

**SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO**

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE ÁGUA MINERAL**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2009

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE ÁGUA MINERAL**

SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro  
2009

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE ÁGUA MINERAL**

SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada:

\_\_\_\_\_ (UFF)  
Dr. Celio Mauro Viana

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Dra. Paola Cardarelli Leite

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

Orientador: Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardo, Samara Pinto Custódio

Avaliação da Suscetibilidade a Antimicrobianos e Formação de Biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de Água Mineral. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xv, 46 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientador: Víctor Augustus Marin.

1. Água Mineral. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Vigilância Sanitária. I. Título.

Evaluation of Susceptibility to Antimicrobial and Formation of Biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated of Mineral Water.

A Deus toda honra e toda glória.

“Bom têm sido Deus,  
Bom têm sido Deus,  
Deus é Bom!  
Sua bondade me alcançou,  
Seu amor me resgatou,  
Sua graça me salvou,  
Deus é bom!  
Por isso cantarei,  
e sempre louvarei,  
e nunca esquecerei,  
Deus é bom!”

Marcos Witt

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo seu infinito amor e graça que me fez perseverar e concluir mais esta etapa.

Ao meu marido, Tarcisio, sempre presente em todos os momentos mais importantes da minha vida. Obrigada pelo seu amor, companheirismo e paciência.

Aos meus pais, meu irmão e familiares pelo carinho, amor e apoio incondicional.

Aos Professores Dr. João Tótortora, Dr<sup>a</sup> Silvia Couto e Dr<sup>a</sup> Haydée Serrão Lanzillotti pelo incentivo e apoio.

A minha amiga Érica pelo seu companheirismo e amizade.

As minhas amigas Kelly e Andréia por estarmos juntas em mais um momento especial de nossas vidas.

A Carla Rosas, Marcelo Brandão, Valéria Medeiros, Márcia Warnken, Aline Souza e Silvia Bricio do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DM) pela ajuda, carinho, amizade, disponibilidade do laboratório e pelos conhecimentos que foram transmitidos. O amor, o apoio e a amizade de vocês são inestimáveis.

Ao meu orientador Victor Augustus Marin pela atenção e paciência.

A Dr<sup>a</sup> Verônica Viana Vieira do Laboratório de Identificação Bacteriana (DM) pela ajuda e disponibilidade do laboratório.

A Marília Nishikawa do Laboratório de Micologia (DM) pelo carinho, amizade e disponibilidade do laboratório.

Aos setores de Preparação de Meios de Cultura e de Esterilização de Vidrarias pela disponibilidade e apoio.

A toda equipe da Secretaria e da Coordenação de Pós-Graduação.

A todos os funcionários do INCQS que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Existe a percepção de que o consumo de água mineral natural representa um estilo saudável de vida e que estes produtos são relativamente seguros. Nessas águas podem ser encontrados microrganismos da flora microbiana autóctone, e possíveis contaminantes que penetram no produto durante o seu processamento. A Legislação Brasileira (RDC nº 275, de 22/09/2005 – ANVISA) estabelece padrões microbiológicos para as águas minerais naturais e águas naturais, tendo como microrganismos indicadores de contaminação em águas minerais: coliformes totais, coliformes fecais e/ou *Escherichia coli*, Clostrídios sulfito redutores, *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista conhecida por causar infecções, particularmente em doentes que estão gravemente imunocomprometidos. Uma característica especial da *P. aeruginosa* é a sua capacidade de crescer na água, uma fonte de poucos nutrientes. Este trabalho teve como objetivo ressaltar a importância para a vigilância sanitária da utilização da *P. aeruginosa* como um indicador de contaminação microbiana em águas minerais. Através das técnicas dos tubos múltiplos e da membrana filtrante foram analisadas um total de 200 embalagens de água mineral, sendo 100 galões de 20 litros, 50 garrafas de 0.5 litros e 50 garrafas de 1.5 litros. Segundo a legislação vigente as embalagens de galões de 20 L apresentaram resultados insatisfatórios em 40% das amostras, as embalagens de 1.5 L apresentaram resultado insatisfatório em 2% das amostras e as embalagens de 0.5 L apresentaram resultado satisfatório, pois não foi observada contaminação por *P. aeruginosa*. Quanto ao teste de suscetibilidade, os isolados se mostraram sensíveis aos antibióticos testados. Foi observado que a *P. aeruginosa* é uma forte produtora de biofilme, com 52,9% dos isolados classificados como fortemente aderentes. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de um melhor sistema de vigilância higiênico-sanitária nas indústrias de águas minerais, objetivando eliminar a bactéria, o biofilme, e falhas de contaminação que possam concentrar a *P. aeruginosa*.

Palavras chave: água mineral, *Pseudomonas aeruginosa*, vigilância sanitária.

## ABSTRACT

There is a perception that the consumption of natural mineral water is a healthy style of life and that these products are relatively safe. In these waters can be found in microbial flora autochthonous microorganisms and possible contaminants that penetrate the product during its processing. The Brazilian Law (RDC nº 275, de 22/09/2005 – ANVISA) sets standards for microbiological natural mineral waters and natural waters. Since microorganisms as indicators of contamination in mineral water: total coliform, fecal coliform and / or *Escherichia coli*, sulphite reducing clostridium, *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The *P. aeruginosa* is an opportunistic bacteria known to cause infections especially in patients who are severely immunocompromised. A special feature of *P. aeruginosa* is its ability to grow in water, source of a few nutrients. This study aimed to highlight the importance for the health monitoring of the use of *P. aeruginosa* as an indicator of microbial contamination in mineral water. Through the multiple-tube technique and membrane filter technique were analyzed a total of 200 containers of mineral water, which were 100 gallons of 20 liters, 50 bottles of 0.5 liters and 50 bottles of 1.5 liters. The packaging of gallons of 20L showed unsatisfactory results in 40% of the samples, the packaging of 1.5 L also had a poor result in 2% of the samples by the existing legislation and the packing of 0.5 L had a satisfactory result in all the samples tested; all isolates were sensitive to all antibiotics tested. It was observed that *P. aeruginosa* is a strong producer of biofilm, with 52,9% of isolates classified as highly compliant. The results demonstrate the need for a better system of hygienic-sanitary surveillance the industries of mineral water, to eliminate the bacteria, the biofilm, and failures of contamination that can concentrate the *P. aeruginosa*.

Key words: mineral water, *Pseudomonas aeruginosa*, health surveillance.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABINAM – Associação Brasileira das Indústrias de Águas Minerais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA – American Public Health Association

CDC – Centers of Disease Control and Prevention

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral do Ministério de Minas e Energia

FDA - Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

M-PA - Meio *Pseudomonas aeruginosa*

MS – Ministério da Saúde

NMP – Número Mais Provável

NNIS - Nacional Nosocomial Infections Surveillance

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PNDU – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

SISAGUA - Sistema de Informação de Vigilância e Controle da Qualidade da Água de Consumo Humano

UFC/g – Unidades Formadoras de Colônias por grama

x

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

UV – Luz Ultravioleta

WHO – World Health Organization

**LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS**

Figura 1 – Fatores de Virulência da <i>P. aeruginosa</i> .....	11
Figura 2 – Formação de Biofilme.....	12
Figura 3 – Isolamento de <i>P. aeruginosa</i> em Agar M-PA.....	24
Figura 4 – Teste Presuntivo em caldo asparagina.....	25
Figura 5 – Halos de Inibição formados no antibiograma.....	34
Figura 6 – Microplacas de poliestireno inoculadas com as amostras e cristal violeta para visualizar a aderência.....	36

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

Quadro 1 – Características Microbiológicas para Água Mineral Natural.....	6
Quadro 2 – Doenças Infecciosas Relacionadas a Água.....	9
Tabela 1 – Amostras de Águas Minerais de 0.5L e 1.5L.....	22
Tabela 2 – Amostras de Águas Minerais de Galões de 20L.....	23
Tabela 3 – Isolamento de <i>P. aeruginosa</i> em Águas Minerais provenientes de garrafas de 0.5L, 1.5L e 20L.....	29
Tabela 4 – Percentual dos Métodos utilizados no isolamento de <i>P. aeruginosa</i> em Águas Minerais provenientes de garrafas de 0.5L, 1.5L e 20L.....	30
Tabela 5 - Ocorrência de <i>P. aeruginosa</i> nas amostras de Água Mineral de 1.5L e 20 L .....	31
Tabela 6 - Características bioquímicas dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> das amostras de Água mineral.....	33
Tabela 7 – Classificação das <i>P. aeruginosa</i> isoladas de Águas Minerais quanto a produção de biofilme.....	35

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A REALIDADE DA ÁGUA.....	2
1.2 QUALIDADE DA ÁGUA E ÁGUA MINERAL.....	3
1.3 ÁGUA MINERAL E A TRANSMISSÃO DE DOENÇAS.....	8
1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
1.5 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>P. aeruginosa</i> .....	13
1.6 A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	14
1.7 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	16
II. OBJETIVOS .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 AMOSTRAS.....	21
3.2 ISOLAMENTO.....	24
3.2.1 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE.....	24
3.2.2 TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS.....	25
3.3 PROVAS BIOQUÍMICAS.....	25
3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	26
3.4.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	26
3.5 TESTE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	26
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 ISOLAMENTO.....	29
4.2 PROVAS BIOQUÍMICAS.....	32

4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	33
4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES.....	34
V. CONCLUSÕES.....	37
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
VII. ANEXOS.....	47



## I. INTRODUÇÃO

## 1.1 A REALIDADE DA ÁGUA

De toda água existente no mundo, 97,5% é salgada e encontra-se nos oceanos e mares. Os restantes 2,5% correspondem a águas doces, aquelas que possuem sais minerais dissolvidos em quantidades insuficientes para apresentar sabor amargo (VAITSMAN & VAITSMAN, 2005).

