



Fundação Educacional do Município de Assis  
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis  
Campus "José Santilli Sobrinho"

**ADRIANA LUIZA FERREIRA**

**QUALIDADE DE DIFERENTES MARCAS DE ÁGUAS MINERAIS  
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE ASSIS – SÃO PAULO.**

Assis  
2014

ADRIANA LUIZA FERREIRA

QUALIDADE DE DIFERENTES MARCAS DE ÁGUAS MINERAIS  
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE ASSIS – SÃO PAULO.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Química do Instituto Municipal de Ensino Superior do Município de Assis – IMESA e Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, com requisito parcial à obtenção do Certificado de Conclusão.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Área de Concentração: Química

Assis  
2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

FERREIRA, Adriana Luiza

Qualidade de diferentes marcas de águas minerais comercializadas na cidade de Assis – São Paulo / Adriana Luiza Ferreira. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2014.

65p.

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

1. Água Mineral. 2. Qualidade. 3. Micro-organismos.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

QUALIDADE DE DIFERENTES MARCAS DE ÁGUAS MINERAIS  
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE ASSIS – SÃO PAULO.

ADRIANA LUIZA FERREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Municipal de  
Ensino Superior de Assis, como  
requisito do Curso de Graduação em  
Química Industrial, analisado pela  
seguinte comissão examinadora:

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Analisador: Prof. Dr. Idécio Nogueira da Silva

Assis  
2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus que está sempre ao meu lado me protegendo e abençoando, a minha família, em especial a minha mãe pelo apoio e incentivo em tornar possíveis meus ideais e a todos que contribuíram para a minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre ao meu lado me abençoando para concluir mais esta etapa em minha vida.

A minha orientadora e professora Elaine Amorim Soares Menegon, pela orientação, ajuda e pelo constante dedicação durante todo o decorrer trabalho, desde a parte prática à escrita, ensinamentos esses, que contribuíram para o meu aprendizado.

A banca examinadora, Idélcio Nogueira da Silva, pelas correções, contribuindo para o enriquecimento do trabalho.

Ao Centro de Pesquisa em Ciências – CEPECI, por ceder espaço para que as análises fossem realizadas. Aos técnicos e estagiários, pela colaboração, em especial a amiga, Paula Consoli.

A minha mãe, Neusa L. C. Ferreira, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, pelo incentivo na realização profissional e pessoal. Agradeço por ser uma mulher sábia, pelos constantes ensinamentos.

A minha irmã e amiga, Ana Paula Ferreira da Silva, pelo constante apoio e auxílio durante todo o decorrer desse trabalho, bem como agradeço as correções que contribuíram muito para aperfeiçoamento desse.

Ao meu cunhado, Eduardo Vinicius da Silva, pelas dicas e ajuda durante todo o percurso dessa pesquisa.

Ao meu sobrinho, Guilherme, pelo simples sorriso que torna minha vida mais feliz.

Ao meu namorado Rodolfo José Tófoli, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando, incentivando e apoiando em todos os momentos, contribuindo para que a caminhada fosse mais fácil.

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução desse trabalho: familiares, coordenadora, amigos e professores.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, da sua boca vem o conhecimento e o entendimento”.

Provérbios (2:6)

## RESUMO

Nos últimos anos, o Brasil vem apresentando uma crescente ampliação no consumo de água mineral engarrafada e a tendência é aumentar, devido às condições não satisfatórias da qualidade da água de abastecimento público. A água mineral deve apresentar boa qualidade para não oferecer risco à saúde humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de água mineral, não carbonatada, em garrafas individuais de 330 mL a 600 mL, comercializadas na cidade de Assis – SP, quanto aos padrões estabelecidos pela Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, para água mineral. Foram avaliados 20 lotes de 4 marcas diferentes, analisados no laboratório Centro de Pesquisa em Ciências – CEPECI, no período de 4 meses. As análises foram realizadas a partir do preparo de meios de cultura específicos, utilizando os métodos de Sanchez (1999). Os parâmetros analisados foram: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Pseudomonas aeruginosa*, Contagem padrão e *Escherichia coli*. Os resultados das análises mostraram que 100% das amostras apresentaram ausência para coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* e 55% apresentaram resultados insatisfatórios para *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação a Contagem padrão, todas as amostras apresentaram presença para bactérias mesófilas viáveis, que apesar dessa análise não apresentar parâmetro para água mineral é considerada de extrema importância para avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial, já que esses micro-organismos podem ser patogênicos e causar doenças ao consumidor.

**Palavras chave:** Micro-organismos; Contaminação; Água Mineral.

## ABSTRACT

In the last years, Brazil has had a growing increase in the consumption of bottled water and the trend is increasing due to unsatisfactory conditions of the quality of the public water supply. Mineral water must have good quality not to offer human health risk. The objective of this study was evaluate the microbiological quality of different brands water, non-carbonated, in individual bottles of 330 mL to 600 mL, marketed in the town of Assis - SP, as the standards established by Resolution RDC No. 275 of September 22, 2005, for mineral water. 20 batches were evaluated of 4 different brands, analyzed in the laboratory Sciences Research Center - CEPECI, under 4 months. The analyzes were carried out using the specific means of culture preparation, using the methods Sanchez (1999). The parameters analyzed were: total coliforms, fecal coliforms, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* count pattern. The results of analysis showed that 100% of the samples presented absence of total coliforms, fecal coliforms and *E. coli* and 55% had unsatisfactory results for *Pseudomonas aeruginosa*. In relation to standard counting, all samples showed presence for viable mesophilic bacteria, that although this analysis does not provide a parameter for mineral water is considered extremely important to assess the sanitary conditions of the industrial system, as these microorganisms can be pathogenic and cause diseases in consumers.

**Keywords:** Microorganisms; contamination; Mineral Water.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação da água mineral .....	17
Figura 2 - Processo de produção de água mineral.....	23
Figura 3 - Exemplo de nascente de água mineral.....	23
Figura 4 - Armazenamento de água mineral .....	24
Figura 5 - Transporte utilizado para locomoção da água mineral até a indústria de envase.....	24
Figura 6 - Instalações, equipamentos, processamento da água mineral.....	25
Figura 7 - Bactéria coliformes totais .....	28
Figura 8 - Bactéria <i>E. coli</i> .....	30
Figura 9 - Imagem microscópica: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas .....	31
Figura 10 - Bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
Figura 11 - Bactérias aeróbias mesófilas .....	33
Figura 12 - Sequência de análise de coliformes termotolerantes e totais .....	39
Figura 13 - Sequência de análise de <i>E. coli</i> .....	40
Figura 14 - Sequência de análise de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	42
Figura 15 - Sequência de análise de bactérias aeróbias mesófilas.....	43
Figura 16 - Tubo positivo (fluorescente) e tubo negativo (incolor) para análise de asparagina exposto a luz negra .....	47
Figura 17 - tubo negativo (esquerda) e tubo positivo (direita), coloração púrpura para análise de acetamida.....	48
Figura 18 - teste de confirmação em Ágar Leite para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
Figura 19 - Esquerda placas de Petri em duplicata na diluição direta e imagem da direita diluição a $10^{-2}$ .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da água mineral quanto a sua composição química .....	19
Tabela 2 - Classificação quanto à origem da fonte em relação à temperatura.....	20
Tabela 3 - Estatística de produção, importação, exportação e consumo no Brasil ...	22
Tabela 4 - Parâmetros microbiológicos para água mineral .....	26
Tabela 5 - Resultados obtidos para as análises de água referentes à marca A.....	44
Tabela 6 - Resultados obtidos para as análises de água referentes à marca B.....	45
Tabela 7 - Resultados obtidos para as análises de água referentes à marca C .....	45
Tabela 8 - Resultados obtidos para as análises de água referentes à marca D .....	46
Tabela 9 - Porcentagens de presença de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em relação lotes e marcas analisadas.....	50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 ÁGUA MINERAL</b> .....	<b>16</b>
2.1 DEFINIÇÃO .....	16
2.2 ASPECTOS HISTÓRICOS DA ÁGUA MINERAL .....	16
2.3 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS ÁGUAS MINERAIS .....	18
2.4 INDUSTRILIZAÇÃO, PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E CONSUMO DE ÁGUA MINERAL.....	21
2.5 LEGISLAÇÃO PARA ÁGUAS MINERAIS .....	25
<b>3 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DA ÁGUA MINERAL</b> ...	<b>28</b>
3.1 COLIFORMES TOTAIS .....	28
3.2 COLIFORMES TERMOTOLERANTES .....	29
3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	29
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
3.5 BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS .....	32
<b>4 ENSINO MÉDIO</b> .....	<b>34</b>
4.1 SUGESTÃO DE PLANO DE AULA .....	35
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
5.1 MATERIAL.....	36
5.1.1 Água Mineral .....	36
5.1.2 Equipamentos.....	36
5.1.3 Meios de cultura .....	37
5.1.3.1 Meios desidratados .....	37

5.1.3.2 Meios formulados .....	37
5.2 MÉTODOS.....	38
5.2.1 Coliformes termotolerantes e totais .....	39
5.2.2 <i>Escherichia. coli</i> .....	39
5.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
5.2.4 Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (PCA) .....	42
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>44</b>
6.1 ANÁLISES DE COLIFORMES TOTAIS .....	46
6.2 ANÁLISES DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
6.3 ANÁLISES DE CONTAGEM PADRÃO .....	52
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>61</b>
ANEXO I.....	62
ANEXO II .....	65

# 1 INTRODUÇÃO

A maior parte da água presente no planeta Terra é salgada, apenas uma pequena quantidade é água doce. Essa menor parte vem sendo comprometida a cada ano, devido à contaminação por produtos químicos e pela presença de micro-organismos, tais como: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Aeróbios Mesófilos Viáveis (Contagem Padrão) entre outros (SANCHEZ, 1999).

Essa contaminação com micro-organismos ocasiona diversos tipos de doenças, que muitas vezes, pode levar a morte. Sendo assim, a água que é de extrema importância à sobrevivência do ser humano, pode ser considerada como uma fonte de riscos à saúde (MARQUEZI, 2010). As doenças causadas pela ingestão de água têm maior frequência nas épocas de verão, pois o seu consumo aumenta e o clima quente propicia a rápida proliferação de bactérias (DIAS, 2008).

A causa está associada ao desenvolvimento industrial e o rápido crescimento demográfico (SANCHEZ, 1999). Segundo Kulaif (2012), a maioria das fontes de águas minerais encontra-se nas proximidades dos centros urbanos, distritos industriais e lixões. Tal fato explica a proliferação de micro-organismos.

Segundo a consultoria Beverage Marketing Corporation, em 2011, o mercado mundial de águas minerais engarrafadas foi de 232 bilhões de litros, sendo 6,2 bilhões consumidos pelo Brasil. Este dado é relevante, pois demonstra um aumento, visto que no ano de 2010 a produção foi de 9% em relação a esse número. Os países em destaque nesse consumo são: Estados Unidos, México, China e Tailândia (KULAIF, 2012).

Nos últimos anos, o Brasil vem apresentando uma crescente ampliação no consumo de água mineral engarrafada e a tendência é aumentar, devido às condições não-satisfatórias da qualidade da água de abastecimento público (KULAIF, 2012).

A água mineral deve apresentar uma boa qualidade para o consumo, não oferecendo riscos à saúde do ser humano. Para tanto, são necessários cuidados,

desde a sua captação, armazenamento, transporte até o seu manuseio, para não alterar sua composição original (BRASIL, 1999).

Vários minerais estão contidos nas águas, com potenciais efeitos à saúde, como o cálcio, que é responsável pela construção e manutenção dos ossos; o sódio, que regula a quantidade de líquido extracelular, o volume de plasma sanguíneo, auxilia na condução de impulsos nervosos e no controle da contração muscular. No entanto, o aumento ou escassez desses minerais podem também trazer riscos à saúde humana (FERRER *et al.*, 2008).

Assim, o presente trabalho tem por finalidade avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de água mineral, não carbonatada, em garrafas individuais de 330 mL a 600 mL, comercializadas na cidade de Assis – SP, quanto aos padrões estabelecidos pela Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, para água para consumo humano.

