrarias devidamente esterilizados.

4.7.2 Métodos de Contagem Geral Microbiana.

4.7.2.1 Métodos de Contagem por Tubos Múltiplos

A escolha do método é determinada por fatores tais como a natureza do produto e o número esperado de microrganismos. Este método é limitado quanto a esses aspectos, pois somente é utilizado quando apresentem limpidez e se espera que o produto apresente densidade bacteriana baixa. Sendo portanto, um método recomendado para a avaliação da contaminação das águas minerais e adicionadas de sais.

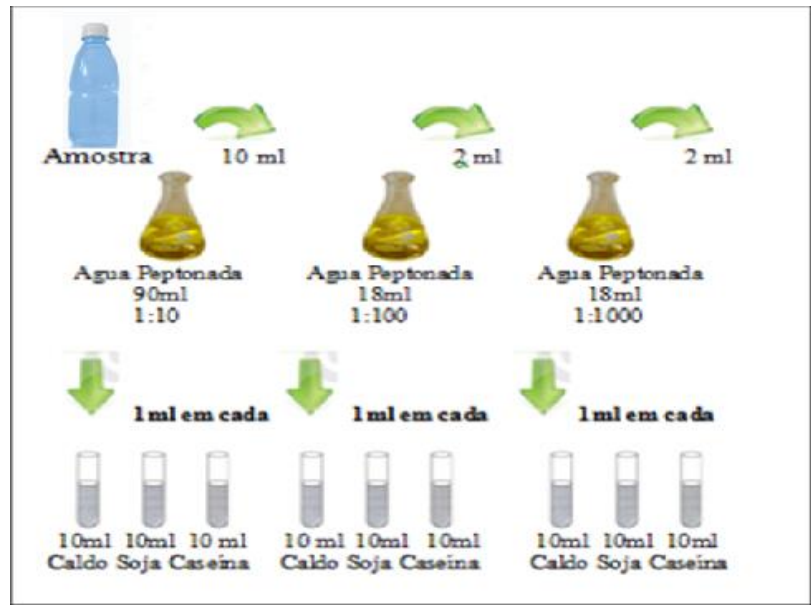
Preparou-se as amostras, inicialmente na diluição 1:10, pipetando-se assepticamente 10 mL da água em 90 mL de Água Peptonada. Desta preparou-se diluições 1:100 e 1:1000. Empregou-se uma série de doze tubos de ensaio distribuídos de 3 em 3, contendo 10 mL de caldo de caseína-soja.

Aos três primeiros tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL da diluição 1:10, aos três tubos seguintes 1 mL da diluição 1:100 e aos próximos três tubos, 1 mL da diluição 1:1000.

Aos três últimos tubos, adicionou-se 1 mL do diluente (água peptonada) e em outros tubos outro somente o meio de cultura, representando o controle negativo. Os mesmos foram incubados a 30-35°C durante 4 dias.

Os tubos de ensaio contendo o diluente e somente o meio de cultura (caldo soja caseína) não devem apresentar crescimento microbiano. Os tubos de ensaio que apresentavam turvação do meio de cultura (caldo soja caseína), atribuído crescimento de microrganismos, foram apresentados como resultado positivo e comparados a tabela de referência para apreciação dos resultados. A análise foi realizada em duplicata (Figura 2).

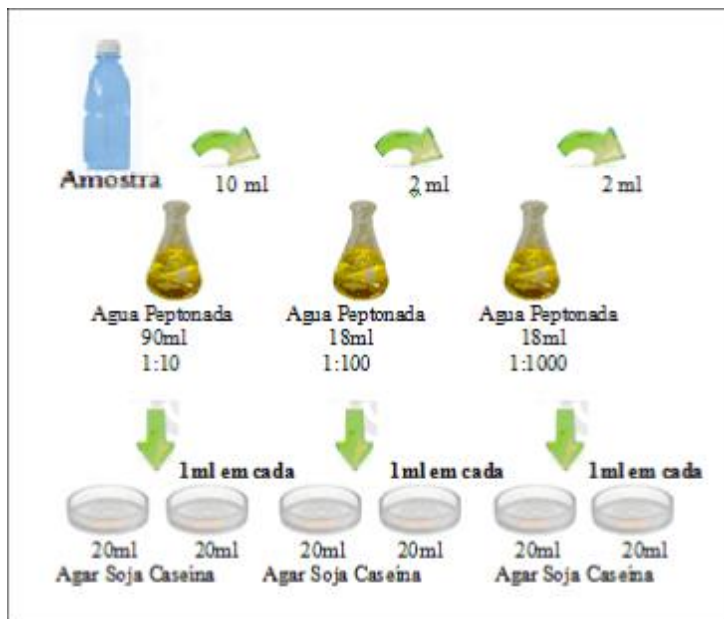
Figura 2 – Esquema representando a metodologia por Tubos Múltiplos



4.7.2.2 Métodos de Contagem em Placas

A preparação das amostras ocorreu com a transferência de 10 mL da mistura de amostras para erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada tamponada, que promove o crescimento de microrganismo (diluição). Agitou-se. Transferiu-se 2 mL desta diluição para 18 mL de Água Peptonada (diluição) e transferiu-se 2 mL da última diluição para 18 mL de Água Peptonada (diluição).

As placas de Petri foram previamente identificadas com data, lote, diluição e amostra em análise. Preparou-se duas placas de Petri para cada diluição, empregando-se placas de Petri 100 x 20 mm. Foi inoculado a cada placa 1 mL de cada diluição (1:10; 1:100 e 1:1000) em seguida, foram adicionados 20 mL de ágar de caseína-soja liquefeito a 45°C, homogeneizou suavemente as placas sobre a bancada (formando um 8), de modo a que o meio não entrasse em contato com a tampa da placa. Após solidificação, as placas foram incubadas a 30-35°C, durante 4 dias (Figura 3).