Sendo um bem essencial, indispensável à vida, a água deve, em princípio, ser servida a cada pessoa indistintamente. O que se observa, no entanto, é que a apropriação da água é feita de forma diferenciada de uma sociedade para outra, como também entre os membros de uma mesma sociedade. Por isso, desigualdades na distribuição da água potável podem constituir em situações de injustiça que vão refletir negativamente na qualidade de vida das pessoas e populações humanas (PONTES & SCHRAMM, 2004). Estudiosos prevêem que em breve a água será uma das principais causas de conflitos entre nações, e há sinais dessa tensão em áreas do planeta como no Oriente Médio e na África. Mesmo os brasileiros, que sempre se consideraram dotados de fontes inesgotáveis, vêem algumas de suas cidades sofrerem por falta de água. (CAMPANILI & RICARDO, 2005).

O Brasil possui grandes reservas hidrográficas, com aproximadamente 14% da água doce do planeta, e mesmo assim seus grandes centros urbanos já apresentam déficit de abastecimento captando água em áreas cada vez mais distantes, com reflexos diretos no aumento de custos e na complexidade do tratamento químico (VAISTMAN & VAISTMAN, 2005). Na última década, a quantidade de água distribuída aos brasileiros cresceu 30%, mas quase dobrou a proporção de água sem tratamento (de 3,9% para 7,2%), e o que é ainda mais assustador é o fato de 45% de toda a água ofertada pelos sistemas públicos ser desperdiçada (CAMPANILI & RICARDO, 2005).

Embora o Brasil seja o primeiro país em disponibilidade hídrica em rios do mundo, a poluição e o uso inadequado comprometem esse recurso em várias regiões. Assim, parte da água no Brasil já perdeu a característica de recurso natural renovável (principalmente nas áreas densamente povoadas), em razão de processos de urbanização, industrialização e produção agrícola que são incentivados, mas pouco estruturados em termos de preservação ambiental e da água (CAMPANILI & RICARDO, 2005).

Hoje, cerca de 1,1 milhões de pessoas dos países em desenvolvimento têm acesso à água de forma inadequada e 2,6 milhões não dispõem de saneamento básico.

(PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO, 2006).

A escassez da água é uma cruel realidade que afeta bilhões de pessoas em muitas partes do mundo. O crescimento da competição por água criou um aumento do conflito na demanda global (STOCKHOLM INTERNATIONAL WATER INSTITUTE & INTERNATIONAL WATER MANAGEMENT INSTITUTE, 2004). Segundo estudiosos da questão da água potável, até o ano 2025 o mundo terá 2,6 bilhões de pessoas a mais do que tem hoje e a demanda por água excederá a disponibilidade em 56% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS, 2002).

O cenário de escassez se deve não apenas à irregularidade na distribuição da água e ao aumento das demandas, o que muitas vezes pode gerar conflitos de uso, mas também ao fato de que nos últimos 50 anos a degradação da qualidade da água aumentou em níveis alarmantes. Grandes centros urbanos, industriais e áreas de desenvolvimento agrícola com amplo uso de adubos químicos e agrotóxicos já enfrentam a falta de qualidade da água, o que pode gerar graves problemas de saúde pública (CAMPINILI & RICARDO, 2005).

Entende-se que as necessidades de saúde da população são mais amplas do que as que são oferecidas pela cobertura dos serviços de saúde. Sua dimensão pode ser estimada quando se examinam, por exemplo, a precariedade do sistema de água e dos esgotos sanitários e industriais, o uso abusivo de defensivos agrícolas, a inadequação das soluções utilizadas para o destino do lixo, a ausência ou insuficiência de medidas de proteção contra enchentes, a erosão e a falta de proteção dos mananciais, e os níveis de poluição e contaminação hídrica, da atmosfera, do solo, do subsolo e alimentar (MORAES & JORDÃO, 2002).

## **1.2 QUALIDADE DA ÁGUA E DA ÁGUA MINERAL**

O propósito primário para a exigência da qualidade da água é a proteção à saúde pública. Os critérios adotados para assegurar essa qualidade têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que, se apropriadamente implementadas junto à população, garantirão a segurança do fornecimento de água através da eliminação ou da redução mínima de constituintes na água conhecidos por serem perigosos à saúde (D'AGUILA et al., 2000).

Os problemas decorrentes de tal situação se refletem na persistência de

enfermidades que poderiam ser prevenidas, caso houvesse um suprimento adequado de água de boa qualidade, condição indispensável para uma qualidade de vida razoável (PONTES & SCHRAMM, 2004). Os esgotos e excrementos humanos são causas importantes dessa deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento, além de conterem misturas tóxicas, como pesticidas, metais pesados, produtos industriais e uma variedade de outras substâncias (MORAES & JORDÃO, 2002).

Os grandes centros e a poluição crescente dos mananciais trouxeram consigo a necessidade do tratamento da água para consumo humano e, em contrapartida, um mercado em constante expansão de água mineral usada como bebida ou complemento alimentar (MARTINS et al., 2002). A preocupação com a qualidade da água de rede pública e, principalmente, a busca do bem-estar proporcionado pelos sais minerais naturais provocou nos últimos anos uma contínua demanda por água mineral, em todos os países (SILVEIRA et al., 2006).

A água mineral é um produto, que vem merecendo maior e especial atenção da sociedade, não só pelo reconhecimento de sua qualidade, mas por se constituir opção ao uso de água natural com a vantagem de poder ser consumida sem qualquer tratamento químico e por seus reconhecidos benefícios à saúde humana (VAITSMAN & VAITSMAN, 2005).

A exploração de água mineral ou potável de mesa no Brasil é regulamentada pelo Departamento Nacional de Produção Mineral do Ministério de Minas e Energia (DNPM). A definição, bem como o controle da potabilidade é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS).

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 e conhecido como "Código das Águas Minerais", em vigor até hoje, com algumas alterações (RAMIRES, 2004). De acordo com esse código águas minerais são definidas como aquelas provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas que possuam composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns, com características que lhes confirmam uma ação medicamentosa (DNPM, 1945).

A Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005 define água mineral natural

como a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando as flutuações naturais (BRASIL, 2005).

A água mineral natural deve apresentar qualidade que garanta ausência de perigo à saúde do consumidor, e ser captada, processada e envasada obedecendo às condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação. As operações de captação, adição, elevação mecânica, armazenamento, filtração, envase, adição de CO<sub>2</sub>, transporte e manuseio não devem alterar a composição original (CARDOSO et al., 2003). A Resolução RDC nº 173 de 13 de setembro de 2006 define os procedimentos de Boas Práticas para industrialização e comercialização de água mineral natural ou de água natural envasada destinada ao consumo humano a fim de garantir sua condição higiênico-sanitária (BRASIL, 2006).

As águas minerais, quando atravessam uma superfície de rocha e terra para alcançar determinado nível, perdem grande parte das bactérias e da matéria orgânica em suspensão. Contudo, águas minerais não são estéreis e apresentam microrganismos que lhe são próprios, conhecidos como autóctones, os quais existem antes de qualquer tratamento ou processamento (SABIONI & SILVA, 2006). Pertencem a esse grupo, as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, e *Bacillus*. Porém a maior preocupação é com a possível e ocasional presença de patógenos, como: *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, vírus entéricos, protozoários e patógenos oportunistas (SANT'ANA et al., 2003). Outro tipo de microbiota bacteriana que a água mineral pode conter são as chamadas bactérias alóctones, que contaminam o produto durante as etapas anteriores ao engarrafamento, durante o processamento ou são oriundas do ambiente. (SABIONI & SILVA, 2006). A microbiota alóctone inclui uma grande variedade de bactérias saprófitas, bem como patógenos humanos (COELHO et al., 1998).

Quadro 1 – Características Microbiológicas para Água Mineral Natural

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

UFC – unidade formadora de colônias; NMP – número mais provável; n - número de unidades de amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente, c - número de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores "m" e "M", m - limite inferior mínimo aceitável, corresponde ao valor que separa uma qualidade satisfatória de uma qualidade marginal, sendo desejáveis valores abaixo do limite "m", M - limite superior máximo aceitável e conseqüentemente valores acima de "M" não são aceitos. Fonte: RDC nº275, 22 de Setembro de 2005.

A Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, regulamenta os padrões de identidade e qualidade da água mineral natural, tendo como microrganismos indicadores de contaminação em águas minerais os coliformes totais, coliformes fecais e/ ou *Escherichia coli*, clostrídios sulfito redutores, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* (Quadro 1). A contagem de bactérias heterotróficas também deve ser feita com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias do sistema industrial (BRASIL, 2005).

O consumo de águas engarrafadas tem aumentado significativamente durante a última década, com uma taxa de crescimento anual de 25% na América do Norte. A Federação Européia de Água Engarrafada estima que o consumo na União Européia durante o ano de 2003 foi de 45L (excluindo garrafas > 10L) per capita. Águas

engarrafadas não-carbonatadas tornaram-se mais populares do que as águas carbonatadas, sendo um substituto para a água de torneira em muitos lares (KOKKINAKIS et al., 2008).

No Brasil, o alto consumo de água mineral deve-se à queda de preços provocada pelo aumento da oferta e pela maior preferência do consumidor por um produto naturalmente puro e saudável (SILVEIRA et al., 2006).