## 2 ÁGUA MINERAL

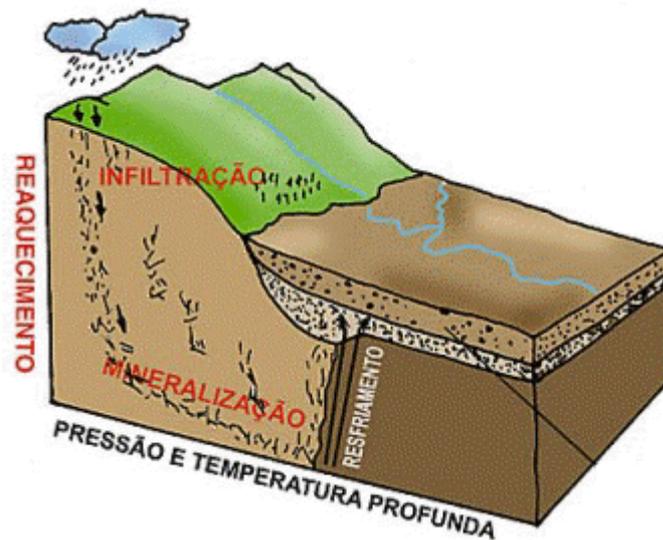
### 2.1 DEFINIÇÃO

As águas minerais são as de origem subterrânea, obtidas diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas, caracterizadas pela composição de sais minerais (composição iônica), pela temperatura, pelos gases dissolvidos, pela presença de oligoelementos entre outros, atendendo aos padrões de potabilidade para consumo humano quanto aos parâmetros microbiológicos, químicos e físico-químicos, sem serem submetidas a tratamentos (DNPM, 2002).

Segundo, o Código Brasileiro de Águas Minerais (Decreto-Lei nº 7.841 de 8 de Agosto de 1945), as águas minerais são as provenientes de fontes naturais ou artificialmente captadas, possuem composição físico-química definida e constante com propriedades distintas das águas comuns, que conferem uma ação medicamentosa (DNPM, 2002).

### 2.2 ASPECTOS HISTÓRICOS DA ÁGUA MINERAL

A teoria meteórica define que a origem da água mineral é a água da chuva que percolou até uma profundidade muito grande. Segundo essa teoria (Figura 1), a água da chuva ao percolar, depois de já ter absorvido algumas substâncias presentes no próprio ar, dissolve elementos presentes nas rochas por onde vai se infiltrando, como por exemplo, o carbonato e o sulfato de cálcio que se diluem na água, enriquecendo-a, o que vai dando a ela suas características próprias e fazendo com que adquira propriedades medicinais valiosas. Ao chegar à zona de saturação, ela torna a subir, através de fendas ou falhas geológicas, até a superfície, isso ocorre devido à pressão e à presença de gases em alguns locais (FARIA, 2008).



**Figura 1 - Formação da água mineral (In: ACQUARELLA, 2011)**

No Brasil, em 1848, foi criado pelo Imperador Dom Pedro II, a primeira estação hidromineral, em Caxias do Sul do Rio Cubatão, em Santa Catarina. E, em 1930, foi criado o Departamento Nacional de Produção Mineral - DNPM. A partir dessa época, começou a consolidar-se a indústria das águas minerais e empresas de engarrafamento (GUIMALHÃES, 2008).

A água mineral vem sendo, nos últimos anos, um dos bens minerais que mais tem sido objeto de aproveitamento pela sociedade, para a indústria de envase, fabricação de bebidas e similares. O hábito de adquirir água mineral tem aumentado pela população já que a água tratada, oferecida pelos serviços de tratamento e distribuição de água controlada pelo poder público, em muitos casos, não apresenta a confiança necessária para seu consumo. Devido a isso, a água como um bem mineral tem adquirido importância econômica e social crescente, por ser considerada pura e de melhor qualidade do que a água distribuída pela rede pública (água tratada) (CAETANO, 2009).

Um exemplo dessa mudança, preferência da população pela água mineral, é o aumento no consumo para 70%, no mês de maio de 2009, em Porto Alegre, devido à desconfiança na qualidade da água de abastecimento distribuída na capital gaúcha, durante o período de estiagem que provocou floração de algas em alguns

pontos do rio Guaíba, cujas águas são utilizadas para abastecimento da cidade (CAETANO, 2009).

### 2.3 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS ÁGUAS MINERAIS

Cada água mineral tem suas propriedades medicinais de acordo com os sais que nela predominam, sendo que suas classificações devem ser divulgadas em suas fontes, como também nos rótulos de suas embalagens (ABINAM, 2008).

A água mineral apresenta características permanentes, relacionada à sua composição química e características inerentes às fontes, no que diz respeito aos gases presentes e temperatura da água na fonte, dando a cada tipo propriedades específicas (ABINAM, 2008).

Na tabela 1 apresenta a classificação da água mineral quanto a sua composição química.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERIZAÇÃO
OLIGOMINERAL	quando apresentarem apenas uma ação medicamentosa.
RADÍFERAS	quando tiverem radioatividade permanente.
ALCALINA BICARBONATADA	bicarbonato de sódio = ou > 200mg/L.
ALCALINO TERROSAS	carbonato de cálcio = ou > 120mg/L.
• ALCALINO TERROSAS CÁLCICAS	cálcio = ou > 48mg/L sob a forma de bicarbonato de cálcio.
• ALCALINO TERROSAS MAGNESIANAS	magnésio = ou > 30mg/L sob a forma de bicarbonato de magnésio.
SULFATADAS	$\text{SO}_4^{2-}$ = ou > 100 mg/L.
SULFUROSAS	sulfeto = ou > 1mg/L.

NITRATADAS	$\text{NO}_3^-$ = ou > 100 mg/L.
CLORETADAS	cloreto de sódio = ou > 500mg/L.
FERRUGINOSAS	ferro = ou > 5mg/L.
RADIOATIVAS	quando tiverem radônio em dissolução.
• FRACAMENTE RADIOATIVAS	teor de radônio mínimo entre 5 e 10 unidades Mache por litro , a 200°C e 760 mm de Hg de pressão.
• RADIOATIVAS	teor de radônio entre 10 e 50 unidades Mache por litro , a 200°C e 760 mm de Hg de pressão.
• FORTEMENTE RADIOATIVAS	teor de radônio acima de 50 unidades Mache por litro , a 200°C e 760 mm de Hg de pressão.
TORIATIVAS	teor em torônio em dissolução equivalente em unidades eletrostáticas, a 2 unidades Mache por litro, no mínimo.
CARBOGASOSAS	gás carbônico livre dissolvido = ou > 200mg/L.
ELEMENTO PREDOMINANTE	(> 0,01mg/L): Iodadas; Arseniadas; Litinadas, etc.

**Tabela 1 - Classificação da água mineral quanto a sua composição química (In: CAETANO, 2009)**

A tabela 2 mostra a classificação quanto à origem da fonte em relação à temperatura.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERIZAÇÃO
Fontes frias	temperatura inferior a 25°C
Fontes hipotermais	temperatura entre 25 e 33°C
Fontes mesotermais	temperatura entre 33 e 36°C
Fontes Isotermais	temperatura entre 36 e 38°C
Fontes hipertermais	temperatura acima de 38°C

**Tabela 2 - Classificação quanto à origem da fonte em relação à temperatura (In: CAETANO, 2009)**

As águas minerais brasileiras classificadas como fluoretadas correspondem a 48,2% do total de água mineral captada e envasada; as hipotermais e as hipertermais, na fonte, a 16,2%; as radioativas, na fonte, a 14,6%; e as potáveis de mesa, a 10,2%. A totalidade representa 95,2% do total de água mineral captada e envasada no Brasil (CAETANO, 2009).

Cada água mineral tem sua exclusiva composição físico-química, sendo que não existe uma água igual à outra, mesmo que seja da mesma marca, se a fonte não for a mesma, ela jamais será igual. Isso acontece devido à quantidade e a composição de sais minerais, processados ao longo de centenas ou milhares de anos, decorrente de diversificados tipos de rochas por onde são filtradas, assim como a influência de sua composição a radioatividade e a temperatura de cada fonte (BRASIL, 2011).

As águas minerais são consideradas benéficas à saúde, pois além dos usos termiais e terapêuticos, agregam-se os valores da origem natural, como potabilidade, a pureza e os benefícios nutricionais. Apresentam também natureza purificadora e hidratante, qualidades essas cada vez mais valorizadas numa sociedade em busca de alimentação natural. É importante salientar que a água mineral, desde o momento de sua captação, até o engarrafamento, deve manter os elementos da sua composição original (GUIMALHÃES, 2008).

## 2.4 INDUSTRIALIZAÇÃO, PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E CONSUMO DE ÁGUA MINERAL

A indústria de água mineral envasada é uma atividade desenvolvida mundialmente por diversas empresas dos setores de alimentos, dentre elas, a Nestlé e a Danone, que participam, respectivamente com 18% e 15% do mercado mundial.

A indústria brasileira de água mineral é representada por seis grandes grupos empresariais que são: Grupo Edson Queiroz, responsável pelo envase das águas Indaiá e Minalba; Schincariol, responsável pelo envase da água Schin; Mocellin, responsável pelo envase da água Ouro Fino; SPAL (Coca-Cola - FEMSA), responsável pelo envase da água Crystal; FLAMIN, responsável pelo envase da água Bioleve; e Nestlé Waters Brasil, responsável pelo envase das águas São Lourenço, Petrópolis e Pureza Vital (CAETANO, 2009).

Essas empresas responderam, em 2008, por 23,5% de toda a produção brasileira de água mineral. Os restantes 76,5 % estão pulverizados em centenas de médias, pequenas e microempresas. O Brasil alcançou 4,4 bilhões de litros envasados nesse período, com 939 concessões de lavra e 436 indústrias instaladas. Sendo a região sudeste, com 1,5 bilhões de litros e o estado de São Paulo, com 785,4 milhões de litros, representando os maiores produtores e consumidores do setor (CAETANO, 2009).

Já em 2011, segundo dados da consultoria Beverage Marketing Corporation, o mercado mundial de águas engarrafadas foi de 232 bilhões de litros. Nesse ano, o Brasil importou da França (47%), Itália (46%), Noruega (6%) e Estados Unidos da América (1%); totalizando 1.994.146 litros de água mineral. E exportou 289.368 litros de água mineral, sendo os principais países de destino: Guiana, com 68% do total, Bolívia e Japão, com 14% cada, Paraguai (3%); Estados Unidos da América (0,6%) e Uruguai (0,4%) (KULAIF, 2012).

A tabela 3 mostra os dados de produção no Brasil de 2009 a 2011.

Discriminação		Unidade	2009 (r)	2010 (r)	2011 (p)
Produção	Engarrafada	10 <sup>3</sup> l	5.323.779	5.887.902	6.162.249
	Ingestão na fonte	10 <sup>3</sup> l	85	98	0
	Composição de Produtos Industrializados (CPI)	10 <sup>3</sup> l	2.256.496	2.639.159	2.801.962
Importação	Engarrafada	10 <sup>3</sup> l	762	1.215	1.994
		US\$-FOB	708.504	963.000	2.472.818
Exportação	Engarrafada	10 <sup>3</sup> l	1.137	219	289
		US\$-FOB	962.798	78.474	109.754
Consumo Aparente <sup>(1)</sup>	Todos os tipos	10 <sup>3</sup> l	7.579.985	8.484.876	8.965.916

**Tabela 3 - Estatística de produção, importação, exportação e consumo no Brasil (in: KULAIF, 2012)**

Segundo dados do Departamento Nacional de produção Mineral – DNPM, a região Sudeste lidera a produção de água mineral, com 55% do total da água mineral engarrafada. São Paulo é o maior estado produtor com cerca de 1, 694 bilhão de litros, correspondendo a 41% da produção do Brasil, seguido de Minas Gerais com produção de 368 milhões de litros e Rio de Janeiro com 223 milhões de litros. A região Nordeste continua em segundo lugar com quase 860 milhões de litros, sendo os estados em destaque a Bahia e Pernambuco (GUIMALHÃES, 2008).

O Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial de produtores, segundo dados da Associação Internacional de Águas Engarrafadas. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Água Mineral - ABINAM, o Brasil tem consumo per capita ainda considerado baixo (65 litros por ano), se comparado aos argentinos, que é o dobro. Apesar de possui a maior reserva de água doce potável do planeta, fato que lhe confere um importante posicionamento geoestratégico mundial no mercado de água mineral, em termos de produção e consumo, o país ainda tem que avançar posições para obter liderança (SEBRAE, 2013).

A figura 2 apresenta o processo de produção de água mineral, desde a origem da fonte até o envasamento.

# Água Mineral

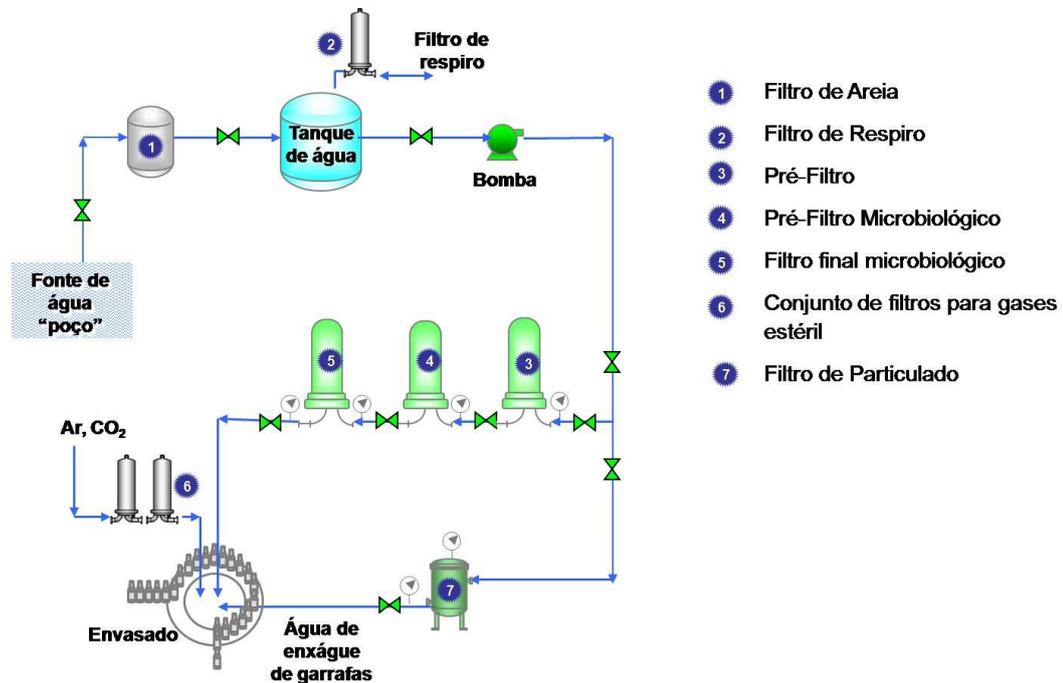


Figura 2 - Processo de produção de água mineral (In: PURIFICATION, 2010)

Para que a água envasada não cause risco à saúde, não basta apenas que se tenha uma fonte de boa qualidade, como mostrada na figura 3, mas deve-se também considerar as condições sanitárias relativas ao processo de industrialização, como: instalações, equipamentos, processamento (Figura 6), armazenamento (Figura 4), estocagem, expedição, transporte (Figura 5). Sendo importante que exista um sistema de controle em todas essas etapas para que não ocorra alteração na qualidade final da água (SANCHEZ, 1999).



Figura 3 - Exemplo de nascente de água mineral (In: N3PO, 2014)



**Figura 4 - Armazenamento de água mineral (In: SUBSOLO, 2014)**



**Figura 5 - Transporte utilizado para locomoção da água mineral até a indústria de envase (In: MAIA, 2009)**



**Figura 6 - Instalações, equipamentos, processamento da água mineral (In: MARATUÁ, 2003)**

Controles sistemáticos de avaliação da qualidade das águas minerais constituem atividades de fundamental importância, dadas as possíveis implicações da ocorrência de uma contaminação (SANCHEZ, 1999). Portanto, é necessário ser realizado periodicamente análises microbiológicas na fonte e produto final envasado, tanto pelo produtor como pelo órgão fiscalizador.

## 2.5 LEGISLAÇÃO PARA ÁGUAS MINERAIS

A legislação para parâmetros microbiológicos de águas minerais segue os termos da Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005).

Desde a fonte até na comercialização, a água mineral não deve apresentar risco à saúde do consumidor (ausência de micro-organismos patogênicos), para tanto deve esta em conformidade com as características microbiológicas descritas na tabela 4.

MICRO-ORGANISMO LIMITES	AMOSTRA INDICATIVA	AMOSTRA REPRESENTATIVA			
		N	C	M	M
<i>E. coli</i> ou coliforme termotolerantes, em 100 mL	Ausência	5	0	-	Ausência
Coliformes totais, em 100 mL	<1,0 UFC**; <1,1 NMP* ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
Enterococos, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP
Clostrídios sulfite redutores ou <i>C. perfringens</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP

\* NMP – Número Mais Provável

\*\*UFC – Unidade Formadora de Colônias

**Tabela 4 - Parâmetros microbiológicos para água mineral (In: ANVISA, 2005)**

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.

No processo de amostragem para análise, é necessário que as águas estejam em embalagem original, a não ser se forem coletadas diretamente da fonte ou nos pontos de amostragem instalados na linha de envasamento. Para análise microbiológica, deve ter o mínimo de amostra, não deve ser realizada se a embalagem for inadequada ou apresentar sinais de violação ou vazamento (ANVISA, 2000).

Quando a amostra for coletada na fonte, deve constar a temperatura da água na surgência e/ou captação, assim como hora e data da amostragem, além das demais informações pertinentes. Essas amostras coletadas devem ser analisadas no máximo de até 24 horas após a coleta e devem ser mantidas sob refrigeração até o momento das análises (ANVISA, 2000).

### 3 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DA ÁGUA MINERAL

#### 3.1 COLIFORMES TOTAIS

As bactérias do grupo coliformes, tais como: *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Kebsiella* são empregadas como parâmetro bacteriológico básico na definição de padrões para monitoramento da qualidade das águas minerais. Sendo assim, a ausência de coliformes indica que a água é bacteriologicamente potável para o consumo humano (SANCHEZ,1999).

Os organismos coliformes (Figura 7) são definidos como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose com produção de ácido e gás em 48 horas, a 35°C. São encontrados geralmente no intestino do homem e de animais de sangue quente, podendo também ser localizadas no solo e na vegetação (SANCHEZ,1999).

As bactérias Gram negativas possuem uma única membrana celular externa, o que dificulta o efeito dos antibióticos. Essa célula apresenta lipopolissacarídeos que avisam através de sintomas como febre alta, que há presença de bactéria Gram negativa na corrente sanguínea (SIMEÃO, 2011).



**Figura 7 - Bactéria coliformes totais (In: RODRÍGUEZ, 2013)**

## 3.2 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

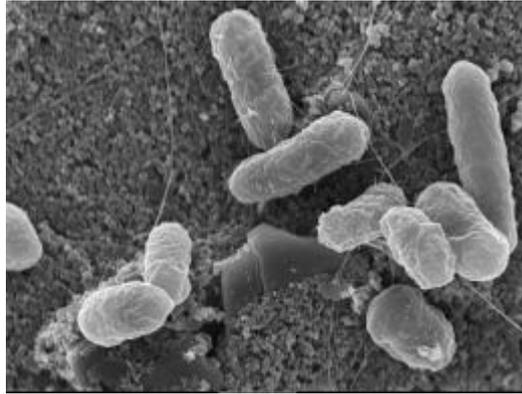
O termo “termotolerantes” refere-se à tolerância da bactéria em fermentar a lactose com produção de gás, em temperatura elevada de até 44,5°C, em 24 horas. É indicativo para a qualidade sanitária da água, sendo que essa bactéria é mais significativa que a bactéria Coliforme Total, por estarem restritas ao trato intestinal de animais de sangue quente (SANCHEZ, 1999).

A determinação da concentração de coliformes termotolerantes assume importância como parâmetro indicativo à existência de micro-organismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica (SIMEÃO, 2011).

### 3.3 *Escherichia coli*

A *E. coli* (Figura 8) é uma bactéria na forma de bastonete anaeróbia facultativa, é lactase positiva, ou seja, possui uma enzima que cataliza a hidrólise da lactose e galactose, fermentadora de açúcares que é responsável pela flatulência. Encontra-se no trato gastrintestinal de humanos e de animais endotérmicos. É considerada um indicador de qualidade de água e alimentos, através da análise de coliformes termotolerantes (SIMEÃO, 2011).

Esta bactéria geralmente habita o intestino sem causar problemas à saúde. No entanto, ao entrar em contato com a circulação sanguínea ou outras regiões do corpo, é capaz de provocar infecções, tais como: diarreia; cistite; meningite; sepse, também chamada de septicemia, que é um quadro grave que une os sintomas de uma infecção generalizada pré-existente à resposta inflamatória do organismo; peritonite, entre outras (ARAGUAIA, 2011).



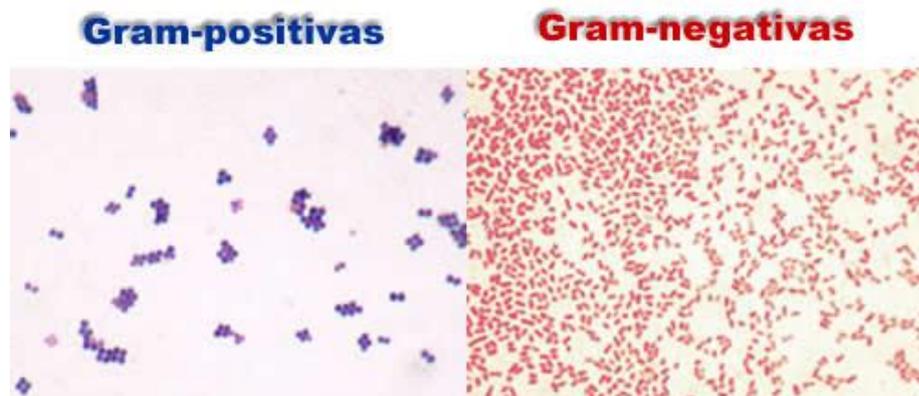
**Figura 8 - Bactéria *E. coli* (In: ALOCILJA, 2012)**

As bactérias *E. coli*, são consideradas bacilos Gram-negativos, a técnica empregada para detectar esse tipo de micro-organismo consiste na análise microscópica que é amplamente utilizada e é uma das mais importantes técnicas de coloração diferencial para bactérias, inicialmente descrita por Christian Gram, em 1884, na Dinamarca (PELCZAR *et al.*, 1996).

Neste processo, o esfregaço bacteriano é tratado com púrpura cristal violeta e solução de iodo, que serve para fixar o corante no interior da célula, já o álcool é o agente descorante que remove o corante de certas bactérias e o corante vermelho, safranina, podendo ser utilizado também lisina. As Gram-positivas retêm o corante cristal violeta e aparecem no microscópio coradas de violeta-escuro. (PELCZAR *et al.*, 1996).

Nas bactérias Gram-negativas, perdem o cristal violeta com o tratamento com álcool, e então são coradas com corante safranina, assumindo a cor vermelha, diferenciando-se das bactérias que absorveram o cristal violeta (PELCZAR *et al.*, 1996).

A figura 9 mostra a imagem microscópica da diferença de uma bactéria Gram-positiva de uma Gram-negativa.