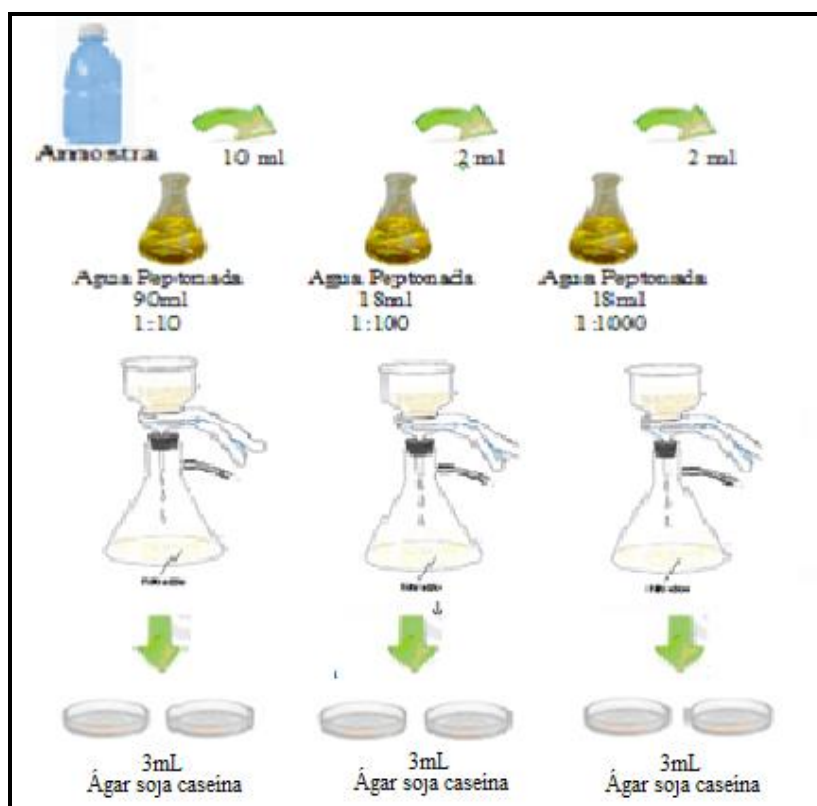
Figura 3 – Esquema representando o método de Contagem em Placa

Após período de incubação, as colônias desenvolvidas na superfície do ágar foram contadas, multiplicando-se o número de colônias encontradas pela diluição utilizada. Calculou-se as médias aritméticas dos resultados encontrados e os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Somente as placas que apresentaram até 300 colônias foram consideradas para registro dos resultados.

4.7.2.3 Métodos de Filtração em Membranas

As amostras foram homogeneizadas manualmente antes de serem aliqüotadas. Sobre as membranas, primeiramente, foram vertidos aproximadamente 30 mL de água destilada estéril, para tornar mais uniforme a distribuição das células, contidas na amostra, sobre a membrana. Das diluições preparadas das amostras (1:10; 1:100 e 1:1000) foram pipetadas as alíquotas de 1 mL de cada uma das diluições, sobre as membranas filtrantes com porosidade 0,45 μm em suporte fechado, denominado como unidade de filtração, previamente autoclavado. As alíquotas foram filtradas separadamente, com o auxílio de um sistema bomba de vácuo e Kitassato, e em seguida as membranas foram colocadas em placas de Petri 60 x 15mm, contendo 3 mL dos meios de cultura ágar soja caseína. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2,5$ °C durante 3-5 dias. Toda a análise foi realizada em duplicata (Figura 4).

Figura 4- Esquema representando o método de filtração em membrana



Após o período de incubação, as colônias desenvolvidas sobre a superfície da membrana foram contadas, multiplicando-se o número de colônias encontradas pela diluição utilizada. As médias aritméticas dos resultados encontrados foram expressos em unidade formadoras de colônias por mL.

4.7.2.4 Método Substrato Cromogênio

O procedimento basicamente consistiu em adicionar o conteúdo do flaconete (reagente cromogênico) em 100 mL da amostra de água, homogeneizando-se e incubando-se a 35°C por 24 horas, a análise foi realizada em duplicata. Após período de incubação, faz-se a interpretação dos resultados, baseados nos parâmetros estabelecidos: permanecendo incolor a amostra é negativa para coliformes, mudança da solução para amarelo a amostra é positiva para coliformes totais. Em seguida a amostra positiva é exposta à radiação UV (366 nm), e se apresentar fluorescência azul o resultado é considerado positivo para coliforme fecal, especificamente presença de *Escherichia coli*.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Determinações do pH

A Tabela 2 mostra o resultado das 20 amostras analisadas, sendo A1, A2, A3, A4, A5, A6, C1, C2, C3 e C4 (águas minerais), B1, B2, B3, B4, B5, D1, D2, D3, D4 e D5 (adicionadas de sais).

Tabela 2 - Resultado da determinação de pH para todas as amostras em análise.

Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH
A1	5,9	A 6	6,7	B5	6,3	D1	6,3
A 2	4,55	B1	7,8	C1	5,3	D2	6,6
A 3	4,33	B2	6,5	C2	5,6	D3	6,2
A 4	6,0	B3	6,0	C3	5,8	D4	5,8
A 5	5,4	B4	7,3	C4	6,5	D5	6,0

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

C1-C4: Águas minerais 20 L;

(D1-D5):águas adicionadas de sais de 20L.

Das 20 amostras analisadas, apenas 60 % apresentaram valores de pH dentro dos limites estabelecidos, faixa de pH de 6,0 a 9,5 pela Portaria nº 2014, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). O pH de todas as águas adicionadas de sais, com exceção da D4, apresentaram valores dentro da faixa estabelecida pelas normas vigentes.