Nacionalmente, a expansão do setor é significativa, com a produção de 5,8 bilhões de litros do produto em 2002, de acordo com uma estimativa preliminar do DNPM, o que torna o País como o sexto maior produtor mundial de água mineral. Conforme estas estatísticas, os principais produtores são o México com 15,46 bilhões de litros, os Estados Unidos com 11,52 bilhões de litros, a Itália com 8,75 bilhões de litros, a Alemanha com 8 bilhões de litros e a França com 6,5 bilhões de litros. Considerando todo o tipo de água envasada, os norte-americanos apresentam um consumo médio anual de aproximadamente 20 bilhões de litros, o que caracteriza o país como um forte importador do artigo (SILVEIRA et al., 2006). Este mercado está em crescimento, condicionado pela insatisfação da população com a água dos sistemas públicos de abastecimento e pela proliferação de redes de distribuição que popularizam a utilização dos garrafões de 20 litros (CARDOSO et al., 2003).

Com taxas anuais crescentes, o consumo per capita de águas minerais no Brasil está em torno de 30 litros, como informa a Associação Brasileira das Indústrias de Águas Minerais (ABINAM). O segmento de maior crescimento e consumo continua sendo o de garrafão de 20 litros, que domina 57% do mercado de águas envasadas. Presente de forma consolidada em escritórios, empresas e locais públicos, esse tipo de artigo engarrafado também apresenta uma preferência cada vez maior em residências. Mesmo assim, comparado com índices de outros países, o consumo anual per capita brasileiro é baixo. Em países como a Itália, o México e a França, os índices variam de 120 a 150 litros. Em um nível intermediário, em torno de 100 litros per capita/anuais, encontram-se mercados como a Alemanha, a Suíça e a Espanha. Em uma faixa entre 70 e 80 litros per capita/ano estão os Estados Unidos, Portugal e a Áustria (SILVEIRA et al., 2006).

Existe a percepção de que o consumo de água mineral natural representa um estilo saudável de vida e que estes produtos são relativamente seguros. Entretanto, as

ocorrências de distúrbios gastrintestinais seguidas ao consumo destas águas têm focado atenção ao estudo de sua microbiologia (SANT'ANA et al., 2003). Os galões retornáveis são possíveis fontes de contaminação do produto quando a sua inspeção, limpeza e desinfecção são negligenciadas. Alguns controles podem ser adotados visando reduzir a possibilidade de contaminação da água pelos galões, como: avaliação individual das embalagens retornáveis e rejeição daquelas com defeitos que comprometeriam a qualidade ou segurança do produto, desinfecção das embalagens e tampas e cuidados no transporte e armazenamento das embalagens (SABIONI & SILVA, 2006).

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), é permitida a presença de qualquer tipo de coliforme em 1 entre 10 garrafas quando testadas pela técnica da membrana filtrante. Já as regulamentações européias são consideravelmente mais rigorosas e exigem à ausência de *Escherichia coli*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* fecais em 250 mL de amostra de água analisada, e os microrganismos sulfitos-redutores, formadores de endosporos não anaeróbios podem estar presentes nas amostras de 50 mL de água. Além disso, de acordo com as regulamentações européias, não pode ser utilizado qualquer tipo de desinfecção para a remoção dos microrganismos em água mineral. Isto significa que a água deve ser de uma fonte protegida e autêntica, e que a empresa deve aderir às rigorosas regulamentações qualitativas e quantitativas (ROSENBERG, 2003).

### **1.3 ÁGUA MINERAL E A TRANSMISSÃO DE DOENÇAS**

A transmissão de doenças pela água ainda é um assunto de grande preocupação, apesar dos esforços mundiais e das modernas tecnologias que vêm sendo utilizados para a produção de água potável segura. Este problema não se limita aos países em desenvolvimento onde o tratamento de água poderia não existir ou ser insuficiente (SILVA et al., 2008).

Estima-se que 80% de todas as moléstias e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento sejam causados pelo consumo de água contaminada, e, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa se perde devido a doenças relacionadas à água (MORAES & JORDÃO, 2002).

A qualidade da água, por si só, tem uma grande influência sobre a saúde. Se não for adequada, pode causar doenças e sérias epidemias (Quadro 2). Os riscos à saúde, associados à água, podem ser de curto prazo (quando resultam da poluição de água causada por elementos microbiológicos ou químicos), de médio, e de longo prazo (quando resultam do consumo regular e contínuo, durante meses ou anos, de água contaminada com produtos químicos, como certos metais ou pesticidas) (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2001).

Quadro 2 - Doenças Infecciosas Relacionadas a Água

<b>Diretamente pela água (ingestão de água contaminada)</b>	<b>Falta de limpeza e de higiene utilizando água</b>	<b>Parasitas encontrados em organismos que vivem na água ou por insetos vetores com ciclo de vida na água</b>
<p>Cólera Febre Tifóide Amebíase Leptospirose Giardíase Hepatite infecciosa Diarréia aguda</p>	<p>Escabiose Pediculose (piolho) Tracoma Conjuntivite bacteriana aguda Salmonelose Tricuríase Enterobiase Ancilostomiase Ascaridíase</p>	<p>Esquistossomose Dengue Malária Febre amarela Filarioses Onconcercoses</p>

Fonte: OPAS, 2001

A World Health Organization (WHO) estima que 88% de todos os casos de diarréia são ocasionados por água, saneamento e higiene. Cerca de 94% de todos os casos de diarréia em todo o mundo são relacionadas ao ambiente, resultando em mais de 1,5 milhões de mortes anualmente, principalmente em crianças (WHO, 2006b).

A necessidade de uma maior ingestão de água aumenta em todas as condições patológicas onde ocorre uma maior perda hídrica, como nos quadros de diarréia, vômito, hiperpirexia, suor abundante (PETRACCIA et al., 2006). A água engarrafada é freqüentemente recomendada para pacientes com deficiências no sistema imune

(ROSENBERG, 2003).

*P. aeruginosa* têm um efeito sinérgico sobre a sobrevivência de alguns microrganismos patogênicos como as salmonelas, permitindo-lhes sobreviver por mais de 140 dias em água destilada (NSANZE & BARBARINDE, 1999). Segundo EDBERG e colaboradores (2004), a colonização do sistema gastrointestinal diretamente da água para beber é um evento raro.

#### **1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* é uma bactéria onipresente no meio ambiente (LECLERC & MOREAU, 2002). Pode ser encontrada no solo, água e água de esgoto, podendo se multiplicar na água do ambiente e também na superfície em contato com a água (WHO, 2006a). É também encontrada em ambiente hospitalar em reservatórios úmidos, como alimentos, flores cortadas, pias, sanitários, esfregões para piso, equipamento de tratamento respiratório e diálise e até mesmo em soluções desinfetantes (MENEZES et al., 2004).

*P. aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae, apresenta-se como bacilo gram-negativo, aeróbio, móvel através de um flagelo polar (WHO, 2006a), oxida a glicose e a xilose, assimila o citrato no meio de Simmons. É indofenol oxidase, L-arginina dihidrolase e catalase positivas e L- lisina L- ornitina descarboxilases negativas. Produz um pigmento fenazínico azul solúvel em água, não fluorescente chamado piocianina. Algumas cepas produzem ainda um pigmento amarelado, a pioverdina, um pigmento vermelho, a piorrubina, ou preto, a piomelanina. A combinação do pigmento piocianina com o pioverdina confere uma coloração esverdeada, associada à maioria das cepas de *P. aeruginosa*. (ROMÃO, 2005; MURRAY, 2003).

Uma característica especial da *P. aeruginosa* é a sua capacidade de se desenvolver na água, fonte de poucos nutrientes. Além de ser a causa primária da doença, *P. aeruginosa* é freqüentemente monitorizada como um indicador de outras contaminações bacterianas, como as de origem fecal (SILVA et al., 2008).

A *P. aeruginosa* é um microrganismo aeróbio obrigatório que em muitos meios de cultura, produz um odor adocicado ou semelhante ao de uva. Algumas cepas hemolisam o sangue. (JAWETZ, 2005). Produz fatores associados à virulência e patogenicidade, como por exemplo, as fímbrias ou pili, as proteases extracelulares

(elastase, protease alcalina, hemolisinas), as toxinas extracelulares (exotoxinas A e S), a endotoxina (lipopolissacarídeo), pirocianina e derivados, cápsula polissacarídica (exopolissacarídeo mucóide) (Figura 1) (ROMÃO, 2005).