**Figura 9 - Imagem microscópica: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (In: MARTINEZ, 2010)**

A diferença entre os dois tipos de células relaciona-se com a estrutura da parede celular das bactérias. A parede celular de bactérias ditas Gram-positivas é formada por uma camada espessa de peptidoglicano (peptídeo de ácido n-acetil murâmico), durante o processo de descoloração com álcool etílico, retém o corante, permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (roxo). Enquanto que a parede celular de bactérias Gram-negativas é formada por uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeo e proteína, perdem o complexo iodo-pararosanilina, são incapazes de reter o violeta de Genciana, assumindo a cor do corante de fundo (vermelha) (MARTINEZ, 2010).

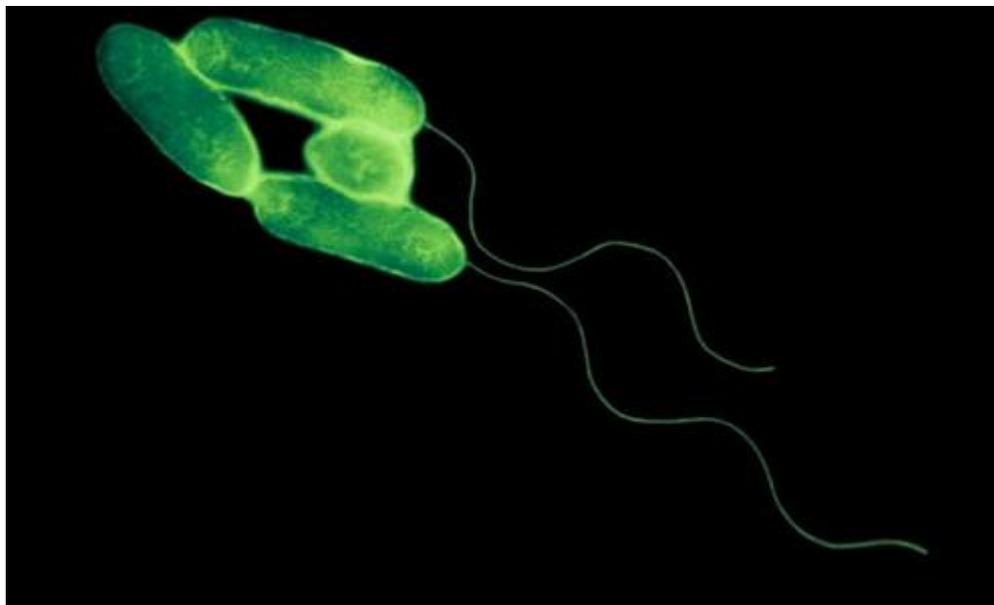
#### 3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 10) é definida como bacilos Gram negativos, aeróbios facultativos, móveis por flagelação. Produz pigmentos fluorescentes e piocianina, entretanto, pode-se encontrar culturas apiocianogênicas. Apresenta metabolismo oxidativo da glicose, desnitrifica o nitrato, hidrolisa a gelatina e a caseína, e é hemolíticas (SANCHEZ, 1999).

A *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patógeno humano, causa infecções no trato urinário, em ferimentos e queimaduras. É organismo muito resistente e alguns

podem crescer até mesmo em soluções de limpeza siderúrgica, causando assim, infecções hospitalares (SIMEÃO, 2011).

Elevados números de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável, principalmente em água engarrafada, podem estar relacionados à mudança no paladar, odor e turbidez (SILVA, *et al.*, 2005). Sendo um constante problema no envase dessas águas, pois no primeiro contato da bactéria com a linha de engarrafamento, nos tanques, pode ocorrer contaminação às águas que passarem posteriormente (SIMEÃO, 2011).



**Figura 10 - Bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (In: KIM, 2014)**

### 3.5 BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS

A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas, mas não diferencia os tipos existentes, portanto, não pode ser considerado como um fator de segurança, já que não é possível detectar a presença de toxinas ou patógenos (SIMEÃO, 2011).

A contagem padrão em placas é um método que consiste em realizar diluições em séries em placa, para observar o crescimento bacteriano. Esta técnica baseia-se no

fato de que, a 32°C, uma bactéria viva isolada se dividirá e formará uma colônia visível. Por ser mais difícil encontrar mais de 300 colônias em uma placa, é necessário diluir a cultura bacteriana original antes de transferir a cultura para placa sólida. Além disso, é necessário realizar a análise no mais curto intervalo de tempo para evitar a multiplicação dos micro-organismos (SIMEÃO, 2011).

A figura 11 mostra o crescimento de micro-organismos mesófilos aeróbios em Ágar para contagem padrão (PCA).



**Figura 11 - Bactérias aeróbias mesófilas (In: LOPÉZ, 2012)**

## 4 ENSINO MÉDIO

No ensino da Química, é de extrema importância que os conteúdos não sejam apenas ministrados na teoria, mas também na prática, pois essas duas formas associadas são muito relevantes à formação do indivíduo, contribuindo assim para o seu desenvolvimento cognitivo. A teoria dos livros didáticos contribui para a aprendizagem da química, mas a atividade experimental reforça e auxilia a compreensão e o domínio do conteúdo, pois estas podem ser ministradas com enfoque no cotidiano dos alunos colaborando assim, para o entendimento do tema em questão.

Segundo Bueno *et al.* (2009), as aulas experimentais, muitas vezes, não são ministradas aos alunos pela falta de formação dos professores, em saberem utilizar os equipamentos presentes nos laboratórios da escola. Como também a deficiência na estrutura que muitas escolas apresentam, como falta de laboratório e materiais específicos para serem ministradas as aulas práticas.

Entretanto, segundo Wisniewski (1990), procurando amenizar esses empecilhos em relação às aulas experimentais, é possível a construção de experimentos elaborados com materiais simples, baratos e fáceis de serem adquiridos, os quais garantem um suprimento básico dos laboratórios e facilitam a realização de trabalhos experimentais em sala de aula.

Para tanto, uma das técnicas experimentais mais simples para ser ministradas no ensino médio, sobre a importância da água e suas possíveis contaminações, é a realização de um experimento microbiológico da água presente na própria escola, em diferentes pontos: mineral, torneira, bebedouros como também água suja (água misturada com terra). Sendo que a água suja, não há necessidade de fazer diluições, pois esta experiência consiste em apenas analisar o crescimento de micro-organismos e não quantificação de bactérias.

O experimento consiste em preparar um meio de cultura caseiro, composto por batatas, que fornece o nutriente amido; repolho roxo, que é indicador de pH, pois

adquire colorações diferentes para cada faixa de pH; e gelatina para endurecimento do meio. A cor lilás do meio indica pH neutro. Para absorção dos nutrientes, os micro-organismos liberam substâncias para digerir o meio, podendo ser enzimas ácidas ou básicas. Assim, o meio poderá modificar de cor com o aparecimento das colônias, de acordo com a variação de pH dessas substâncias (RODRIGUES, 2010).

É recomendado que o preparo do meio de cultivo seja realizado ao lado de um fogareiro para evitar a contaminação. O calor esquenta o ar ao redor e elimina os micro-organismos daquela área, evitando que se depositem na placa e se reproduzam no meio antes do endurecimento do mesmo. A solução preparada deverá ser distribuída em placas de Petri, sendo que estas podem ser substituídas por vasilhas plásticas rasas com tampa transparente, caso a escola não tenha placas de Petri (RODRIGUES, 2010).

Em seguida, o professor juntamente com os alunos deverá fazer as coletas de água (bebedouro, torneira, água suja e água mineral). Nesta parte é importante salientar a importância da coleta para a análise, tomando assim os devidos cuidados, identificando os frascos, que deverão estar limpos e esterilizados, não abri-los até o momento da coleta, sendo que é necessário limpar a parte externa da torneira, deixando correr a água durante 3 a 5 minutos e colocar os frascos em caixa de isopor com gelo.

Depois da coleta, colocar 0,1 mL de cada amostra nas placas de Petri em duplicata e deixar numa estufa de 25°C ou em uma caixa de isopor bem fechada por 5 dias. Após esse período, o professor deverá levar os alunos para observarem as placas, analisando em quais ocorreram o crescimento de micro-organismos.

#### 4.1 SUGESTÃO DE PLANO DE AULA

No Anexo I, apresenta-se o roteiro da aula experimental sobre análise microbiológica em água, que poderá ser adaptado pelo professor e entregue aos alunos. Ele contém todas as orientações necessárias para o desenvolvimento da aula prática e também algumas questões que auxiliarão no fechamento da atividade.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAL**

#### **5.1.1 Água Mineral**

Neste trabalho foram utilizados frascos de 300 mL a 600 mL de diferentes marcas de água mineral não carbonatadas, compradas em mercados da cidade de Assis – SP. Sendo que de cada marca foram analisados cinco lotes diferentes e encaminhados ao laboratório Centro de Pesquisa e Ciências – CEPECI, onde foram efetuadas as análises. No mesmo dia da coleta, as amostras de água foram inoculadas para que não ocorresse risco de contaminação ou invalidação do material coletado.

#### **5.1.2 Equipamentos**

- Câmara de fluxo laminar (TROX TECHNIK);
- Balança semi-analítica (RADWAG - WTB 3000);
- Agitador magnético (FISATAM - MODELO 702);
- Autoclave (CEIME - PHOENIX);
- Estufas de 32°C (FANEM - MODELO 315 SE);
- Estufa de 37°C (MARCONI – MA 032);
- Estufa de 180°C (FANEM – MODELO 502 C);
- pHmetro (TECNOPON – MODELO Mpa – 210);
- Banho – maria a 44,5°C (QUIMIS – Q – 3042105);
- Contador de células (Phoenix CP 600 Plus).

### 5.1.3 Meios de cultura

Os meios de cultivo utilizados neste trabalho foram preparados de acordo com a instrução da embalagem. Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 120°C. As pipetas e as placas de Petri utilizadas nas análises foram esterilizadas também em estufa, a 180°C, por uma hora.

#### 5.1.3.1 Meios desidratados

- Caldo Lauril – Sulfato/Triptose - CLST (ACUMEDIA – LOTE: 106121B);
- Água Peptonada (BECTON, DICKINSON AND COMPANY – LOTE: 5055132);
- Verde Brilhante – VB (HIMEDIA – LOTE: 33073);
- Caldo EC Medium - EC (ACUMEDIA – LOTE: 100, 558B);
- Standard Methods Agar – PCA (HIMEDIA - LOTE: 85876);
- Levine EMB – Agar (MERCK – LOTE: VK482742);
- Tryptic Soy Broth – TSB (BECTON, DICKINSON AND COMPANY – LOTE: 4342224);
- Acetamide Broth (HIMEDIA – LOTE: 2066).

#### 5.1.3.2 Meios formulados

Os meios de cultivo formulados foram preparados da seguinte forma:

- Indol: pesou-se 1g de triptona; 0,5g de cloreto de sódio (NaCl), para 100mL de água destilada. Agitou-se até completa dissolução e ajustou o pH em 7,3. Em seguida, transferiu-se 5 mL para tubos de ensaio.
- Vermelho de metila (VM), Vogas-Proskauer (VP): pesou-se 0,7g de Peptona; 0,5g de Glicose; 0,5g de Fosfato dipotássio ( $K_2HPO_4$ ) para 100 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se 5 mL para tubos de ensaio.

- Citrato de Koser: pesou-se 0,15g de Fosfato de sódio amoniacal ( $\text{NaNH}_5\text{PO}_4$ ); 0,1g de Fosfato monopotássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 0,02g de Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ); 0,3g de Citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), diluindo estes em 100 mL de água. Em seguida, agitou-se, ajustou o pH para 6,7e transferiu-se 5 mL para tubos de ensaio.

- Caldo Asparagina em concentração simples: pesou-se 0,3 g de asparagina; 0,1 g de Fosfato dipotássio anidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) p.a; e 0,05 g de Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Acrescentou-se 100 mL de água destilada, aqueceu agitando até a sua completa dissolução. Distribuiu-se 5 mL em cada tubo de ensaio.

- Ágar Leite: preparou-se duas soluções, a primeira pesou-se 100g de leite em pó desnatado para 500 mL de água destilada. Aqueceu em banho-maria, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio e esterilizou-se em autoclave a  $120^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após a esterilização, manteve a solução preparada em banho-maria a  $55^\circ\text{C}$ , para estabilização da temperatura, até o momento de sua adição à solução 2.