5.2 Avaliações bacteriológica

5.2.1 Contagem em Tubos Múltiplos

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que permite estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise. Esta técnica não permite a contagem exata de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias (UFC), como acontece com a técnica de contagem em placas e de filtração em membrana, mas uma probabilidade de resultados. A análise por NMP é recomendada somente para amostras que

apresentam baixa densidade microbiana. Os resultados são determinados com o auxílio de uma tabela de referência, citada na Farmacopeia Brasileira (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela demonstrando a forma de expressar os resultados da contagem por tubos múltiplos –Número mais provável e limites de confiança 95%

Número de tubos positivos			NMP por g, ou mL do produto	Limite de confiança a 95%
Número de g, ou mL do produto por tubo				
10 ⁻¹ (0,1)	10 ⁻² (0,01)	10 ⁻³ (0,001)		
0	0	0	<3	0,0 – 9,4
0	0	1	3	0,1 – 9,5
0	1	0	3	0,1 – 10
0	1	1	6,1	1,2 – 17
0	2	0	6,2	1,2 – 17
0	3	0	9,4	3,5 – 35
1	0	0	3,6	0,2 – 17
1	0	1	7,2	1,2 – 17
1	0	2	11	04 – 35
1	1	0	7,4	1,3 – 20
1	1	1	11	04 – 35
1	2	0	11	04 – 35
1	2	1	15	05 – 38
1	3	0	16	05 – 38
2	0	0	9,2	1,5 – 35
2	0	1	14	04 – 35
2	0	2	20	05 – 38
2	1	0	15	04 – 38
2	1	1	20	05 – 38
2	1	2	27	09 – 94
2	2	0	21	05 – 40
2	2	1	28	09 – 94
2	2	2	35	09 – 94
2	3	0	29	09 – 94
2	3	1	36	09 – 94
3	0	0	23	05 – 94
3	0	1	38	09 – 104
3	0	2	64	16 – 181
3	1	0	43	09 – 181
3	1	1	75	17 – 199
3	1	2	120	30 – 360
3	1	3	160	30 – 380
3	2	0	93	18 – 360
3	2	1	150	30 – 380
3	2	2	210	30 – 400
3	2	3	290	90 – 990
3	3	0	240	40 – 990
3	3	1	460	90 – 1980
3	3	2	1100	200 – 4000
3	3	3	>1100	

Fonte: Farmacopéia Brasileira V, 5ª edição, 2010

As amostras A1, A2, A3 (água mineral) e B4 (água adicionada de sais) revelaram valores elevados (> 1100 NMP/ mL) (Tabela 4), ocorrendo a turvação nas três diluições

analisadas. Ou seja, as águas analisadas contêm contaminação bacteriana acima do preconizado. De acordo com a Portaria nº 2914 do MS o limite de aceitação é de 500 UFC/mL equivalente a 500 NMP/mL.

Somente as amostras A4, A5 e A6 (águas minerais) não apresentaram turvação, ou seja, possuem baixos valores bacterianos (<3 NMP / mL), como mostra a Tabela 4, apresentando níveis mínimos de contaminação bacteriana quando comparamos os valores junto a tabela de referência (Tabela 3). Já as marcas B1, B2, B3 e B5 (adicionadas de sais) apresentaram crescimento dentro do limite de aceitação (Tabela 4).

Tabela 4 - Contagem bacteriana em tubos múltiplos em garrafas de 500 mL de águas minerais e adicionadas de sais.

Amostra	Análise da diluição 1:10	Análise da diluição 1:100	Análise da diluição 1:1000	Resultado NMP(mL)	Média NMP(mL)
A1	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
A2	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
A3	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
A4	0	0	0	<3	<3
	0	0	0	<3	
A5	0	0	0	<3	<3
	0	0	0	<3	
A6	0	0	0	<3	<3
	0	0	0	<3	
B1	3	1	0	43	32
	2	2	0	21	
B2	2	0	1	14	18,5
	3	0	0	23	
B3	3	0	1	38	40,5
	3	1	0	43	
B4	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
B5	2	1	0	15	54
	3	2	0	93	

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

Para garrações de 20 litros as amostras revelaram, na maioria dos casos, grau de contaminação elevado corresponde ao último grau da tabela de referência (> 1100 NMP / mL), ocorrendo a turvação nas diluições analisadas. Somente as amostras C3 (água mineral) e D3 (água adicionadas de sais) não apresentaram crescimento bacteriano acima de 500 NMP/mL (Tabela 5).

Tabela 5 - Contagem bacteriana em tubos múltiplos para garrafas de 20 litros.

Amostra	Análise da diluição 1:10	Análise da diluição 1:100	Análise da diluição 1:1000	Resultado NMP(mL)	Média NMP(mL)
C1	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
C2	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
C3	3	3	0	240	166,5
	3	2	0	93	
C4	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
D1	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
D2	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
D3	2	1	1	20	20
	2	1	1	20	
D4	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	
D5	3	3	3	>1100	>1100
	3	3	3	>1100	

C1-C4: Águas minerais 20 L;

(D1-D5):águas adicionadas de sais de 20L.

5.2.2. Contagem por Filtração em Membranas

O método de contagem por filtração em membranas, por ser um método mais sensível quanto a detecção não possibilitou enumeração das colônias bacterianas na diluição testada em algumas amostras de água mineral e adicionadas de sais, apresentando sobreposição de colônias. Foram avaliadas em diluições maiores, isto é, acima da diluição 1:1000, para poder visualizar o número de colônias formadas. A diluição limite para o método de tubos múltiplos, recomendado para análise de água potável, não permite contabilizar o real valor da contaminação, sendo atribuídos valores expressos como maior que 1100 NMP/mL. Como a turvação dos meios de cultura ocorria em todos os tubos, apresentando resultados

máximos da tabela de referência, consideramos que os resultados foram compatíveis com o método de filtração em membrana.