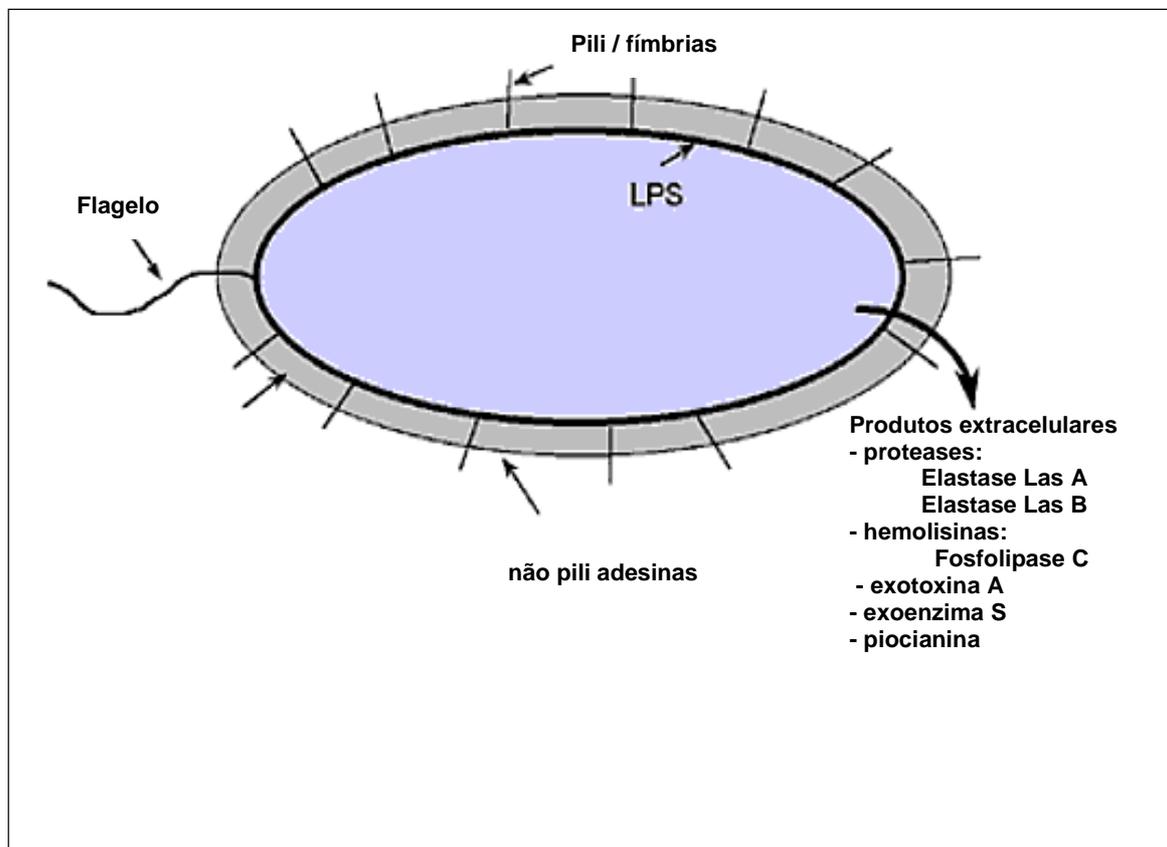


Figura 1: Fatores de Virulência da *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Adaptado de [//www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelG.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelG.htm)

A aderência da *P. aeruginosa* às células do hospedeiro é mediada pelas adesinas dos pili e não pili. Os pili (fímbrias) estendem-se a partir da superfície celular, sendo importantes para a ligação do microrganismo às células epiteliais do hospedeiro (JAWETZ et al., 2005 and MURRAY et al., 2003).

A *P. aeruginosa* produz uma cápsula polissacarídica (também conhecida como exopolissacarídeo mucóide, capa de alginato ou biofilme que possui múltiplas funções: ancora a bactéria às células epiteliais do hospedeiro; protege o microrganismo da fagocitose e da atividade dos antibióticos. Produz ainda a endotoxina lipopolissacarídica que é o principal antígeno da parede celular da *P. aeruginosa* (MURRAY et al., 2003).

Muitas cepas de *P. aeruginosa* produzem a exotoxina A, que bloqueia a síntese

de proteínas. A maioria das *P. aeruginosa* isoladas de infecções clínicas produzem enzimas extracelulares, incluindo elastases, proteases e hemolisinas como a fosfolipase C termolábil (JAWETZ et al., 2005).

Porém, um dos principais fatores de virulência refere-se à formação de biofilme, que são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. Os biofilmes estão envolvidos em infecções crônicas, lentas, resistentes aos tratamentos, formam-se em superfícies de tecidos naturais e implantes artificiais, o que é uma das características das infecções de válvulas cardíacas, próteses, cateteres, etc., colonizados por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* entre outras bactérias oportunistas (MACEDO, 2004; BARCAT, 2005).

A formação de biofilme toma lugar quando uma sólida superfície entra em contato com um meio líquido. Substâncias orgânicas e minerais são transportadas para a superfície e criam condições, onde nutrientes são concentrados e permitem a replicação de microrganismos presentes no meio aquático (Figura 2) (LUTTERBACH & FRANÇA, 1997).

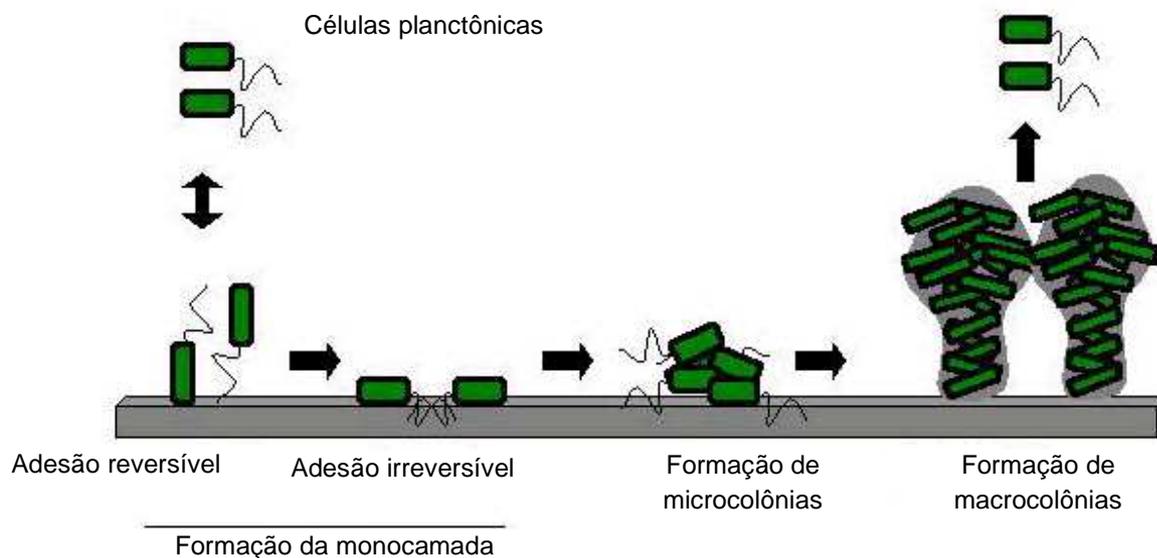


Figura 2: Formação de Biofilmes

Fonte: Adaptado de //www.dartmouth.edu/~gotoole/images/new-model.gif

No biofilme os microrganismos adquirem maior resistência à ação de agentes físicos e químicos. Também tem sido relatado que os microrganismos aderidos apresentam uma resistência maior à ação dos sanificantes (OLIVEIRA et al., 2006).

No ambiente mais natural, associações com uma superfície em uma estrutura conhecida como biofilme é o prevalente estilo de vida microbiológico. Associação com a superfície é um eficiente meio de persistir em um desfavorável microambiente, preferivelmente sendo arrastado pelo fluxo. Não apenas em ambientes naturais, mas até mesmo em hospedeiros humanos, como por exemplo, em fibrose cística pulmonar cronicamente infectada, a *P. aeruginosa* tem mostrado persistir em biofilmes. Portanto, a habilidade bacteriana para atacar superfícies úmidas, e a subsequente diferenciação em biofilmes altamente estruturados é considerado o maior fator de virulência. Nessa matriz, a bactéria está protegida de condições adversas do ambiente e de agentes antibacterianos químicos e biológicos (HÄUBLER, 2004).

### **1.5 AS INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa***

As infecções causadas por *P. aeruginosa* estão associadas a um alto padrão de mortalidade, e são difíceis de serem erradicadas do sangue ou de tecidos infectados porque esses microrganismos são virulentos e têm uma suscetibilidade limitada a antimicrobianos (LOUREIRO et al., 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista conhecido por causar infecções do trato urinário, do sistema respiratório, dermatite, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas, particularmente em doentes que estão gravemente imunocomprometidos. A cepa responsável pelo foco pode ser propagada através das mãos dos trabalhadores de saúde ou do ambiente por fontes de transmissão, tais como, água contaminada (SILVA et al., 2008).

Os pacientes tratados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a um risco maior em adquirir infecções, porque os dispositivos invasivos freqüentemente utilizados nestes pacientes criam portas de entrada para bactérias oportunistas e fungos (TRAUTMANN et al., 2005).

Pacientes com septicemia causada por *P. aeruginosa* têm taxa de mortalidade acima de 50% (MENEZES et al., 2004). Pacientes com fibrose cística e

imunocomprometidos são propensos à colonização de *P. aeruginosa*, que pode progredir para sérias e progressivas infecções pulmonares (LECLERC & MOREAU, 2004).

O risco potencial de infecção para os seres humanos relacionados com a virulência da microflora da água mineral parece ser aprimorado pela capacidade de aquisição de plasmídeos que transportam a resistência aos antibióticos e/ou atividade antibacteriana. Muitas *Pseudomonas* com esta característica possuem um elevado potencial de adaptação e são conseqüentemente as mais representadas no ambiente. Entretanto as águas minerais engarrafadas são freqüentemente recomendadas para pacientes com deficiências no sistema imune (MESSI et al., 2005).

## **1.6 A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Antibióticos e bactérias resistentes são descartados em grandes quantidades no ambiente como resultado do aumento e freqüente uso indiscriminado de antibióticos nas práticas médicas, veterinárias e agrárias. Ambientes aquáticos contaminados podem constituir uma rota de disseminação de resistência bacteriana para a comunidade (FUENTEFRIA et al., 2008). Estas bactérias podem representar um reservatório de resistência determinantes, bem como um meio para a propagação e evolução de genes de resistência e seus vetores (MESSI et al., 2005).

Águas não tratadas utilizadas para beber podem ser uma fonte para a disseminação e transferência de estirpes resistentes aos antibióticos (MESSI et al., 2005).

O efeito dos antibióticos na colonização tem sido intensivamente mais estudado em relação a *P. aeruginosa*. Isto ocorre naturalmente em espécies que resistem inicialmente a antibióticos primários como penicilina, tetraciclina e eritromicina. As *P. aeruginosa* são geralmente suscetíveis a modificações químicas desses agentes (EDBERG & ALLEN, 2004).

Os mecanismos de resistência bacteriana são complexos e variados, e ainda não são completamente conhecidos. Sabe-se que o mecanismo mais comum pelo qual os genes de resistência são transferidos é a conjugação (KONEMAN et al., 2001).