Para a segunda solução, pesou-se 12,5g de Caldo nutriente desidratado; 2,5g de Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) p.a; e 15g de Ágar, para 500 mL de água destilada. Deixou-se em repouso por 15 minutos, logo após aqueceu agitando até completa dissolução do meio e esterilizou-se em autoclave durante 15 minutos. Após a esterilização, colocou em banho-maria, a  $55^\circ\text{C}$ , para estabilização de temperatura do meio de cultura preparado.

Juntou-se as soluções 1 e 2 e, com todos os cuidados de assepsia, distribuiu-se 20 mL em placas de Petri, previamente esterilizadas. Após solidificação do meio, embrulhou-se as placas de Petri com papel Kraft e manteve-se sob refrigeração durante, no máximo, duas semanas.

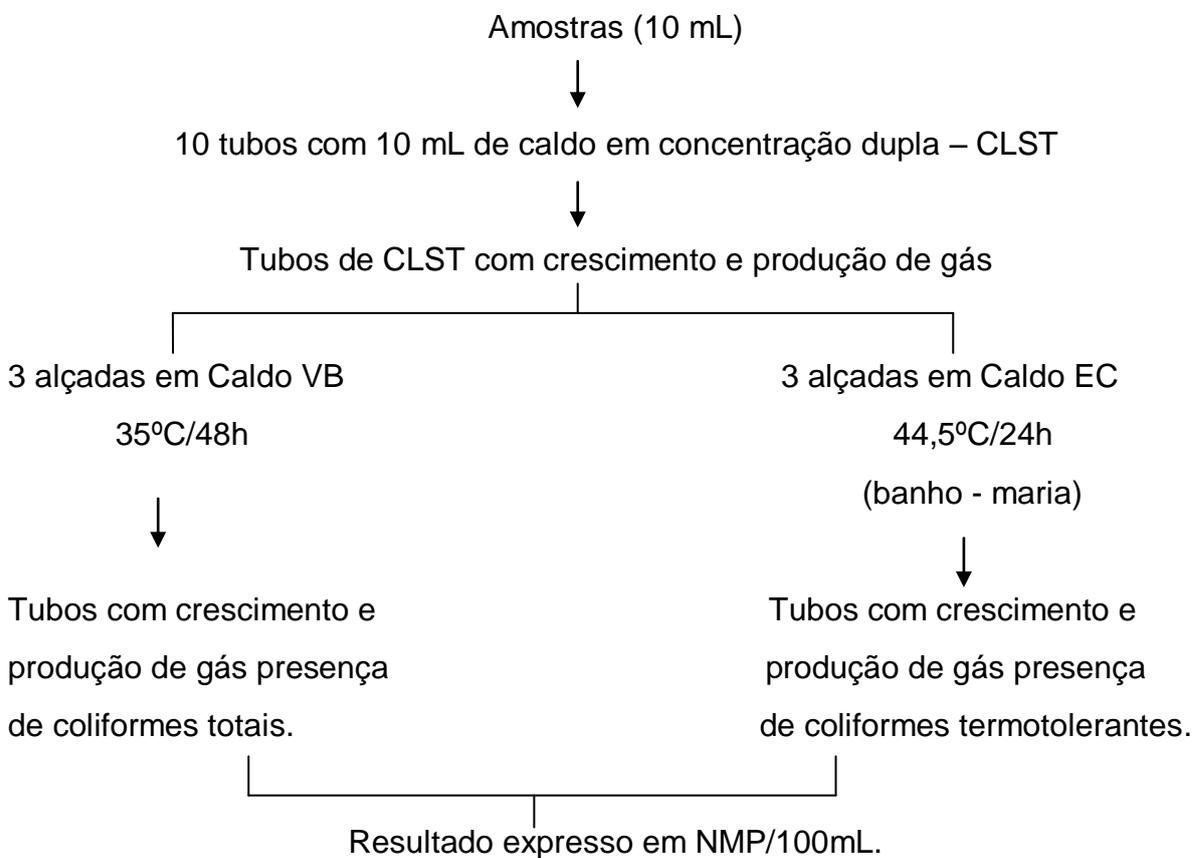
## 5.2 MÉTODOS

Nas amostras foram avaliados os seguintes parâmetros de análise microbiológica: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e contagem padrão, segundo os métodos de Sanchez (1999), utilizando os

parâmetros de referência da Resolução nº 275/2005, D.O.U de 23/09/2005 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

### 5.2.1 Coliformes termotolerantes e totais

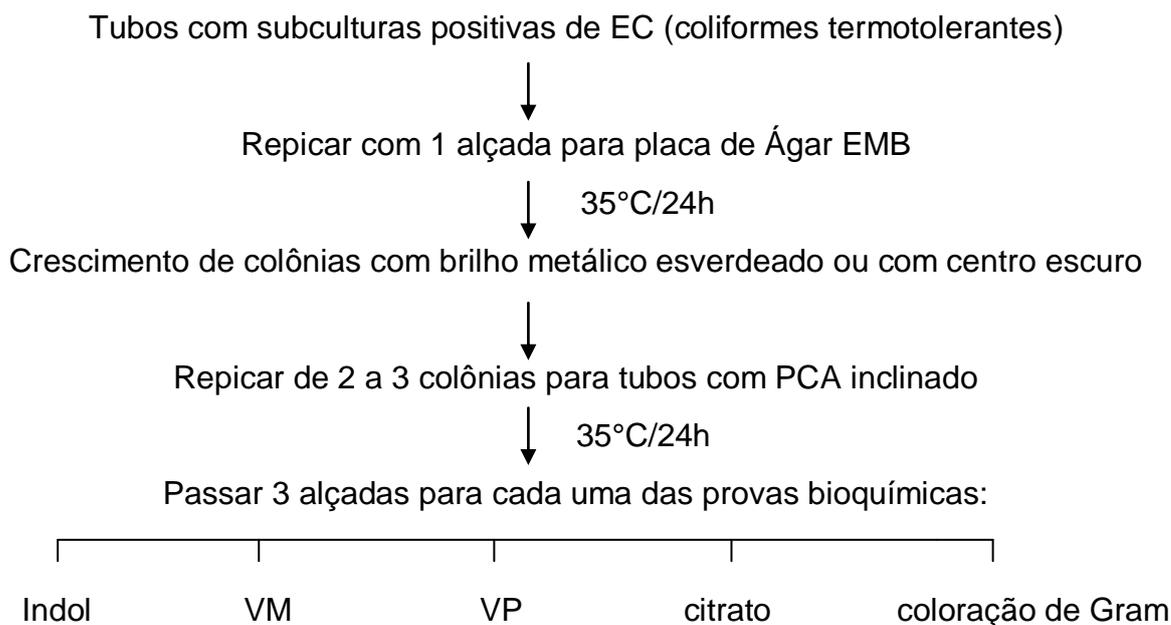
A sequência de análise para coliformes termotolerantes e totais pode ser visualizada na figura 12.



**Figura 12 - Sequência de análise de coliformes termotolerantes e totais**

### 5.2.2 *Escherichia. coli*

A sequência de análise para *E. coli* pode ser visualizada na figura 13.



**Figura 13 - Sequência de análise de *E. coli***

Para os testes confirmativos, é importante salientar que todos os meios poderão ser inoculados a partir de uma única alçada de cultura do tubo PCA, porém o Caldo Citrato de Koser deve ser inoculado em primeiro lugar, para evitar a introdução de compostos de carbono originários dos demais testes.

Para o Caldo citrato de Koser (teste de citrato) deve-se inocular uma alçada com inóculo leve da cultura em tubos com 5 mL de caldo citrato de Koser, incubando a 35°C/72 a 96 horas, sendo necessário observar se há crescimento (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas de *E.coli* são citrato-positivas.

No teste de indol, deve-se inocular uma alçada com inóculo leve da cultura, incubando a 35°C/24horas. Deve-se adicionar 5 gotas do reagente de Kovacs e agitar levemente. O teste será positivo no caso de desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura. Se o anel permanecer na cor amarela do reagente o teste será considerado negativo. As cepas de *E. coli* podem ser indol positivas ou negativas.

Para o Caldo VM-VP (teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer). É necessário inocular uma alçada com inóculo leve da cultura, seguida de incubação a 35°C/48 horas. Para o teste de VP, deve-se transferir assepticamente 1,0 mL da cultura para um tubo de ensaio, adicionar 0,6 mL de solução alfa-naftol 5% e agitar. Adicionar em

seguida, 0,2 mL de solução de KOH 40%, agitar e adicionar uma pitada leve de cristais de creatina, para acelerar a reação. Deixar descansar e observar periodicamente, por até 1 hora, o desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo. As cepas de *E.coli* são VP negativas. Será necessário reincubar a cultura remanescente no caldo VM-VP por 48 horas adicionais e realizar o teste de VM com 96 horas de incubação. Para a realização do teste, adicionar a cada 2,5 mL da cultura, 5 gotas da solução de vermelho de metila, observando imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo). As cepas de *E.coli* são VM positivas.

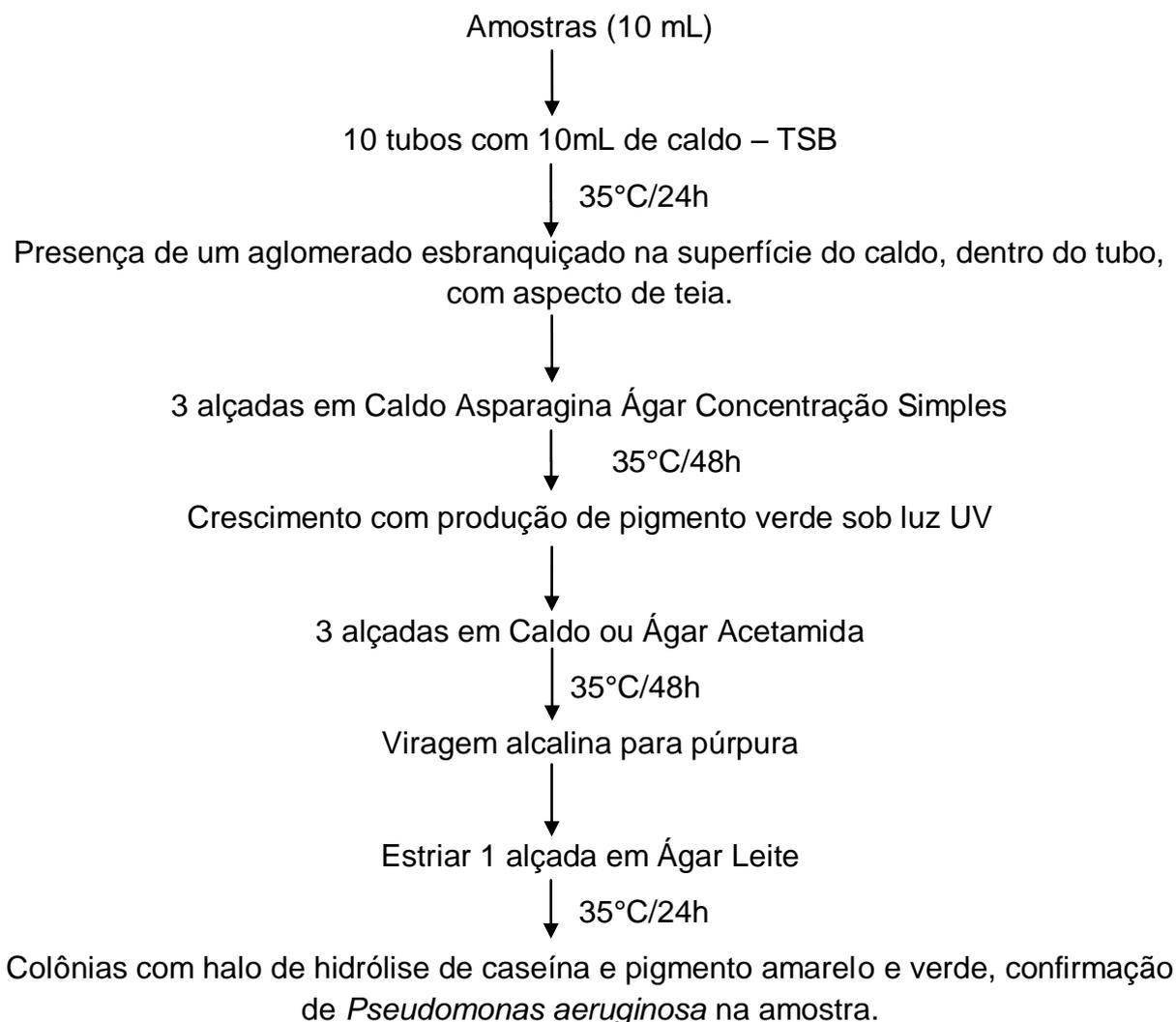
O processo de coloração de Gram consiste em aplicar a cultura dos tubos de PCA, em uma lamina (esfregaço seco), logo após inserir gotas de violeta de metila até cobrir toda a lâmina, deixando agir por 60 segundos, após o tempo corrido, lavar com água destilada. Cubra a lâmina com lugol deixando por mais 60 segundos, lavar com álcool etílico 95%, e em seguida aplicar lisina e deixar agir por 15 segundos, lavar com água destilada e deixar secar. Aplicar óleo de imersão sobre o esfregaço e observar no microscópio com objetiva de imersão (100X).