De acordo com a Tabela 6, três das amostras de 500 mL não puderam ser contabilizadas, as quais se uniram umas às outras impossibilitando, assim, a contagem das mesmas, mas cinco amostras tiveram crescimentos de colônias isoladas, possibilitando enumeração microbiana. As amostras A4, A5 e A6 (águas minerais) não apresentaram crescimento, confirmando o resultado da análise de tubos múltiplos e as amostras A1, A2, A3 (águas minerais) e B1, B2, B4 e B5 (águas adicionadas de sais) das águas de 500 mL mostraram valores acima de 500 UFC/mL (tabela 6). A marca B3 apresentou resultado de 150 UFC/mL, ou seja, dentro do limite de aceitação.

Tabela 6- Contagem bacteriana por filtração em membranas de garrafas de 500ml.

Amostra		Resultado UFC/ mL*	Média UFC/ mL*
A1	1º análise	Incontáveis (>1000)	>1000
	2º análise	Incontáveis (>1000)	
A2	1º análise	Incontáveis (>1000)	>1000
	2º análise	Incontáveis (>1000)	
A3	1º análise	2900	2575
	2º análise	2250	
A4	1º análise	< 10	< 10
	2º análise	< 10	
A5	1º análise	< 10	< 10
	2º análise	< 10	
A6	1º análise	< 10	< 10
	2º análise	< 10	
B1	1º análise	Incontáveis (>1000)	>1000
	2º análise	Incontáveis (>1000)	
B2	1º análise	7000	5750
	2º análise	4500	
B3	1º análise	150	150
	2º análise	150	
B4	1º análise	1350	4675
	2º análise	8000	
B5	1º análise	640	1320
	2º análise	2000	

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

As amostras de garrafão de 20 litros avaliadas também apresentaram colônias sobrepostas, mas apresentaram crescimentos isolados em cinco das amostras (Tabela 7), confirmando a análise dos tubos múltiplos e novamente, as marcas C3 e D3 tiveram seus valores abaixo de 500 UFC/mL. A análise foi realizada em duplicata e, posteriormente realizada a média aritmética dos resultados encontrados.

Tabela 7- Contagem bacteriana por filtração em membranas em garrafas de 20 litros.

Amostra	Resultados UFC/ mL*	Média UFC/ mL*
C1	10,2.10 ⁴ Incontáveis (>1000)	10,2.10 ⁴
C2	11,2. 10 ⁴ Incontáveis (>1000)	11,2. 10 ⁴
C3	< 10 100	55
C4	11600 31000	2,1.10 ⁴
D1	2,64. 10 ⁴ 6,3. 10 ⁴	4,4.10 ⁴
D2	Incontáveis (>1000) 39000	3,9.10 ⁴
D3	100 < 10	55
D4	Incontáveis (>1000) Incontáveis (>1000)	>1000
D5	2,0. 10 ⁴ 18,7. 10 ⁴	10,3.10 ⁴

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

C1-C4: Águas minerais 20 L;

(D1-D5):águas adicionadas de sais de 20L.

5.2.3 Contagem em Placas

A Tabela 8 mostra a contagem de colônias em placas para cada diluição previamente determinada a partir das análises dos tubos múltiplos. As amostras A5 e A6 não apresentaram crescimento na placa, confirmando, assim, os resultados anteriores. Já a amostra B2 também não apresentou crescimento bacteriano e um baixo crescimento pelo método em tubos múltiplos. As amostras A1, A2, A3 (água mineral) e as amostras B4 e B5 (águas adicionadas de sais) apresentaram resultados acima de 500 UFC/mL.

Tabela 8- Contagem bacteriana em placas em garrafas de 500mL em diferentes diluições.

Amostra	Diluição	Número de colônias	Resultado UFC/ mL*	Média UFC/ mL*
A1	1:100	54	5400	5950
	1:100	65	6500	
A2	1:100	19	1900	2000
	1:100	21	2100	
A3	1:100	7	700	600
	1:100	5	500	
A4	1:10	18	180	115
	1:10	5	50	
A5	1:10	0	< 10	< 10
	1:10	0	< 10	
A6	1:10	0	< 10	< 10
	1:10	0	< 10	
B1	1:10	22	220	240
	1:10	26	260	
B2	1:100	0	< 100	< 100
	1:100	0	< 100	
B3	1:100	1	100	100
	1:100	0	< 100	
B4	1:100	7	700	600
	1:100	5	500	
B5	1:100	1	100	700
	1:100	13	1300	

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

Em garrafas de 20 litros, somente duas amostras não apresentaram crescimento (C3 e D3) em suas determinadas diluições, todas as outras tiveram seus valores acima de 500 UFC/mL. A amostra D4 não apresentou crescimento, mas a partir de sua diluição e dos resultados anteriores seu resultado está acima de 500 UFC/mL (Tabela 9).

Tabela -9 Contagem bacteriana em placa em garrafas de 20 litros em diferentes diluições.

Amostra	Diluição	Número de colônias	Resultado UFC/ mL*	Média UFC/ mL*
C1	1:1000	21 col.	21000	22500
	1:1000	24 col.	24000	
C2	1:1000	17 col.	17000	17000
	1:1000	17 col.	17000	
C3	1:100	0 col.	< 100	< 100
	1:100	0 col.	< 100	
C4	1:100	25 col.	2500	1750
	1:100	10 col.	1000	
D1	1:1000	6 col.	6000	8500
	1:1000	11 col.	11000	
D2	1:1000	29 col.	29000	28000
	1:1000	27 col.	27000	
D3	1:100	0 col.	< 100	< 100
	1:100	0 col.	< 100	
D4	1:1000	0 col.	< 1000	< 1000
	1:1000	0 col.	< 1000	
D5	1:1000	115 col.	115000	115000
	1:1000	Incontável	Incontável	

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

C1-C4: Águas minerais 20 L;

(D1-D5):águas adicionadas de sais de 20L.

5.2.4 Método Substrato Cromogênio

A Tabela 10 revela que todas as amostras de águas minerais e adicionadas de sais de 500 mL tiveram seus resultados negativos para coliformes totais e coliformes fecais. A ausência de coliformes é um dos indicativos da qualidade da água. O método cromogênico é o mais comumente empregado para esta análise.