Em todo o mundo é reconhecida a crescente prevalência de bactérias resistentes

aos antimicrobianos, sobretudo das multirresistentes. A transmissão de bactérias multirresistentes ocorre através dos profissionais de saúde, tanto pelo contato direto entre um paciente e outro, como pelo contato indireto devido ao manuseio de artigos ou superfícies contaminadas. A resistência aos antimicrobianos está normalmente associada a um elemento extracromossômico ou plasmídeo, que pode ser transferido entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. Com o uso indiscriminado de antimicrobianos, tem ocorrido a seleção de microrganismos resistentes (MENEZES et al., 2004).

Os principais mecanismos de resistência microbiana aos antibióticos até então conhecidos são: inativação enzimática ou modificação do antibiótico, substituição ou modificação do alvo e acúmulo reduzido devido à diminuição da permeabilidade e/ou aumento do efluxo. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida através de mutação ou transferência de DNA. A resistência intrínseca da *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos é decorrente de uma combinação de mecanismos que envolvem permeabilidade da membrana, sistema ativo de efluxo e a inativação enzimática (ROMÃO, 2005).

O que, todavia faz da *P. aeruginosa* unicamente problemática é a combinação que se segue: as espécies intrinsecamente resistentes para muitas classes de drogas; sua habilidade para adquirir resistência via mutações, para todos os tratamentos relevantes; seus altos e crescentes padrões de localizadas resistências; e seu freqüente papel em sérias infecções (LIVERMORE, 2002).

JAWETZ (2005) afirma que as infecções clinicamente significativas tratadas com *P. aeruginosa* não devem ser tratadas com um único fármaco (monoterapia), visto que o índice de sucesso é baixo com esse tipo de tratamento e as bactérias podem desenvolver rapidamente resistência. Usa-se uma penicilina ativa contra a *P. aeruginosa* (ticarcilina, mezlocilina ou piperacilina) em combinação com um aminoglicosídeo, (geralmente, gentamicina, tobramicina ou amicacina). Outros fármacos ativos contra *P. aeruginosa* incluem aztreonam, imipeném e as quinolonas mais recentes, incluindo a ciprofloxacina. Dentre as cefalosporinas, a ceftazidima e a cefoperazona mostram-se ativas contra *P. aeruginosa*.

De acordo com MURRY e colaboradores (2003), a antibioticoterapia das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* é frustrante, porque as bactérias são

tipicamente resistentes a maioria dos antibióticos e o paciente infectado que apresenta as defesas comprometidas é incapaz de potencializar a atividade do antibiótico. Durante o tratamento, até mesmo os microrganismos suscetíveis podem se tornar resistentes pela indução da formação de enzimas que inativam os antibióticos (por exemplo,  $\beta$ -lactamases) ou pela mutação de genes que codificam as proteínas porinas da membrana externa, ou através da resistência mediada por plasmídeos a partir de um microrganismo resistente para outro sensível.

Especialmente preocupante é o aumento da resistência aos antibióticos por *P. aeruginosa* isoladas de UTIs. Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) revelam um aumento das taxas de resistência aos antibióticos comumente usados, como imipeném, ciprofloxacina, e ceftazidima em 15%, 9% e 20%, respectivamente, entre os períodos de 1998 e 2003 (TRAUTMANN et al., 2005).

O efeito dos antibióticos na colonização tem sido intensivamente mais estudado em relação a *P. aeruginosa*. Isto ocorre naturalmente em espécies que resistem inicialmente a antibióticos primários como penicilina, tetraciclina e eritromicina. As *P. aeruginosa* são geralmente suscetíveis a modificações químicas desses agentes. Como muitas bactérias ambientais, *P. aeruginosa*, encontra no homem condições subótimas; por essa razão, após a ingestão, a colonização se dá de forma passageira. Pacientes que recebem altas doses em amplo espectro de antibióticos podem ter sua flora alterada (EDBERG & ALLEN, 2004).

Tendo em vista a importância destas características biológicas no meio aquático, torna-se interessante avaliar a resistência aos antibióticos em bactérias heterotróficas oriundas da água mineral, dado o risco que essa hipotética flora autóctone pode representar para lactentes, idosos ou imunocomprometidos (MESSI et al., 2005).

## **1.7 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

A água tem influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento do ser humano (PNUD, 2006).

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, a qualidade era associada apenas a aspectos estéticos e sensoriais, tais como cor, gosto e odor. Apesar de possuir uma norma de potabilidade desde 1977, a vigilância da qualidade da água para

consumo humano só foi implementada no Brasil como um programa, a partir da criação do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde, que ocorreu em 2002. Este programa se encontra estruturado como um subsistema, e tem como uma de suas responsabilidades a coordenação de um sistema de informação de vigilância e controle da qualidade da água de consumo humano (Sisagua). As informações que vêm alimentando o banco de dados dizem respeito aos aspectos físico-químicos, químicos e microbiológicos e dados sobre a qualidade, a vazão, a população abastecida e a localização do sistema (FREITAS, 2005).

Em termos genéricos, a segurança da água consiste em assegurar que cada pessoa disponha de um acesso confiável a água, a um preço acessível para levar uma vida saudável, digna e produtiva. Quando não se verificam estas condições, ou quando o acesso à água é interrompido as pessoas confrontam-se com graves riscos de segurança humana, causados por más condições de saúde e pela ruptura dos meios de subsistência (PNUD, 2006).

A incontestável importância da água tem levado as autoridades e entidades não governamentais a proporem ações visando despertar na Sociedade globalizada a necessidade de seu gerenciamento para garantir água com qualidade para a atual e para futuras gerações (VAISTMAN & VAISTMAN, 2005).

## **II. OBJETIVOS**

## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de *P. aeruginosa* como indicador de contaminação de água mineral e verificar, entre os isolados, o perfil de resistência antimicrobiana e a capacidade de produzir biofilme.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar *P. aeruginosa* em águas minerais;
- Comparar as metodologias de filtração por membrana e número mais provável, quanto a sensibilidade na detecção de *P. aeruginosa* a partir das amostras analisadas;
- Verificar a resistência a antimicrobianos; e
- Verificar a expressão de biofilme nos isolados bacterianos.

### **III. MATERIAS E MÉTODOS**

### 3.1 AMOSTRAS

**Água mineral:** Foram estudadas 10 amostras de água mineral de 0,5 L, 10 amostras de água mineral de 1,5L, não carbonatadas de 14 marcas diferentes e 20 amostras de 20L com um total de 12 marcas diferentes. Cada amostra foi composta por 5 unidades do mesmo lote/data de envase, perfazendo o total de 200 unidades amostrais. As amostras de 0,5L e de 1,5L de capacidade foram adquiridas aleatoriamente entre os meses de Agosto de 2007 e Abril de 2008 em estabelecimentos diferentes para que fossem obtidas de lotes diversos (Tabelas 1 e 2). Os galões de 20L foram adquiridos no período de Maio a Dezembro de 2006. Essas amostras foram conduzidas ao laboratório na embalagem original e assim mantidas em temperatura ambiente até o momento da análise.

**Microrganismos:** Para o controle dos testes de tubos múltiplos, membrana filtrante, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilmes a cepa de *P. aeruginosa* INCQS nº 0099 foi utilizada como padrão. E no teste para verificar a formação de biofilmes foram utilizadas as cepas *E. coli* DH 5 $\alpha$  (INCQS 00379) como controle negativo e como controle positivo *E. coli* EAEC 042 (NATARO et al., 1987).

As amostras de *P. aeruginosa* provenientes de galões de 20L encontravam-se isoladas e estocadas pelo Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Essas amostras foram analisadas, neste estudo, quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos e à formação de biofilme.

Tabela 1. Amostras de Águas Minerais 0.5L e 1.5L

MARCAS COMERCIAIS	AMOSTRAS REPRESENTATIVAS	TOTAL DE UNIDADES (5 Unidades de cada lote)
A	3	15
B	1	5
C	3	15
D	1	5
E	1	5
F	3	15
G	1	5
H	1	5
I	1	5
J	1	5
L	1	5
M	1	5
N	1	5
O	1	5
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Tabela 2. Amostras de Águas Minerais de Galões de 20L

Marcas Comerciais	Amostras Representativas	Total de Unidades (5 Unidades de cada lote)
A <sub>20</sub>	6	30
B <sub>20</sub>	2	10
C <sub>20</sub>	1	5
D <sub>20</sub>	1	5
E <sub>20</sub>	1	5
F <sub>20</sub>	2	10
G <sub>20</sub>	1	5
H <sub>20</sub>	2	10
I <sub>20</sub>	1	5
J <sub>20</sub>	1	5
L <sub>20</sub>	1	5
M <sub>20</sub>	1	5
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Fonte: RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001

### 3.2 ISOLAMENTO

O isolamento foi feito a partir de dois métodos: Membrana Filtrante (“Filtração por Membrana”) e Tubos Múltiplos (“Número mais Provável” - NMP), descritos no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 2005).

#### 3.2.1 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE

Os meios de cultura utilizados foram Agar M-PA (Meio *Pseudomonas aeruginosa*) e Agar Milk.

**Teste presuntivo:** foram filtrados 100 mL de água mineral, divididos em 4 alíquotas de 25mL, através de membranas de acetato de celulose (Millipore), de 0,45 µm de

porosidade. As membranas foram colocadas em uma placa com Agar M-PA, de forma que não houvesse espaço entre a membrana e a superfície do ágar. As placas foram invertidas e incubadas a  $41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por 72 h e as colônias que se apresentavam planas com luz na borda exterior de cor castanha para esverdeada foram avaliadas através do contador de colônia (Bactronic, New Brunswick Scientific) (Figura 3).