Considerar como *E.coli* todas as culturas com as seguintes características: bastonetes Gram-negativos, indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-). Anotar quantos tubos de caldo EC, estriados em EMB, foram confirmados com *E.coli* e determinar o NMP/mL em uma tabela de NMP adequada às diluições inoculadas.

As amostras analisadas não foram submetidas aos testes confirmativos, pois não apresentaram crescimento nos testes presuntivos.

### **5.2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

A sequência de análise para *Pseudomonas aeruginosa* pode ser visualizada na figura 14.

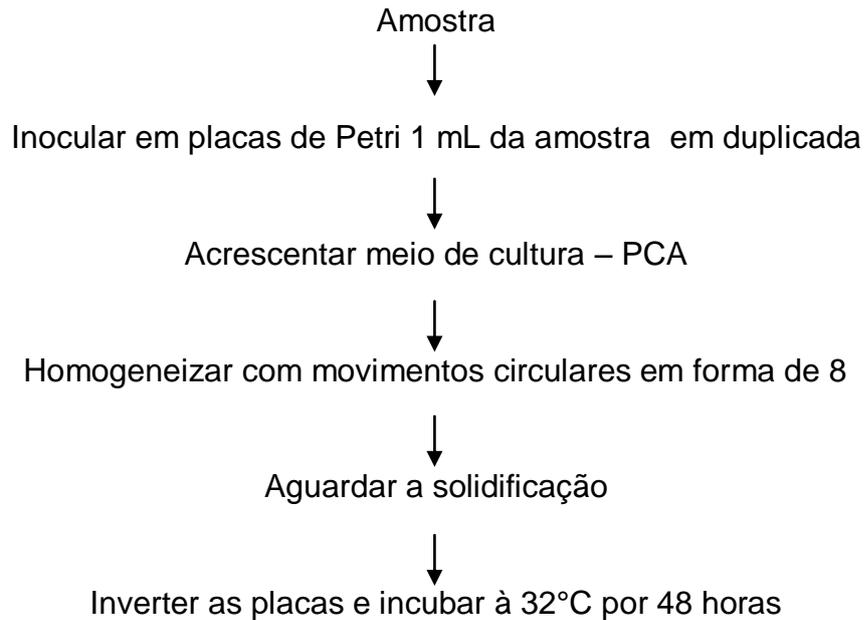


**Figura 14 - Sequência de análise de *Pseudomonas aeruginosa***

O cálculo do NMP de *P. aeruginosa* foi obtido através da tabela de NMP do Anexo II.

#### **5.2.4 Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (PCA)**

A sequência de análise para bactérias aeróbias mesófilas pode ser visualizada na figura 15.



**Figura 15 - Sequência de análise de bactérias aeróbias mesófilas**

Não sendo possível a contagem de bactérias presentes, devido ao grande aglomerado de micro-organismos mesófilos aeróbios, será necessário realizar a análise novamente, utilizando-se diluições. Assim, deverá colocar 1 mL de amostra em um tubo contendo 10 mL de água de diluição tamponada e desta transferir 1 mL para placas de Petri estéreis e em seguida adicionar o meio de cultura PCA. Sendo assim, está será uma diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra. Se for preciso, realizar em outras diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,...), fazendo sempre cada diluição em duplicata.

O resultado foi dado em UFC/mL, que consiste em multiplicar o número de colônias típicas contadas pelo inverso da diluição inoculada.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras foram inoculadas dentro do fluxo laminar com o máximo de cuidado para que não ocorresse risco de contaminação decorrente de manipulação. Foram realizados testes confirmativos nas amostras que apresentaram resultados positivos nos testes presuntivos. Sendo que cada marca recebeu as letras de A, B, C, D, seguidas das numerações de 1 a 5, pois foram analisadas cinco lotes de cada marca, durante os meses de Junho a Setembro de 2014.

A tabela 5 apresenta todos os resultados obtidos para coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e contagem padrão, referentes à marca A1.

AMOSTRAS	COLIFORMES TOTAIS NMP/100 mL	COLIFORMES TERMOTOLERANTES NMP/100 mL	<i>E. coli</i> NMP/100 mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NMP/100 mL	Contagem Padrão UFC/mL
A1	ausente	ausente	ausente	ausente	$1,11 \times 10^2$
A2	ausente	ausente	ausente	ausente	$6,05 \times 10^3$
A3	ausente	ausente	ausente	16,1	$8,9 \times 10^2$
A4	ausente	ausente	ausente	16,1	$5,35 \times 10^2$
A5	ausente	ausente	ausente	5,1	$7,25 \times 10^2$

**Tabela 5 - Resultados obtidos para as análises de água, referentes à marca A**

A tabela 6 apresenta os resultados referentes à marca B1, com os 5 lotes analisados.

AMOSTRAS	COLIFORMES TOTAIS NMP/100 mL	COLIFORMES TERMOTOLERANTES NMP/100 mL	<i>E. coli</i> NMP/100 mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NMP/100 mL	Contagem Padrão UFC/mL
B1	ausente	ausente	ausente	16,1	$4,24 \times 10^3$
B2	ausente	ausente	ausente	16,1	$7,2 \times 10^3$
B3	ausente	ausente	ausente	> 23,0	$1,0 \times 10^4$
B4	ausente	ausente	ausente	ausente	$3,0 \times 10^2$
B5	ausente	ausente	ausente	16,1	$1,96 \times 10^4$

**Tabela 6 - Resultados obtidos para as análises de água, referentes à marca B**

Na tabela 7, estão os resultados obtidos para os 5 lotes da marca C.

AMOSTRAS	COLIFORMES TOTAIS NMP/100 mL	COLIFORMES TERMOTOLERANTES NMP/100 mL	<i>E. coli</i> NMP/100 mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NMP/100 mL	Contagem Padrão UFC/mL
C1	ausente	ausente	ausente	ausente	$1,6 \times 10^2$
C2	ausente	ausente	ausente	ausente	$2,05 \times 10^2$
C3	ausente	ausente	ausente	ausente	$6,35 \times 10^1$
C4	ausente	ausente	ausente	ausente	$6,55 \times 10^2$
C5	ausente	ausente	ausente	ausente	$4,5 \times 10^1$

**Tabela 7 - Resultados obtidos para as análises de água, referentes à marca C**

Na tabela 8, apresenta os resultados obtidos em relação à marca D, com os 5 lotes analisados.

AMOSTRAS	COLIFORMES TOTAIS NMP/100 mL	COLIFORMES TERMOTOLERANTES NMP/100 mL	<i>E. coli</i> NMP/100 mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NMP/100 mL	Contagem Padrão UFC/mL
D1	ausente	ausente	ausente	ausente	$7,15 \times 10^1$
D2	ausente	ausente	ausente	ausente	$1,25 \times 10^2$
D3	ausente	ausente	ausente	5,1	$6,5 \times 10^2$
D4	ausente	ausente	ausente	ausente	$2,55 \times 10^1$
D5	ausente	ausente	ausente	16,1	$2,15 \times 10^3$

**Tabela 8 - Resultados obtidos para as análises de água, referentes à marca D**

### 6.1 ANÁLISES DE COLIFORMES TOTAIS

Dos 20 lotes analisadas, referentes às marcas A, B, C e D, todas apresentaram ausência para coliformes totais, desta forma apresentaram ausência para coliformes termotolerantes e para *E. coli*. As bactérias coliformes termotolerantes são bactérias do grupo coliformes totais e a *E. coli* é uma bactéria do grupo coliformes termotolerantes. Desta forma, nessas análises, como todos os testes presuntivos, deram negativos, não foi necessário realizar as análises confirmativas.

Segundo os parâmetros da Resolução nº 275/2005, para teste em tubos em que o resultado é em NMP para amostras indicativas, como foi realizado neste trabalho, deve apresentar ausência ou  $< 1,1$  NMP/100 mL para coliformes totais e ausência para coliformes termotolerantes e *E. coli*. Desta forma, todos os lotes analisados encontram-se dentro da legislação para água mineral, sendo próprio para consumo humano.

## 6.2 ANÁLISES DE *Pseudomonas aeruginosa*

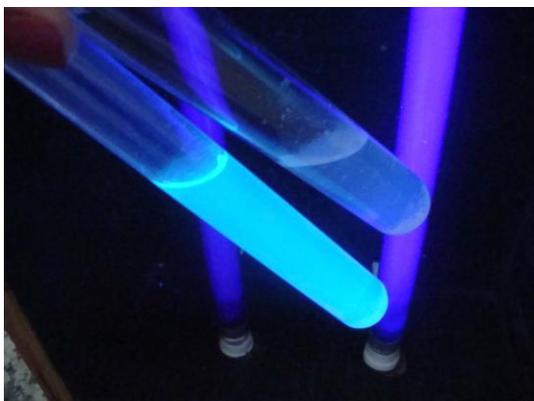
Dos 5 lotes analisados para *Pseudomonas aeruginosa*, referente à marca A como mostrados na tabela 1, dois apresentaram ausência para este tipo de bactéria no teste presuntivo TSB, não sendo necessário realizar o teste confirmativo. Porém, para os lotes A3, A4 e A5, dos 10 tubos de TSB que apresentaram um aglomerado esbranquiçado na superfície do caldo, com aspecto de teia, foram realizados os testes confirmativos através do caldo asparagina e acetamida.

Na marca B, tabela 2, apenas o lote B4 apresentou ausência para *Pseudomonas aeruginosa* no teste presuntivo, desta forma, os 10 tubos de TSB positivos dos outros 4 lotes, passaram por testes confirmativos.

Os 5 lotes da marca C, tabela 3, apresentaram ausência no teste presuntivo para *Pseudomonas aeruginosa*, desta forma confirmou-se a ausência desse tipo de micro-organismo nessas águas analisadas.

A marca D, os lotes D1, D2 e D4, conforme mostrados na tabela 4, apresentaram ausência para *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo que apenas os tubos de TSB positivos dos lotes D3 e D5 passaram por testes confirmativos.

A figura 16 apresenta dois tubos de amostras analisadas, referentes ao teste confirmativo para asparagina, sendo que um apresentou teste positivo ficando fluorescente e o outro teste negativo, incolor ao ser exposto a luz negra.



**Figura 16 - Tubo positivo (fluorescente) e tubo negativo (incolor) para análise de asparagina exposto a luz negra**

A figura 17 mostra dois tubos de amostras analisadas, referentes ao teste confirmativo para acetamida, sendo que um apresentou teste negativo não alterando a cor do meio de cultura e o outro teste positivo com coloração púrpura.