Tabela 10- Resultado da análise de cromogênio para garrafa de 500mL.

Amostra		Resultado para coliformes totais	Resultado para coliformes fecais
A1	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
A2	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
A3	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
A4	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
A5	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
A6	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
B1	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
B2	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
B3	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
B4	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
B5	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

Através da Tabela 11 podemos observar que as águas de garrafões de 20 litros, tanto as águas minerais (C2 e C4) quanto águas adicionadas de sais (D2, D3, e D4) apresentaram coliformes totais, em cerca de 5 das amostras de 20 litros. De acordo com a Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005 que trata do "REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL" e a Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde estabelecem: coliformes totais, em 100 mL da amostra deve conter <1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência (para análise qualitativa).

Tabela 11- Resultado da análise de cromogênio para garrafa de 20 litros.

Amostra		Resultado para coliformes totais	Resultado para coliformes fecais
C1	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
C2	1º análise	Presente	Ausente
	2º análise	Presente	Ausente
C3	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
C4	1º análise	Presente	Ausente
	2º análise	Presente	Ausente
D1	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente
D2	1º análise	Presente	Ausente
	2º análise	Presente	Ausente
D3	1º análise	Presente	Ausente
	2º análise	Presente	Ausente
D4	1º análise	Presente	Ausente
	2º análise	Presente	Ausente
D5	1º análise	Ausente	Ausente
	2º análise	Ausente	Ausente

C1-C4: Águas minerais 20 L;

(D1-D5): águas adicionadas de sais de 20L.

A Tabela 12 compara os resultados através dos três métodos utilizados para a contagem bacteriana, a pesquisa de coliformes e a determinação do pH para amostras de água mineral de 500 mL. Ao comparar os resultados de todos os métodos de contagem bacteriana, podemos visualizar a compatibilidade dos resultados. Há ausência de coliformes para todas as amostras envasadas de águas minerais, estando de acordo com a legislação e para determinação do pH, 4 amostras estão fora do limite de aceitação.

Embora não seja determinado um padrão para densidade bacteriana na legislação em vigor para águas minerais (RDC 275/2005), adotamos o padrão utilizado em água potável no Brasil (Portaria 2914/2011) como referência, o qual é de 500 UFC/mL. Com isso, foi possível verificar que três amostras (A1, A2 e A3) apresentaram valores insatisfatórios, ou seja, estão acima do limite (> 500 UFC/mL) para água potável, sendo imprópria para o consumo humano. A contagem de bactérias controlam basicamente o processo de desinfecção

e condições higiênico-sanitários das indústrias. Como as águas minerais não passam por processo de desinfecção, pois originalmente são ditas “puras” na fonte em que são captadas, pode-se determinar que houve, possivelmente, falhas nos processos de envase, condicionamento e transporte dos produtos. Somente as águas denominadas A4 e A6 apresentaram pH dentro dos limites estabelecidos nas normas vigentes. Mesmo sendo consideradas de qualidade microbiana, o pH nesse caso seria um parâmetro para reprovação do produto em análise, como no caso da amostra A5.

Tabela12- Resultados das águas minerais de recipiente de 500mL

Amostras	MÉTODOS DE ANÁLISES BACTERIANAS				pH
	CTM NMP/mL*	CFM UFC/mL*	CP UFC/mL*	Pesquisa de coliformes	
A1	>1100	>1000	5950	Ausente	5,9
A2	>1100	>1000	2000	Ausente	4,55
A3	>1100	2575	600	Ausente	4,33
A4	<3	< 10	115	Ausente	6,0
A5	<3	< 10	< 10	Ausente	5,4
A6	<3	< 10	< 10	Ausente	6,7

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(CTM): Contagem em tubos múltiplos

(CFM): Contagem em filtração em membrana

(CP): Contagem em placas

(A1 –A6): Águas minerais 500 mL;

Para as águas adicionadas de sais de 500 mL, a contagem bacteriana, para uma mesma amostra, em determinados métodos apresenta-se fora da legislação e em outro método dentro do limite aceitável. É o caso das amostras B1, B2 e B5, não havendo, portanto, compatibilidades nos resultados, possivelmente devido ao método de filtração em membrana ser mais sensível em relação aos outros métodos apresentados. A única amostra com resultado satisfatório nos três métodos de análise é a B3. Já a amostra que apresentou má qualidade microbiológica nos três métodos foi a B4 com resultados > 500 UFC/ mL. Como águas adicionadas de sais passam por determinados processo de desinfecção, pelos resultados, fica evidente possíveis falhas nesses processos. Todas as amostras foram aprovadas em relação a determinação de pH e na pesquisa de coliformes (Tabela13).

Tabela 13 -Resultados encontrados das águas adicionada de sais de recipiente de 500mL

Amostras	MÉTODOS DE ANÁLISES BACTERIANAS				pH
	CTM UFC/mL*	CFM UFC/mL*	CP UFC/mL*	Pesquisa de coliformes	
B1	32	>1000	240	Ausente	7,8
B2	18,5	5750	< 100	Ausente	6,5
B3	40,3	150	<100	Ausente	6,0
B4	>1100	4675	600	Ausente	7,3
B5	54	1320	700	Ausente	6,3

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(CTM): Contagem em tubos múltiplos

(CFM): Contagem em filtração em membrana

(CP): Contagem em placas

(B1-B5) águas adicionadas de sais 500 mL;

Como esperado, a Tabela 14 mostra que águas minerais envasadas em recipiente de 20 litros possuem maior contaminação em quantidade de Unidade Formadoras de Colônias (UFC/mL). Apenas uma amostra (C3) está dentro do limite de aceitação (< 500 UFC/ mL).