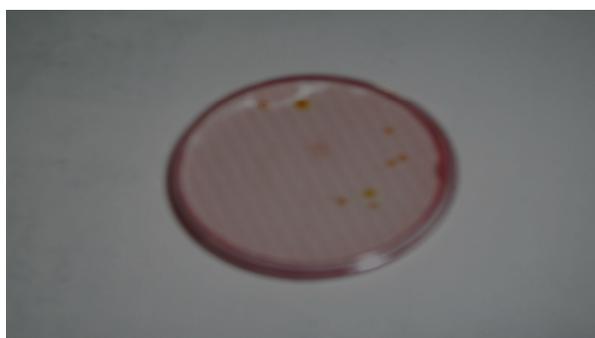
**Teste confirmatório:** foi utilizado Agar milk para confirmar o número de colônias típicas e atípicas. Foi feito uma estria de 2 a 4 cm, com o auxílio de uma alça bacteriológica, a partir de uma colônia isolada no Agar M-PA. As placas foram incubadas a  $35 \pm 1.0^\circ\text{C}$  por 24h. A *P. aeruginosa* hidrolisa caseína e produz um pigmento difuso com cor amarelada tendendo para a cor verde.

Figura 3. Isolamento em Agar MP-A

### 3.2.2 TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS

Os meios de cultura utilizados foram Caldo Asparagina e Caldo Acetamida.

**Teste presuntivo:** foram inoculadas alíquotas de 10 mL da amostra em cada um dos dez tubos contendo concentração dupla. Os tubos inoculados foram incubados em estufa à temperatura entre  $35^\circ$  a  $37^\circ\text{C}$ . Após 24 h e novamente após 48 h de incubação, os tubos foram examinados na caixa de fluorescência com lâmpada ultravioleta (Spectroline). O aparecimento de pigmento esverdeado fluorescente constituiu teste presuntivo positivo



(figura 4).

**Confirmação do teste:** a partir dos tubos que apresentaram fluorescência foram inoculados 0,1 mL da cultura dos tubos positivos em tubos com caldo acetamida. O desenvolvimento da cor púrpura após 24 a 36h de incubação a temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  é uma confirmação positiva do teste para *P. aeruginosa*.

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



Figura 4. Teste Presuntivo em Caldo Asparagina

### 3.3 PROVAS BIOQUÍMICAS

Para confirmação da *P. aeruginosa*, os isolados foram submetidos a provas bioquímicas, tais como: produção de sulfeto de hidrogênio -  $\text{H}_2\text{S}$  (TSI – “Triple Sugar Iron”); crescimento em anaerobiose; descarboxilação de aminoácidos (arginina, ornitina e lisina); hidrólise da uréia; produção de indol; mobilidade; oxidação da glicose (OF), fermentação da glicose (OF); teste da oxidase.

A execução das provas, leitura e interpretação seguiram critérios estabelecidos por Koneman e colaboradores (2001).

### 3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

#### 3.4.1 Método de difusão em ágar

O antibiograma foi realizado de acordo com as técnicas padronizadas pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2008). Foram utilizados discos

contendo os seguintes antimicrobianos: amoxicilina + ac. clavulânico (AMC) 30 µg, amicacina (AMI) 30 µg, aztreonam (ATM) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, cefepima (CPM) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, imipeném (IPM) 10 µg, meropeném (MER) 10 µg, norfloxacina (NOR) 10 µg, polimixina B (POL) 30µg, piperacilina + tazobactam (PPT) 100µg/10µg. As culturas bacterianas, crescidas a 37°C em Soja Triptona Ágar (TSA), foram ajustadas em solução salina 0,85% estéril, utilizando-se a escala 0,5 de Mc Farland (aproximadamente  $10^7 - 10^8$  UFC/mL). A suspensão foi então semeada, de forma homogênea, com o auxílio de um “swab” estéril, em placas de petri contendo aproximadamente 15 mL de Agar Muller Hinton com 4 mm de altura para garantir uma profundidade uniforme. Após a solidificação do meio, eram aplicados os discos contendo os antibióticos. Após incubação a 35°C por 18 – 24h, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos.

### **3.5 TESTE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Para a detecção de biofilme foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas de poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nuncion; Nunc InterMed). As cepas analisadas foram cultivadas em 3 mL de caldo de infusão de cérebro de boi (BHI) e incubadas sob agitação por 24 h a 37°C. Após esse período, 200 µL das culturas crescidas foram transferidos para a microplaca de poliestireno com o auxílio de micropipetas de volume de 20 – 200 µL, realizando cada uma das amostras em triplicata e incluindo um controle negativo (*E. coli* DH 5α) e um controle positivo (*E. coli* EAEC 042), incubando a microplaca sem agitação por 24 h a 37°C. Em seguida, o conteúdo da placa foi aspirado com micropipetas de volume de 20 – 200 µL, lavado três vezes com 200 µL de água destilada, e colocado na estufa por 10 minutos para secar. Para visualizar a aderência, foram aplicados 30 µL de cristal violeta 0,5% em cada poço e a placa foi deixada em repouso por 10 minutos. O conteúdo foi aspirado com micropipeta de volume de 20 – 200 µL, lavado três vezes com 200 µL água destilada, e colocado na estufa por 10 minutos para secar. Foram utilizados 200 µL de etanol absoluto 95%, para eluir o corante impregnado nas células. Foram transferidos 150 µL da solução contida em cada um dos poços da placa para outra placa limpa e seca e a densidade ótica (DO) foi determinada na segunda placa, em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550) em um comprimento de onda de 595 nm. O critério para a classificação da

produção de biofilme foi baseado nos resultados obtidos para o controle negativo (CN) (*E. coli* DH 5 $\alpha$ ). As amostras foram classificadas em quatro categorias de acordo com a média da DO obtida nas triplicatas: não aderentes (NA)  $DO \leq DO_{cn}$ , fracamente aderente (+)  $DO_{cn} < DO < 2x DO_{cn}$ , moderadamente aderente (++)  $2x DO_{cn} < DO < 4x DO_{cn}$  ou fortemente aderente (+++)  $4x DO_{cn} \leq DO$ . Cada bateria de amostras foi repetida por mais três vezes para que o resultado final fosse baseado na média das quatro dosagens (STEPANOVIC et al., 2000).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO

Na tabela 3 estão descritos os resultados das amostras referentes às embalagens de 0.5L, 1.5L e 20L. Nas embalagens de 0.5L não foi observada a presença de *P. aeruginosa*. Nas de 1.5L encontrou-se 1 amostra entre as 50 analisadas (2%) contaminada pelo microrganismo pesquisado. Com relação aos galões de 20 L

observou-se que 40 unidades das 100 analisadas (40%) encontravam-se contaminadas com *P. aeruginosa*. Do total de 200 amostras de água mineral analisadas, 41 (20,5%) apresentaram resultados insatisfatórios quanto à presença *P. aeruginosa*, o que foi superior ao encontrado por SANT'ANA et al. (2003), que ao analisar 44 amostras de água mineral nenhuma se apresentou contaminada por *P. aeruginosa*. Kokkinakis et al. (2008) analisaram 300 amostras de águas engarrafadas e não encontraram *P. aeruginosa*. NSANZE & BARBARINDE (1999) observaram que a taxa e frequência de contaminação microbiana foi maior nos garrafões de 20L quando comparada as embalagens de 1.5L, o que também foi observado em nosso estudo.

**Tabela 3. Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em Águas Minerais provenientes de garrafas de 0.5L, 1.5L e 20L**

<b>Embalagens</b>	<b>Nº de amostras (unidades)</b>	<b>Nº de amostras insatisfatórias</b>	<b>Percentual contaminado</b>
0.5 L	50	0	0%
1.5 L	50	1	2%
20 L	100	40	40%
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>41</b>	<b>20,5%</b>

No trabalho de SABIONI & SILVA (2002), para as 20 embalagens de 0.5L foram encontradas 19 amostras (95%) dentro do padrão e 1 amostra (5%) fora do padrão; para as 10 embalagens de 1.5 L analisadas 9 (90%) estavam dentro do padrão e 1 (10%) fora do padrão; e para as 20 embalagens de 20 L, 15 amostras (75%) estavam dentro do padrão e 5 amostras (25%) fora do padrão, demonstrando uma maior frequência de amostras contaminadas nas embalagens de 20L, o que foi também observado em nosso estudo.

Segundo VENIERI e colaboradores (2006), a filtração por membrana é um método considerado mais flexível para estudos qualitativos e quantitativos da água engarrafada. O que foi constatado neste trabalho é que o método da membrana filtrante

proporcionou o isolamento da *P. aeruginosa* em 2% das amostras de 1.5 L e em 21% das amostras de 20L, enquanto que o método de tubos múltiplos proporcionou o isolamento da *P. aeruginosa* em 19% das amostras de água mineral analisadas em garrafas de 20L (Tabela 4).

**Tabela 4. Percentual de isolamento de *P. aeruginosa* em águas minerais provenientes de garrafas de 0.5 L, 1.5 L e 20L com relação aos Métodos Utilizados**

Amostras		Métodos		Percentuais		Total
Embalagens	Nº de Amostras	Membrana filtrante	Tubos múltiplos	Membrana Filtrante	Tubos múltiplos	
0.5 L	50	0	0	0%	0%	0%
1.5 L	50	1	0	2%	0%	2%
20 L	100	21	19	21%	19%	40%
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>11%</b>	<b>9,5%</b>	<b>20,5%</b>

Os resultados na Tabela 5 demonstram que a *P. aeruginosa* foi encontrada em apenas uma marca comercial (N\*) das 14 analisadas provenientes de garrafas 0.5 L e 1.5 L, enquanto os galões de 20 L proporcionaram o isolamento da *P. aeruginosa* em 10 marcas comerciais do total das 12 marcas analisadas. SABIONI & SILVA (2006) avaliaram 50 amostras de águas minerais de 0.5L, 1.5L e 20L de marcas diferentes, e a *P. aeruginosa* foi encontrada em 7 amostras (14%). Segundo NUNES FILHO et al. (2008), a reutilização de garrafas de 20L com procedimentos de limpeza inadequados podem ser responsáveis pela maior frequência de contaminação microbiana das águas minerais.