**Figura 17 - tubo negativo (esquerda) e tubo positivo (direita), coloração púrpura para análise de acetamida**

Devido à possibilidade de ocorrência de resultados falsos-positivos no Caldo Acetamida, foi necessário que a positividade das culturas nesse meio fosse confirmada através da transferência de um inóculo para Ágar Leite. Desta forma, a hidrólise da caseína do leite, evidenciada pela formação de halo ao redor da colônia e a produção de um pigmento amarelo e verde, confirmaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nos lotes A3, A4, A5, B1, B2, B3, B5, D3, D5. Sendo que a figura 18 mostra a confirmação em Ágar Leite para *P. aeruginosa*.



**Figura 18 - Teste de confirmação em Ágar Leite para *Pseudomonas aeruginosa***

Os lotes que apresentaram presença para *Pseudomonas aeruginosa* encontram-se acima dos valores permitidos pela legislação, pois apresentaram resultados maiores que 1,1 NMP/100 mL, que segundo a Resolução nº 275/2005 é permitido em amostras indicativas resultados < 1,1 NMP/100 mL ou ausência para esse tipo de micro-organismo.

A presença da *P. aeruginosa* em água mineral não é aceitável por ser um patógeno oportunista capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos, além de apresentarem maior resistência do que os micro-organismos patogênicos, sendo capaz de inibir as bactérias do grupo coliforme (DIAS, 2008).

A tabela 9 apresenta as porcentagens de presença de *Pseudomonas aeruginosa* em relação aos lotes e marcas analisadas.

Resultados	Lotes		Marcas	
	Nº	%	Nº	%
Acima do padrão	11	55	3	75
Dentro do padrão	9	45	1	25
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>100</b>

**Tabela 9 - Porcentagens de presença de *Pseudomonas aeruginosa* em relação lotes e marcas analisadas**

Nas águas minerais engarrafadas, a maioria dos micro-organismos presentes são bastonetes Gram-negativos, frequentemente identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, originários da fonte (micro-organismos autóctones) ou de contaminação no processo produtivo (micro-organismos alóctones). Esta espécie *P. aeruginosa* é oligotrófica, ou seja, podem multiplicar em água mineral, mesmo com baixa concentração de nutrientes, isso explica a habilidade de adaptação e sua capacidade de se desenvolver (DIAS, 2008).

Fard (2007) avaliou a qualidade da água mineral na fonte e no envase, sendo que as duas fontes analisadas apresentaram contaminação com *Pseudomonas aeruginosa*, comprovando que a água mineral já se apresentava contaminada antes de entrar no processo de envase, fato que salienta a possibilidade desse micro-organismo colonizar a tubulação que conduz a água mineral da captação até a linha de envase e formar biofilme neste ambiente. Visto que após a estocagem da água mineral em embalagens, ocorreu um aumento da frequência de amostras positivas para *P. aeruginosa*.

O micro-organismo *P. aeruginosa* pode estar presente na água mineral como micro-organismo autóctone, no entanto acredita-se que é mais provável que este contamine a água através do processo produtivo na planta da indústria, pois este é

um micro-organismo que se adapta facilmente às condições adversas, podendo colonizar canalizações, superfícies de equipamentos e embalagens (DIAS, 2008).

Portanto, a contaminação de *Pseudomonas aeruginosa* de mesma marca, como observado nas tabelas 1, 2 e 4, pode estar relacionada com a contaminação na fonte como também na linha de indústria, pois no primeiro contato de *Pseudomonas aeruginosa* pode ocorrer colonização dos tanques e de outras partes, de modo a fornecer uma contaminação constante para as águas que passem por esse ponto.

Segundo Fard (2007), durante o período de estocagem da água mineral engarrafada, o desenvolvimento da biota autóctone pode provocar alta concentração de *P. aeruginosa* proporcionando risco ao consumidor, principalmente aqueles imunocomprometidos e idosos. A presença significativa deste micro-organismo na água mineral deve-se a seu importante potencial oportunista patogênico.

Outro fato que pôde ser observado neste trabalho foi que em diferentes lotes da mesma marca apresentaram ausência para *Pseudomonas aeruginosa*, isso pode ser explicado devido às diferentes épocas de amostragem e os focos de contaminação terem sido eliminados através do monitoramento desde a fonte até o processo de envase realizando as limpezas corretas e necessárias. Esses monitoramentos, segundo Fard (2007), devem seguir os regulamentos técnicos da ANVISA, os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's) e o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Dias (2008) realizou análises de diferentes lotes de mesma marca na região de Araraquara – SP, sendo que os resultados obtidos apresentaram três amostras de duas marcas com contaminação de *Pseudomonas aeruginosa*. Este fato está relacionado à época de amostragem, pois *P. aeruginosa* pode ou não estar presente nas fontes e mesmo não havendo a contaminação da fonte por este micro-organismo, ocasionalmente a bactéria esteve presente nas envasadoras e produto final.

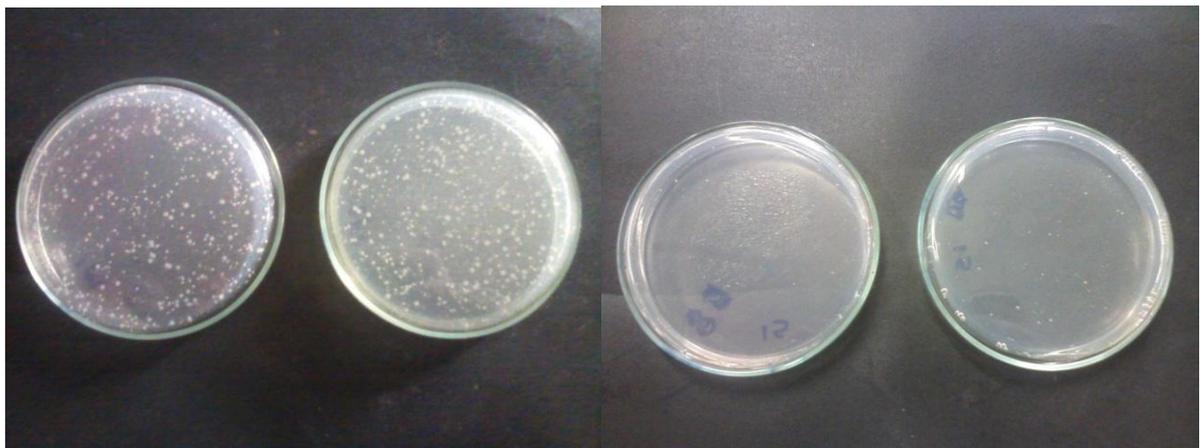
Segundo Eiroa, Junqueira, Silveira (1997), a época de amostragem está relacionada ao envase da água, pois a segunda e terceira semanas são mais propícias a uma rápida proliferação de *Pseudomonas aeruginosa*, decorrente de fatores como

oxigênio, temperatura de estocagem e pico máximo de bactérias que depois com o tempo torna-se constante, diminuindo assim o foco de contaminação.

Para diminuir o foco de contaminação de *Pseudomonas aeruginosa*, é necessário que ocorra monitoramentos na parte de captação, no que diz respeito as bombas submersas e tubulações anexas; e no bombeamento para evitar arraste de areia, lodo, materiais sólidos, esporos e células vegetativas de micro-organismos. Na parte de reservatório, deve haver inspeção visual de forma a constatar incrustações nas instalações, controle da higienização das canalizações, do filtro de ar microbiológico e do tempo de residência da água nesse depósito. Em relação ao envase, deve existir um controle, quanto à higienização das instalações e fechamento das garrafas (GOMES *et al.*, 2011).

### 6.3 ANÁLISES DE CONTAGEM PADRÃO

A maioria das amostras foi diluída em virtude da grande proliferação de bactérias, impossibilitando a contagem, para tanto foram feitas diluições a  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , como mostrada na figura 19.



**Figura 19 - Esquerda placas de Petri em duplicata na diluição direta e imagem da direita diluição a  $10^{-2}$**

Segundo a legislação da Resolução nº 275/2005, não existe um padrão específico para água mineral em relação à contagem de bactérias aeróbias mesófilas. Porém a portaria nº 2914 do MS, de 12 de dezembro de 2004 que institui a norma de qualidade para água de consumo humano, estabelece máximo de 500 UFC/mL. Das 20 amostras analisadas apenas 6 (30%) apresentaram contagem abaixo deste padrão.

Segundo Dias (2008), não se sabe exatamente se a multiplicação das bactérias na água depois do engarrafamento é devido à ressuscitação de um grande número de células dormentes não cultiváveis presente na fonte de água ou no sistema de engarrafamento, ou se ela é resultado da divisão celular e multiplicação de poucas células cultiváveis inicialmente presentes.

Observou-se também que alguns lotes de mesma marca apresentaram altas contagens de heterotróficos e outras não, isso se deve a um maior cuidado sanitário no processo, o que não possibilitou que os micro-organismos presentes na fonte após o engarrafamento se multiplicassem ou não permitiu que ocorresse contaminação durante o engarrafamento.

A água mineral não é estéril e apresenta determinado índice de micro-organismos, originárias do próprio aquífero (espécies autóctones), este índice pode ser diminuído através de processo de filtração que ocorre quando a água passa pelas rochas e terra, sendo que o crescimento dos micro-organismos é influenciado por diversos fatores presentes no ambiente como: temperatura, pH, umidade, tensão de oxigênio e nutrientes. A água mineral apresenta também espécies alóctones oriundas do processo de industrialização da água mineral (FARD, 2007).

A contaminação das fontes das águas subterrâneas está relacionada com o destino final do esgoto doméstico e industrial; da disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos e industriais; e da modernização da agricultura. Já na indústria, a contaminação ocorre nos equipamentos, embalagens, encanamento, exposição ao ar e contato humano durante o processo de envase (DIAS, 2008).

A água mineral proveniente diretamente do aquífero possui população microbiana em torno de 20 UFC/mL, sendo que esta é aumentada para aproximadamente 102-105 UFC/mL após duas a três semanas do envase, devido a mudanças nas

condições ambientais. Este rápido crescimento dos micro-organismos é relacionado à oxigenação durante o processo de envase da água mineral, ao aumento de área de contato devido o confinamento dentro da embalagem, ao aumento de temperatura durante a estocagem e aos nutrientes presentes na embalagem. Como por exemplo, a embalagem de polietileno tereftalato - PET é uma fonte de matéria orgânica que pode contribuir para o crescimento de micro-organismos, pois durante o período de armazenamento libera diversos compostos orgânicos (FARD, 2007).

A contagem de bactérias heterotróficas é um procedimento utilizado para acompanhar variações nas condições higiênicas e do processo produtivo. Muitos micro-organismos desenvolvem-se lentamente em meio de cultura pobre em nutrientes. Existem evidências que estas bactérias não apresentam risco a população saudável, no entanto alguns destes micro-organismos são patogênicos oportunistas (FARD, 2007).

Portanto, as indústrias de água mineral precisam adotar medidas a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade do produto com os regulamentos técnicos. As operações de captação, envase, transporte e manuseio não podem comprometer a qualidade da água mineral e por este motivo, todas essas etapas devem ser avaliadas periodicamente. Além do Manual de Boas Práticas, os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's) são indicados para auxiliar no controle de qualidade das etapas de produção da indústria (GOMES *et al.*, 2011).

Devido aos problemas causados pelas altas contagens de heterotróficos em água mineral e para se avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial, seria interessante a inclusão desse parâmetro na legislação brasileira para água mineral de forma a fornecer água mais segura para o consumidor. E que tenha maior fiscalização por parte das fábricas como também nos pontos de distribuição (DIAS, 2008).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados dos 20 lotes analisados para coliformes totais apresentaram ausência para esse tipo de micro-organismo, desta forma apresentaram ausência para coliformes termotolerantes e para *E. coli*. Portanto, essas amostras em relação a esses micro-organismos encontram-se dentro da legislação da Resolução nº 275/2005 para água mineral.

Os resultados de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resultados insatisfatórios, mostrando que dos 20 lotes (55%) estão impróprios para o consumo humano, de acordo com a Resolução nº 275/2005 para água mineral.