Na pesquisa de coliformes duas amostras foram reprovadas (C2 e C4). A presença de coliformes totais em água, em alguns casos, pode não ser indicativa de contaminação fecal, pois participam deste grupo bactérias cuja origem direta não é exclusivamente entérica. Esse fato decorre da capacidade de colonização ambiental destes microrganismos, em especial do solo.

A presença de coliformes totais pode estar relacionada a uma contaminação de origem externa, visto que essas bactérias não fazem parte da composição do produto (águas minerais), podendo ter ocorrido falhas no envase, no transporte, no armazenamento ou higienização dessas garrafas, pelo fato de serem retornáveis, demonstrando certa vulnerabilidade do sistema industrial frente às contaminações, o que não é desejável. Na determinação do pH, a amostra C4 é a única que está dentro do limite aceitável, que atente a faixa de 6,0 a 9,5 (Tabela14).

Tabela 14- Resultados das águas minerais de recipiente de 20 litros

Amostras	MÉTODOS DE ANÁLISES BACTERIANAS				pH
	CTM UFC/mL*	CFM UFC/mL*	CP UFC/mL*	Pesquisa de coliformes	
C1	>1100	1,02.10 ⁴	2,2.10 ⁴	Ausente	5,3
C2	>1100	1,12. 10 ⁴	1,7.10 ⁴	Presente	5,6
C3	166,5	55	< 100	Ausente	5,8
C4	>1100	2,13.10 ⁴	1750	Presente	6,5

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(CTM): Contagem em tubos múltiplos

(CFM): Contagem em filtração em membrana

(CP): Contagem em placas

C1-C4: Águas minerais 20 L;

As amostras de águas adicionadas de sais em garrações de 20 de litros apresentou alto nível de contaminação na maioria das amostras analisadas. Apenas a amostra D3 possui seu resultado abaixo de 500 UFC/mL, mas foi reprovada na pesquisa de coliformes totais. Das cinco amostras de águas adicionadas de sais de 20 litros quatro (D1, D2, D4 e D5) possuem densidade bacteriana maior que 500 UFC/mL, sendo impróprias para o consumo de acordo com Portaria 2914/2011 (BRASIL, 2011). O resultado da pesquisa de coliformes totais reprovam três amostras (D2, D3 e D4) sendo positiva para coliforme totais. Portanto, com o resultado apresentado na Tabela 15 todas as amostras analisadas de águas adicionadas de sais acondicionadas em garrações de 20 litros foram consideradas impróprias para o consumo humano. As amostras D2 e D4 foram reprovadas nesta análise tanto pelo nível de contaminação quanto pela presença de coliformes. As amostras D1 e D5 foram consideradas reprovadas apenas pelo nível de contaminação e a amostra D3 inapropriada somente pela presença de coliformes, que seria o maior problema na qualidade da água.

Tabela 15. Resultados das águas adicionadas de sais em recipiente de 20 litros

Amostras	MÉTODOS DE ANÁLISES BACTERIANAS				pH
	CTM UFC/mL*	CFM UFC/mL*	CP UFC/mL*	Pesquisa de coliformes	
D1	>1100	4,4.10 ⁴	8500	Ausente	6,3
D2	>1100	3,9.10 ⁴	2,8. 10 ⁴	Presente	6,6
D3	20	55	< 100	Presente	6,2
D4	>1100	>1000	< 1000	Presente	5,8
D5	>1100	10,3.10 ⁴	1,1510 ⁵	Ausente	6,0

*UFC.mL-1 = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

(CTM): Contagem em tubos múltiplos

(CFM): Contagem em filtração em membrana

(CP): Contagem em placas

(D1-D5): águas adicionadas de sais de 20L.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de contaminação elevada empregando o método de filtração em membrana em relação aos dois métodos de análise pode ser justificada pela sensibilidade do método, uma vez que a amostra é filtrada em membrana de poros de 0,45 µm com interferência mínima dos parâmetros de análises envolvidos, como: temperatura do meio de cultura, inoculação das diluições, detecção bacteriana e poder de retenção de partículas viáveis, durante a avaliação bacteriológica das amostras de água. Resultado bem evidenciado para as amostras de água adicionada de sais em garrafas de 500 mL (Tabela 13). Nas Tabelas 12, 14 e 15 apresentam resultados das amostras das águas das garrafinhas de 500 mL (mineral) e garrafões de 20 litros (mineral e adicionadas de sais) coerentes frente aos três métodos de análise.

A Tabela 16 apresenta as amostras que foram consideradas reprovadas em algum método de análise, sendo impróprias para o consumo. Cerca de 85 % das amostras analisadas apresentaram alguma irregularidade em relação a legislação de água potável. Tal resultado, certamente serve de alerta para os órgãos de vigilância sanitária, no que diz respeito a um maior controle das indústrias produtoras de águas envasadas.

Tabela 16- Resultado geral das amostras analisadas.

Legislação	Amostras
(Portaria nº 2914)	n (%)
Impróprias para o consumo	17(85%)
Próprias para o consumo	3(15%)
Total	20

A água potável, como as minerais e adicionadas de sais, são produtos que não têm como requerimento serem estéreis, devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana e avaliados quanto a pesquisa de patógenos específicos.

Além dos coliformes, outros microrganismos são enquadrados como característica da qualidade da água, Com o intuito de confirmar a confiabilidade e qualidade da água, as bactérias do grupo coliformes são comumente utilizadas em testes e medições microbiológicas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados foi possível verificar que das 20 amostras de das águas envasadas (minerais e adicionadas de sais), 80 % apresentaram resultados fora da especificação quanto a contaminação microbiana.

Em 70 % das amostras foi encontrada contagem de microrganismos em valores superiores aos recomendados pela legislação vigente. Identificação de coliformes totais em 25% das amostras e 60 % apresentam pH dentro dos limites de aceitação especificado. Portanto, somente 20 % das 20 amostras de águas analisadas atenderam aos requisitos mínimos estabelecidos pelas normas vigentes, específicas para águas minerais e adicionadas de sais.