A água mineral natural não é esterilizada, pasteurizada ou tratada para remover ou destruir os microorganismos. O número de bactérias detectadas na fonte é geralmente muito baixo, mas existem muitos relatos mostrando que a contagem de microorganismos viáveis aumenta consideravelmente em água parada, depois de semanas de armazenamento (VENIERI et al., 2006).

**Tabela 5: Ocorrência de *P. aeruginosa* nas amostras de Água Mineral de 1.5L e 20 L**

<b>Marcas comerciais</b>	<b>Amostras representativas</b>	<b>Isolados bacterianos analisados</b>
<b>N*</b>	N*a; N*b; N*c, N*d, N*e	N*a.1
<b>A<sub>20</sub></b>	A <sub>20</sub> a, A <sub>20</sub> b, A <sub>20</sub> c, A <sub>20</sub> d, A <sub>20</sub> e	A <sub>20</sub> a.1, A <sub>20</sub> a.2, A <sub>20</sub> a.3, A <sub>20</sub> a.4, A <sub>20</sub> a.5, A <sub>20</sub> a.6
<b>B<sub>20</sub></b>	B <sub>20</sub> a, B <sub>20</sub> b, B <sub>20</sub> c, B <sub>20</sub> d, B <sub>20</sub> e	B <sub>20</sub> a.1
<b>D<sub>20</sub></b>	D <sub>20</sub> a, D <sub>20</sub> b, D <sub>20</sub> c, D <sub>20</sub> d, D <sub>20</sub> e	D <sub>20</sub> a.1
<b>E<sub>20</sub></b>	E <sub>20</sub> a, E <sub>20</sub> b, E <sub>20</sub> c, E <sub>20</sub> d, E <sub>20</sub> e	E <sub>20</sub> a.1, E <sub>20</sub> b.2
<b>F<sub>20</sub></b>	F <sub>20</sub> a, F <sub>20</sub> b, F <sub>20</sub> c, F <sub>20</sub> d, F <sub>20</sub> e	F <sub>20</sub> a.1
<b>H<sub>20</sub></b>	H <sub>20</sub> a, H <sub>20</sub> b, H <sub>20</sub> c, H <sub>20</sub> d, H <sub>20</sub> e	H <sub>20</sub> a. 1
<b>I<sub>20</sub></b>	I <sub>20</sub> a, I <sub>20</sub> b, I <sub>20</sub> c, I <sub>20</sub> d, I <sub>20</sub> e	I <sub>20</sub> a.1
<b>J<sub>20</sub></b>	J <sub>20</sub> a, J <sub>20</sub> b, J <sub>20</sub> c, J <sub>20</sub> d, J <sub>20</sub> e	J <sub>20</sub> a. 1
<b>L<sub>20</sub></b>	L <sub>20</sub> a, L <sub>20</sub> b, L <sub>20</sub> c, L <sub>20</sub> d, L <sub>20</sub> e	L <sub>20</sub> a. 1
<b>M<sub>20</sub></b>	M <sub>20</sub> a, M <sub>20</sub> b, M <sub>20</sub> c, M <sub>20</sub> d, M <sub>20</sub> e	M <sub>20</sub> a.1

Nota: N\*corresponde à amostra de 1.5 L; A<sub>20</sub> a M<sub>20</sub>  
Correspondem as amostras de 20L.

De acordo com ROSENBERG (2003), estudos têm mostrado que bactérias geralmente ocorrem em maior número em recipientes plásticos do que em garrafas de vidro. O plástico tende a ser mais permeável ao oxigênio externo e a vapores. A liberação de nutrientes pelos plásticos também é uma possibilidade que contribui para o aumento do crescimento bacteriano. Outro fator a ser levado em consideração, é saber se a água é gaseificada (carbonatada), pois a queda do pH resultante da carbonatação

impede o crescimento bacteriano. Sendo assim, além da contaminação natural, o produto pode deteriorar-se antes de chegar ao consumidor (SILVA et al., 2008).

O rápido crescimento das bactérias após a água ser engarrafada, pode ser devido à oxigenação da água durante o processo, o aumento da superfície a partir da garrafa, o aumento da temperatura durante o armazenamento e os vestígios de nutrientes decorrentes da garrafa (VENIERI et al., 2006).

NUNES FILHO et al. (2008) explicou que as condições higiênicas adotados durante o processamento de água mineral devem ser cuidadosamente controladas, porque este produto deve atender aos elevados padrões de segurança e qualidade. WARBURTON (1993) relatou que a contaminação por *P. aeruginosa* pode degradar a cor, turbidez e sabor da água.

Segundo LECLERC & MOREAU (2002) *P. aeruginosa* pode ser monitorada em águas minerais como indicador de vulnerabilidade e/ou baixo controle de qualidade no envase da água e como um patógeno oportunista, sua quantidade deve ser limitada o quanto possível.

## **4.2 PROVAS BIOQUÍMICAS**

Todos os isolados de *P. aeruginosa* se apresentaram como bastonetes Gram negativos, móveis, metabolismo oxidativo em meio de Hugh-Leifson, produtores de pioverdina e piocianina, citrato positivos, degradam a uréia e a caseína, produtoras de sulfeto de hidrogênio e com crescimento a 42°C. Foi observada a produção de pigmento esverdeado (pioverdina) em meio de ágar Mueller-Hinton na maioria dos isolados (Tabela 6).

**Tabela. 6 Características bioquímicas dos isolados de *P. aeruginosa* das amostras de Água mineral**

<b>Provas bioquímicas e verificação de outras características</b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>
Piocianina	+
Pioverdina	+
Crescimento a 42°C	+
Hidrólise da caseína	+
Acetamida	+
Indol	-
OF glicose	+
OF glicose c/ óleo mineral	+
Motilidade	+
Citrato	+
Hidrólise da uréia	+
Produção de H <sub>2</sub> S	+

Embora todas as espécies do gênero *Pseudomonas* produzam um pigmento hidrossolúvel, a pioverdina, que aparece como uma fluorescência branca a azul-esverdeada, apenas a *P. aeruginosa*, produz o característico azul hidrossolúvel, a piocianina (KONEMAN et al., 2001).

#### **4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

Ao avaliar a resistência aos antibióticos e a atividade de bactérias heterotróficas originadas de água mineral, MESSI e colaboradores (2005) observaram que dos 120 isolados, *Pseudomonas* spp. (55,8%) foi o grupo predominante e que 55% dos isolados representaram cepas com resistência a múltiplos antibióticos onde os organismos mais resistentes pertenceram ao gênero *Pseudomonas*.

De acordo com SILVA e colaboradores (2008) muitas *Pseudomonas* que sobrevivem na água são resistentes aos agentes antimicrobianos. No entanto neste estudo, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela CLSI (2008) todos os isolados

de *P. aeruginosa* provenientes de água mineral se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos utilizados.



**Figura 5. Halos de Inibição formados no antibiograma**

A sensibilidade observada em cepas testadas pode ser explicada pela característica da célula. Todas as amostras se apresentaram na forma mucóide. DÖRING et al. (2000) enfatizou que geralmente cepas de *P. aeruginosa* não mucóides apresentam mais resistência aos antibióticos do que cepas mucóides.

#### **4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME**

A tabela 7 descreve a classificação dos isolados de *P. aeruginosa* proveniente das amostras de água mineral quanto à produção de biofilme, onde 52,9% das cepas foram classificadas como fortemente aderente ( $A_{20}$  a.1,  $A_{20}$  a.2,  $A_{20}$  a.4,  $B_{20}$  a.1,  $D_{20}$  a.1,  $J_{20}$ a.1,  $L_{20}$ a.1,  $M_{20}$  a.1 e  $N^*$ ); 41,2% das cepas isoladas como moderadamente aderente ( $A_{20}$  a.3,  $A_{20}$  a.5,  $A_{20}$  a.6,  $E_{20}$  b.2,  $F_{20}$  a.1,  $H_{20}$ a.1,  $I_{20}$  a.1) e 5,9% como fracamente aderente ( $E_{20}$  a.1).

**Tabela 7. Classificação das *P. aeruginosa* isoladas de Águas Minerais quanto a produção de biofilme**

<b>Isolados Bacterianos</b>	<b>Classificação</b>	<b>Percentual</b>
A <sub>20</sub> a.1 A <sub>20</sub> a.2 A <sub>20</sub> a.4 B <sub>20</sub> a.1 D <sub>20</sub> a.1 J <sub>20</sub> a.1 L <sub>20</sub> a.1 M <sub>20</sub> a.1 N*	Fortemente Aderente (+++)	<b>52.9% (9)</b>
<b>A<sub>20</sub> a.3 A<sub>20</sub> a.5 A<sub>20</sub> a.6</b> <b>E<sub>20</sub> b.2 F<sub>20</sub> a.1 H<sub>20</sub>a.1</b> <b>I<sub>20</sub> a.1</b>	Moderadamente Aderente (++)	<b>41.2% (7)</b>
<b>E<sub>20</sub> a.1</b>	Fracamente Aderente (+)	<b>5.9% (1)</b>
-----	Não Aderente (NA)	<b>0% (0)</b>

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* foram classificadas como grandes produtoras de biofilme, sendo este um fator de virulência de grande importância para a saúde pública (Figura 6) . BORGES et al. (2007) utilizaram a mesma metodologia e observaram que 36,25% das cepas de *P. aeruginosa* foram classificadas como fortemente aderente, 42,5% como moderadamente aderente e 21,25% como fracamente aderente, demonstrando a predisposição que estes isolados têm para formar biofilmes.