Todos os lotes apresentaram presença de bactérias mesófilas viáveis, através da análise de Contagem padrão, sendo que alguns apresentaram valores mais elevados em relação aos outros. Este parâmetro não apresenta padrão na Resolução nº 275/2005, porém é de extrema importância para acompanhar as variações da qualidade higiênico-sanitárias do sistema industrial. Pois apesar de existirem evidências que estas bactérias não apresentam risco à população saudável, no entanto alguns destes micro-organismos são considerados patogênicos oportunistas, podendo causar doenças ao consumidor.

Conclui-se que das quatro marcas analisadas, a marca C é a que se enquadrou à legislação, pois apresentou ausência para coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E.coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo que a Contagem Padrão nos lotes dessa marca foram relativamente baixos em relação às outras marcas.

## REFERÊNCIAS

ABINAM, Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais. **Água Mineral: uma fonte de benefícios para a saúde.** 2008. Disponível em: <[http://www.abinam.com.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=398&friurl=-Agua-Mineral:-uma-fonte-de-beneficios-para-a-saude-:](http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=398&friurl=-Agua-Mineral:-uma-fonte-de-beneficios-para-a-saude-:)> Acesso em: 24 jun. 2014.

ACQUARELLA, Distribuidora de Água Mineral. **Água Mineral.** 2011. Disponível em: <[http://www.acquarella.com.br/ACQ/%C3%A1gua\\_mineral/%C3%A1gua\\_mineral.htm](http://www.acquarella.com.br/ACQ/%C3%A1gua_mineral/%C3%A1gua_mineral.htm)>. Acesso em: 25 jul. 2014.

ALOCILJA, Evangelyn. **MSU technology spin-out company to market portable biohazard detection.** 2012. Disponível em: <<http://phys.org/news/2012-01-msu-technology-spin-out-company-portable.html>>. Acesso em: 30 set. 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2000. **Resolução – RDC nº 54, de 15 de julho de 2000.** Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/visa343302010/rdc-n-54-2000-piq-gua-mineral>> Acesso em: 30 mar. 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2000. **Resolução – RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/76f8a4804745865c8f88df3fbc4c6735/RDC\\_275\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/76f8a4804745865c8f88df3fbc4c6735/RDC_275_2005.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 30 set. 2014.

ARAGUAIA, Mariana. **Escherichia coli.** 2011. Disponível em <[www.brasilecola.com](http://www.brasilecola.com)> Acesso em: 29 set. 2013.

BRASIL, Ambiente. **A Origem da Água Mineral.** 2011. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos\\_agua\\_mineral/a\\_origem\\_da\\_agua\\_mineral.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua_mineral/a_origem_da_agua_mineral.html)> Acesso em 25 jun. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914 do MS, de 12 de dezembro de 2011.** Disponível em: <[http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/Portaria\\_MS\\_2914-11.pdf](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/Portaria_MS_2914-11.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Regulamento técnico referente a Padrões de Identidade e qualidade para água mineral natural e água natural. **Revista Água Mineral**, Resolução nº 310, de 16 de julho de 1999, ago/out, 1999.

BUENO L.; MOREIRA, K. C.; SOARES, M.; DANTAS, D. J.; SOUSA, A. C.; WIEZZEL, J.; TEIXEIRA, M. F. S. **O ensino de química por meio de atividades experimentais: a realidade do ensino nas escolas.** - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências e Tecnologia Campus de Presidente Prudente, São Paulo, Presidente Prudente, 2009.

CAETANO, L.C. **Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano duodecenal (2010 - 2030) de geologia, mineração e transformação mineral.** 2009. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano\\_duo\\_decenal/a\\_mineracao\\_br\\_asileira/P31\\_RT57\\_Perfil\\_da\\_xgua\\_Mineral.pdf](http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_decenal/a_mineracao_br_asileira/P31_RT57_Perfil_da_xgua_Mineral.pdf)> Acesso em: 30 jun. 2014.

DIAS, Maria Fernanda Falcone. **Qualidade microbiológicas de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara – SP.** 2008. 66p. Dissertação (Pós Graduação) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, São Paulo, Araraquara, 2008.

DNPM, Departamento Nacional de Produção Mineral. **Portaria Nº 337 de 19 de setembro de 2002 do Ministério de Estado de Minas e Energia.** Caracteriza e classifica as águas minerais naturais brasileiras. Disponível em: <[http://www.nehma.ufba.br/legislacao/cod\\_aguas\\_minerais.htm](http://www.nehma.ufba.br/legislacao/cod_aguas_minerais.htm)> Acesso em: 10 jul. 2014.

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

FARD, E. M. G. P. **Avaliação da qualidade da água mineral e do processo de envase em duas fontes comerciais.** 2007. 96p. Dissertação (Pós Graduação) – Universidade Federal do Paraná. Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2007.

FARIA, Caroline. **Água Mineral.** 2008. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/hidrografia/agua-mineral/>> Acesso em: 27 jun. 2014.

FERRER, A. M.; PERIS, P.; REYES, R.; GUANABENS, N. Contribuição de cálcio, magnésio e sódio na água engarrafada e água para consumo público: implicações para a saúde. **Medicina Clínica**, v.131, n.17, novembro, 2008, p. 641-646.

GOMES, T.V. D.; SILVA, M. R.; CONCEIÇÃO, C.; AZEVEDO, D. R. P. **Proposta de plano para Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para o processo de industrialização da água mineral**. 2011. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/nepa/arquivo\\_san/volume\\_13\\_6\\_2011/4-Gomes-et-al-agua-mineral\\_13-06-2011.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_13_6_2011/4-Gomes-et-al-agua-mineral_13-06-2011.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2014.

GUIMARÃES, B. C. Importância da água mineral. **Revista das Águas**. v. 6 junho, 2008. p. 142-144.

KIM, K. *Pseudomonas aeruginosas*. 2014. Disponível em: <[HTTP://www.visualphotos.com/image/1x3745943/pseudomonas\\_aeruginosa\\_colored\\_transmission](http://www.visualphotos.com/image/1x3745943/pseudomonas_aeruginosa_colored_transmission)>. Acesso em: 20 jul. 2014.

KULAIF, Yara. **Água Mineral**. Departamento Nacional de Produção Mineral. 2012. Disponível em: <[https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra\\_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7368](https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7368)>. Acesso em: 10 mai. 2013.

LOPÉZ, I. **Si Fleming levantara La cabeza: conocer cientos de compuesto químicos producidos por una sola colônia bacteriana**. 2012. Disponível em: <<http://www.microbioun.blogspot.com.br/2012/07/si-fleming-levantara-lacabezaconocer.html>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

MAIA, S. **Empresa é autuada por captar água sem licenciamento**. 2009. Disponível em: <<http://caxiasmaisverde.blogspot.com.br/2009/11/empresa-e-autuada-por-captar-agua-sem.html>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

MARATUÃ, Empresa. **Água Mineral Natural**. 2003. Disponível em: <<http://www.maratua.com.br/empresa.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

MARTINEZ, Marina. **Coloração de Gram**. 2010. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/bioquimica/coloracao-de-gram>> Acesso em: 30 mar. 2014.

MARQUEZI, Marina C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água.** 2010. 111p. Dissertação (Pós Graduação) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, Piracicaba, 2010.

N3PO, Imagens. **Borbulhando água mineral da nascente.** 2014. Disponível em: <<http://imagens.n3po.com/Fotos/Borbulhando-agua-mineral-da-nascente.jpg.html>>. Acesso em: 25jul. 2014.

PELCZAR, Jr. M. J.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações.** 2ª ed. São Paulo: Editora Afiliada, 1996.

PURIFICATION, 3M. **Água envasada.** 2010. Disponível em: <<http://www.3m.com/intl/br/3mpurification/alibebi.html#>>. Acesso em: 27 jun.2014.

RODRIGUES, Bianca C. R. **Identificação de micro-organismos por meio de cultivo e observação de fungos e bactérias.** 2010. Disponível em: <[www.brasilecola.com](http://www.brasilecola.com)> Acesso em: 5 out. 2013.

RODRÍGUEZ, G. **Coliformes Totales.** 2013. Disponível em: <<http://ceteme.blogspot.com.br/2014/01/dime-con-quien-andas.html>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

SANCHEZ, P. S. **Atualização em técnicas para o controle microbiológico de águas minerais,** São Paulo: Mackenzie, 1999.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Panorama do mercado de água mineral.** 2013. Disponível em <<http://www.sebraemercados.com.br/panorama-do-mercado-de-agua-mineral/>> Acesso em 30 jun. 2014.

SIMEÃO, Eliane Aparecida. **ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA MINERAL CONSUMIDA NA FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DO MUNICÍPIO DE ASSIS.** 2011. 62p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto de Ensino Superior de Assis – IMESA.

SUBSOLO, Produtos e Serviços. **Reservatório Inox.** 2014. Disponível em: <<http://subsoloproductos.com.br/site/?p=200>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

**WISNIEWSKI, G. Utilização de Materiais de Baixo Custo no Ensino de Química Conjugados aos Recursos Locais Disponíveis.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Campos de Florianópolis – SC, 1990.

# ANEXO

## ANEXO I

### Anexo 1 - Prática Laboratorial de Química

#### Prática Laboratorial de Química

Análise microbiológica em água por meio de cultura e observação de crescimento de fungos e bactérias.

Nome: \_\_\_\_\_ Série: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

#### Objetivo

Preparar meio de cultivo com os nutrientes do caldo de batata, utilizando repolho roxo no meio de cultivo como indicador de pH.

#### Materiais

1 colher de açúcar;

½ colher de chá de sal de cozinha (cloreto de sódio);

3 pacotes de gelatina em pó incolor;

14 placas de Petri;

Colheres de sopa e de café;

Panela de pressão;

Fogareiro;

1 batata;

Água destilada;

Repolho roxo

## Procedimento

### Preparo do caldo nutriente:

1. Em uma panela bem lavada, cozinhar uma batata em pedaços e um prato de sobremesa de repolho roxo desfolhado em 400 mL de água durante 10 minutos.
2. Reservar o líquido (que será usado como meio de cultivo) tampado para evitar contaminação, ao lado de um fogareiro.

### Preparo do meio de cultivo:

1. Mantendo o caldo nutriente ao lado do fogareiro, preparar um meio de cultivo com 300 mL desse caldo, acrescentando uma colher de chá de açúcar, meia colher de café de sal e 3 envelopes de gelatina incolor;
2. Misturar a gelatina com o caldo ainda quente até que ela seja totalmente dissolvida. Não ferver a gelatina para que ela não perca a sua propriedade de gelificação.
3. Esperar esfriar por alguns minutos;
4. Colocar o meio de cultivo em placas de Petri esterilizadas para formar uma superfície para semeadura;

Para a esterilização das placas, lave-as previamente e, após a secagem, passe álcool na superfície interna, deixe-o evaporar e coloque o meio de cultivo (caldo).

5. Tampar as placas;

Após a gelificação, o meio deve apresentar coloração lilás e aspecto turvo;

6. Manter os meios protegidos da luz direta.

## Experimento

Realizar a coleta de água de diferentes pontos da escola (mineral, torneira, bebedouro e água suja – mistura de água com terra);

Transferir 0,1 mL de cada amostra nas placas de Petri em duplicata;

Deixar numa estufa de 25°C ou em uma caixa de isopor bem fechada por 5 dias;

Após esse período, observar as placas, analisando em quais ocorreram o crescimento de microrganismos.

### Questões

1. Por que meios de cultivo propiciam o crescimento de micro-organismos? Qual o papel da batata no meio?
2. Por que devemos esterilizar a placa de Petri antes de colocar o meio e fazer o procedimento de preparo ao lado do fogareiro?
3. Em quais placas o crescimento de fungos e bactérias foi mais acentuado? Por quê?

## ANEXO II

Número Mais Provável, (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 10 porções de 10 mL de amostra por tubo (AMERICAN PUBLIC HEALTH OF WATER AND WASTEWATER. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1985).

Números de tubos positivos	NMP/100 mL	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Máximo	Mínimo
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	59,5
10	> 23,0	13,5	Infinito