A ocorrência de amostras positivas para contaminação de bactérias heterotróficas e, somada aos resultados positivos para coliformes totais, evidencia falhas no processo de higienização e sanitização dos equipamentos de produção e dos galões, uma vez que esses organismos apresentam grande capacidade de formação de biofilmes. Mesmo que a maioria das bactérias heterotróficas da microbiota natural da água não seja considerada patogênica, é importante que sua densidade seja controlada. Portanto, é preciso avaliar a importância das bactérias heterotróficas, definindo padrão para águas minerais, pois podem alterar a qualidade do produto e oferecer riscos ao consumidor, principalmente para crianças, idosos e imunocomprometidos.

Pode-se concluir que devido ao crescimento de empresas produtoras de águas envasadas, como também os pontos de vendas em Fortaleza associado ao aumento do consumo deste produto, sua comercialização coloca em risco a saúde do consumidor. Portanto, estes resultados servem de alerta para os órgãos de Vigilância Sanitária, no que diz respeito a um maior controle das indústrias produtoras de águas envasadas e também nos pontos de venda deste produto, de modo a contribuir para a garantia de qualidade e saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

ABINAM. *Associação Brasileira das Indústrias de Águas Minerais*. Home Page. São Paulo, 2002. Extraído de <www.abinam.com.br/mercado3.asp>, acesso em 28 de abril de 2015.

ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D.J. *Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water?* Int. J. Food Microbiol. v.92, p.265-274, 2004.

ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária dos Alimentos*. Extraído de: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.htm>, Acesso em 19 nov 2015.

ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos. Resultado da 2ª Etapa/Água Mineral*. Extraído: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/etapa2/categorias/agua.htm>. Acesso em 19 nov 2015

AMARAL, Luiz Augusto et al. *Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais*. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 510-514. 04/2003.

APHA; AWWA; WEF. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, n 21, Section 9221, 2005.

BETTEGA J.M.P.R; MACHADO M.R; PRESIBELLA M.; BANISKI G; BARBOSA C.A.; *Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano*. Ciênc. agrotec. 2006, vol.30, n.5, pp. 950-954.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano em todo o território nacional. DOU, Brasília: 23 jan. 1990, Seção I, p. 1651-1654.

_____. Portaria MS nº 1.469, de 29 dez. 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, 22 fev. 2001. Seção 1.

_____. Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005a. (Série E, Legislação em Saúde).

_____. Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. Diário Oficial da União. Capital Federal: 10 mar. 1977, Seção I, Parte I, p. 2741.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Documento base de construção e revisão da Portaria nº 36/MS/1990. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. (Série E. Legislação de Saúde) 108p.

_____. Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Republicada *Diário Oficial da União*, Brasília, v.139, n.38E, p.39, 22 fev. 2001. Seção 1.

_____. Decreto federal nº 79.367 de 9 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Capital Federal: 10 mar. 1977, Seção I, Parte I, p. 2741.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 275, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. *Diário Oficial da União* da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1

_____. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

_____. Decreto-Lei n. 7.841 de 8 de agosto de 1945. Código de águas minerais *Diário Oficial da União*, 20 ago 1945. p. 194.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº173, de 13 de setembro de 2006. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural e a Lista de Verificação das Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural. *Diário Oficial da União*, da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 de set. 2006.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÁGUAS ENVASADAS E GELO". *Diário Oficial da União* da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de set. 2005.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Moléculas importantes para a compreensão da célula e do seu funcionamento. In: *A célula*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 2, p. 7-28.

CARDOSO, C.C., VEIGA, S. M. O. M., NASCIMENTO L. C., FIORINI J. E., AMARAL L. A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Ciência. Tecnol. Aliment.*, Campinas 23(1): 59-61, jan-abr, 2003.

CASTRO, L. R. S.; CARVALHO, J. S.; VALE VLC. Avaliação microbiológica de diferentes marca de água mineral. *Rev. Baiana de Saúde Pública*, Salvador, v.34, p.4, p.835-844,2010.

CEBALLOS, B.S.O.; PELLIZARI, V.H.; KONIG, A.; CATÃO, R.M.R. (1999). *Novas Metodologias em Microbiologia Ambiental*. Notas de Aulas do Curso “Novas Metodologias em Microbiologia Ambiental”. Campina Grande – PB, AESA/DEC/CCT/UFPB. 34p

DNPM. *Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário Mineral; 2013 – Água Mineral*. Extraído de <http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=3165>, acesso em 28 de abril de 2015.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª Edição, São Paulo, Atheneo, 2010.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. *Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição o processo de atualização da legislação brasileira*. Eng. Sanit. Ambient. 2009, vol.14, n.1, pp. 69-78.

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

FREITAS, M. B. FREITAS, C. M. *A vigilância da qualidade da água para consumo humano: desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde*. Ciênc. saúde coletiva. 2005, vol.10, n.4, pp. 993-1004.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. *Manual prático de análise de água*, Brasília, 2004.

GRABOW W. *Waterborne diseases: update on water quality assessment and control*. Water S.A. South Africa, 1996; v. 22, p.193-202. ISSN 0378-4738

IWERSEN, A. T.; YAMANAKA, E.H.U.; LUZ, L. F. L. J.; MONTEIRO, C.L.B.; COGO, L. L.; BEUX M. R. *Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas- dinâmica populacional de Pseudomonas aeruginosa*. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 27, n. 2, 2009.

ISSAC-MARQUEZ AP, LEZAMA-DAVILA CM, KU-PECH RP, TAMAY-SEGOVIA P. *Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano en Campeche*. Salud Pública MEx 1994; v.36, p.655-61

LECLERC, H.; MOREAU, A. *Microbiological safety of natural mineral water*. FEMS Microbiology Reviews, Faculté de Médecine de Lille et Institut Pasteur de Lille, Lille, França. v. 26, n. 2, p. 207-222, 2002

MARQUEZI, M. C.; GALLO, C. R. e DIAS, C. T. S. *Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e E. coli em amostras de água*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2010, vol.69, n.3, p. 291-296.

MATTOS, M. L. T.; SILVA, M. *Controle da Qualidade Microbiológica das Águas de Consumo na Micro bacia Hidrográfica Arroio Passo do Pilão*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Rio Grande do Sul, 2002.

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. *Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006*. Arquivos do Instituto Biológico, v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.

PELCZAR MJ, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ª ed. São Paulo: Makron; 1996.

QUEIROZ, J. T. M. *O campo das águas envasadas: determinantes, políticas pública, consequências socioambientais, qualidade das águas e percepção*. 2011. 80 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). - Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais

REIS¹, L. R., PAULA D. B., ROSE F. C. "Água envasada: qualidade microbiológica e percepção dos consumidores no município de Viçosa (MG)." Cad. Saúde Colet, Rio de Janeiro, 22 (3): 224-32 (2014).

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

SILVA MD, MATOS MLT. *Microbiological quality of water for human consumption in the hydrographical microbasin of Arroio Passo do Pilão*. Resumos do 21º Congresso Brasileiro de microbiologia; 2001; Foz do Iguaçu, Paraná. Foz do Iguaçu; 2001. p. 42.

TERRA CONSULTORIA AMBIENTAL LTDA. *Meio Ambiente - ÁGUA MINERAL X ÁGUA ADICIONADA DE SAIS*. Disponível em:
<<http://www.terraconsult.com.br/aguamineral.html>> Data de acesso: em 15 de dez. 2015.

THOMET, A; GALLMANN, P. *Neue Milchprodukte dank Membrantrenntechnik (Hrsg): FAM in: FAM- info*, Abril 2003, Nr. 453.

TORTORA, G. J.; BERDELL R.F.; CASE C.L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2005. 920p.

VILHENA, J.C.E; DUARTE, A.S; SILVEIRA JÚNIOR, A.M. *Monitoramento de coliformes totais e de E. coli em águas provenientes de poços e do sistema de abastecimento público utilizadas para consumo humano no bairro de Santa Rita, Macapá – AP, Brasil*. CNPq. Reunião Anual da SBPC, 2009. Extraído de:
<http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6214.htm> Acesso em 19 nov. de 2015

WHO (World Health Organization). *Guidelines for drinking-water quality*, vol. 2. WHO, Genova. 1996.

ANEXOS

Anexo A

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. 275, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c do Art. 111, inciso I, alínea "b" § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 29, de agosto de 2005,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;

considerando a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, com base no enfoque da avaliação de risco e da prevenção do dano à saúde da população;

considerando que os regulamentos técnicos da ANVISA de padrões de identidade e qualidade de alimentos devem priorizar os parâmetros sanitários;

considerando que o foco da ação de vigilância sanitária é a inspeção do processo de produção visando a qualidade do produto final;

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL

1. ALCANCE

Fixar as características microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural.]

2. DEFINIÇÃO

2.1. Amostra indicativa: é a amostra composta por um número de unidades amostrais inferior ao estabelecido para a amostra representativa.

2.2. Amostra representativa: é a amostra constituída por um número de unidades amostrais estabelecido na Tabela 1.

2.3. Unidade amostral: porção ou embalagem(ns) individual(is) tomadas para ensaio, de forma aleatória de uma partida do produto.

3. PROCEDIMENTOS E INSTRUÇÕES GERAIS

A Água Mineral Natural e a Água Natural envasadas não devem apresentar risco à saúde do consumidor e devem estar em conformidade com as características microbiológicas descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural

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

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 qualidade satisfatória de qualidade marginal do produto. Valores abaixo do limite "m" são desejáveis.

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

3.1. Amostra indicativa

3.1.1. A amostra é condenada (rejeitada) quando for constatada a presença de Escherichia coli ou coliformes (fecais) termotolerantes ou quando o número de coliformes totais e ou enterococos e ou Pseudomonas aeruginosa e ou clostrídios sulfito redutores ou Clostridium perfringens for maior que o limite estabelecido para amostra indicativa.

3.1.2. Deve ser efetuada a análise da amostra representativa quando na amostra indicativa for detectada a presença de Escherichia coli ou coliformes (fecais) termotolerantes e ou o número de

coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* for maior que o limite estabelecido para amostra indicativa.

3.2. Amostra representativa

3.2.1. Sempre que se tratar de avaliação de partida deve ser coletada a amostra representativa, em cumprimento aos dispositivos legais vigentes. Excetuam-se as atividades que requeiram amostragem para investigação (relacionada com suspeita ou com identificação de problemas na partida, para confirmação ou verificação da sua natureza e extensão ou ainda para informações sobre as possíveis fontes de problema) ou que requeiram inspeções rígidas (planos estatísticos com maior poder de discriminação de falhas).

3.2.2. A análise das unidades da amostra representativa deve ser feita usando-se o mesmo volume recomendado para a amostra indicativa. Na caracterização microbiológica do produto ou da partida examinada devem ser considerados os resultados da amostra representativa.

3.2.3. A partida é aprovada quando atender os seguintes requisitos:

- a) ausência de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes em todas as unidades da amostra representativa;
- b) nenhuma unidade da amostra representativa apresentar contagem de coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa*, clostrídios sulfito redutores ou *Clostridium perfringens* maior que "M"; e
- c) no máximo uma unidade da amostra representativa apresentar contagem de coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* entre os valores "m" e "M".

3.2.4. A partida será rejeitada, quando:

- a) for constatada a presença de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes em uma das unidades da amostra representativa; ou
- b) apresentar contagem de coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* em uma das unidades da amostra representativa, maior que "M"; ou

c) apresentar contagem de coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* em mais de uma unidade da amostra representativa, maior que "m"