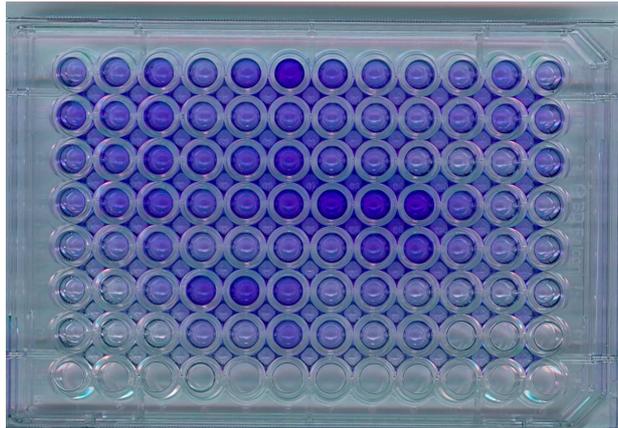


Figura 6. Microplacas de poliestireno semeadas com as amostras de água e coradas com cristal violeta para visualizar a aderência

Segundo OLIVEIRA e colaboradores (2006), a ocorrência de falhas no processo de higienização permite que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos. Os microrganismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas, permitindo o início do crescimento celular. A multiplicação permite a agregação de nutrientes e outros microrganismos, constituindo a formação dos biofilmes.

De acordo com ZANETTI e colaboradores (2009) a contaminação por *P. aeruginosa* se revelou difícil de remover, devido ao biofilme produzido por este microrganismo que é significativamente menos suscetível à ação de desinfetantes.

KOHNEN e colaboradores (2005) sugerem em seu trabalho que uma intensa e regular lavagem das garrafas reutilizáveis poderia ser uma forma de reduzir a contaminação da água gaseificada pelos biofilmes. O que também poderia ser proposto para a remoção dos mesmos nas embalagens reutilizáveis (galões de 20 L) de água mineral, sendo que os intervalos e os melhores métodos de lavagem não puderam ser obtidos a partir dos resultados do presente estudo e poderia ser um objeto de estudo para futuras investigações.

## **V. CONCLUSÕES**

- Considerando os padrões para águas minerais adotados neste trabalho, as embalagens dos galões de 20L apresentaram resultados insatisfatórios em 40% dos galões analisados. Embora a *P. aeruginosa* tenha sido isolada em apenas 1 (2%) das 50 amostras das embalagens de 1.5L, esta também apresentou um resultado insatisfatório e as amostras das embalagens de 0.5 L apresentaram-se isentas de contaminação por *P. aeruginosa*, estando dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente;
- Das metodologias utilizadas os melhores resultados foram obtidos através da técnica da membrana filtrante, quando comparada com a técnica de tubos múltiplos (NMP);
- Em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados se mostraram sensíveis aos antimicrobianos testados;
- Podemos destacar que a *P. aeruginosa* é um microrganismo com grande produção de biofilme, o que foi observado em 52,9% dos isolados classificados como fortemente aderentes. Sendo este um fator de virulência de extrema importância;
- A *P. aeruginosa* é considerada um patógeno oportunista, portanto o consumo de águas contaminadas com este microrganismo constitui risco a saúde de indivíduos imunocomprometidos e o seu consumo para este grupo de indivíduos deve ser reavaliado;
- Sendo assim os resultados obtidos demonstram a necessidade de um sistema melhor de vigilância higiênico-sanitária nas indústrias de águas minerais, objetivando eliminar a bactéria, o biofilme, e falhas de contaminação que possam concentrar a *Pseudomonas aeruginosa*.

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the examination of water and wastewater** 21<sup>th</sup> ed., p.9-33/9-34, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS. ABINAM, 2002. Disponível em: <[www.abinam.com.br/site/mercado.aso?pg=av01/05](http://www.abinam.com.br/site/mercado.aso?pg=av01/05)> Acesso em: 27out. 2006.

BARCAT, J. A. **Biofilms**. MEDICINA, v. 65, n. 4, p.369-372. Buenos Aires, 2005.

BRASIL, 2002. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 6 de 11 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para transporte, distribuição, armazenamento e comércio de Água Mineral, Água Natural, Água Potável de Mesa e Água Purificada Adicionada de Sais. **Diário Oficial do Estado**, Paraíba, JP de 12 de dezembro de 2002.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução nº 275 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução nº 173 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] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 15 de setembro de 2006.

CAMPANILI, M.; RICARDO, B. **Água – o risco da escassez. Almanaque Brasil Socioambiental.** Ed. Instituto Socioambiental, Março, 2005. Disponível em <[www.socioambiental.org/esp/agua/pgn/](http://www.socioambiental.org/esp/agua/pgn/)>. Acesso em 05 jan 2009.

CARDOSO, C.C.; VEIGA, S.M.O.M.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E.; AMARAL, L. A. **Microbiological evaluation of mineral water packing sanitizing processing with ozone.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 23, nº1. p.59-61,2003. Disponível em : <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 27 out. 2006.

COELHO, D.L.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R. **Uso do método substrato cromogênico para quantificação do número mais provável de bactérias do grupo dos coliformes em águas minerais envasadas.** Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v.16, n.1: 45-54,1998.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement.** CLSI document M 100 – S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL (DNPM). Código de Águas Minerais, Decreto-Lei Nº 7841, de 08/08/1945, **Diário Oficial da União** de 08 de Agosto de 1945.

D'AGUILA, P.S. et al. **Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu.** Cad. Saúde Pública, v. 16, n. 3, p.791-798, Set 2000. Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 mai 2007.

DORING, G. et al. **Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus.** European Respiratory Journal, 16: 749-767, 2000.

EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J. **Virulence and risk from drinking water of heterotrophic plate count bacteria in human population groups.** International Journal of Food Microbiology, v. 92,p.255 – 263, 2004.

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, vol. 10, nº4, dez, p. 993 –1004, 2005. Disponível em: <www.scielo.br>. Acesso em: 15 mai 2007.

FUNENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. ***Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 41, nº5, set - out, p.470-473, 2008.

HÄUBLER, S. **Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*.** Environmental Microbiology, vol. 6, n. 6, p. 546- 551. Fev 2004.

JAWETZ, E. **Microbiologia médica.** Editora Mc Graw-Hill Interamericana do Brasil; Capítulo 17, p.213-214, Rio de Janeiro, 2005.

KOHLEN, W.; KEISER, S. T.; MEYER, H. G.; LOOS, A. H.; PIETSCHA, M.; JANSEN, B. **Microbiological quality of carbonated drinking water produced with in-home carbonation systems.** International Journal Hygiene and Environmental Health, v. 208, p. 415–423, 2005.

KOKKINAKIS, E. N. et al. **Monitoring microbiological quality of bottled water as suggested by HACCP methodology.** Food Control, v. 19, p. 957 – 961, 2008.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** Editora Médica e Científica, 5ª edição. Rio de Janeiro. 2001.

LECLERC, H.; MOREAU, A. **Microbiological safety of natural mineral water.** FEMS Microbiology Reviews v. 26, p. 208 – 222. 2002.

LIBÂNIO, P. A. C.; CHERNICHARO, C. A. L.; NASCIMENTO, N. O. **A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública.** Eng. Sanitária e Ambiental., v 10, n. 3, p. 219 –228, Set 2005. Disponível em: <www.scielo.br>. Acesso em: 15 mai 2007.

LIVERMORE, D. M. **Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?** Antimicrobial Resistance, v. 34, p. 634 – 639, Mar 2002.

LOUREIRO, M.M; MORAES, B.A.; MENDONÇA,V.L.F.; QUADRA,M.R.R.; PINHEIRO, G.S.; ASENSI, M.D. ***Pseudomonas aeruginosa*: Study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 97, n. 3, p. 387-394. Abr 2002.

LUTTERBACH, M.T.S. and FRANÇA, F.P. de. **Biofilm Formation on Brass Coupons Exposed to Cooling Water.** Braz. J. Chem. Eng., v.14, n.1. Mar 1997. Disponível em; <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 mai 2007.

MACEDO, J. A. B. **Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica.** Revista Fármacos & Medicamentos, v.2, n. 7, p. 19 -24. Nov-Dez 2000. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br>>. Acesso em: 17 mai 2007.

MARTINS, A. M.; MANSUR, K. L.; ERTHAL, F.; MAURÍCIO, R. C.; PEREIRA FILHO, J.C. & CAETANO, L. C. **Águas Minerais do Estado do Rio de Janeiro.** DRM-RJ. Niterói, 2002. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agua/mineral/index.html&conteudo=./agua/mineral/minerais.html>>. Acesso em: 05 jan 2009.

MENEZES, E. A.; MACEDO, F. V. V.; CUNHA, F. A.; ANDRADE, M. S. S.; ROCHA, M. V. A. P. **Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram Negativos Não Fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edílson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE.** RBCA, v. 36, n. 4, p. 209 –212. 2004.

MESSI, P.; GUERRIERI, E.; BONDI, M. **Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin.** Science of the Total Environment, v. 346, p.213– 219, 2005.

MORAES, D.S.L.;JORDÃO,B.Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos**

**sobre a saúde humana.** Rev. Saúde Pública, v.36, n. 3, p. 370-374. Jun 2002.  
Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 mai 2007.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J., Jorgensen J H, et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 8th Edition, v. 1, p. 719 –725. 2003.

NATARO, J.P. et al. **Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells**. Pediatric Infectious Disease Journal, v. 6,n.9, p. 829-31, 1987.

NUNES FILHO, S. A. P. N.; SANT'ANA, A. S.; Cruz, A. G., Commercialization Conditions and Pratices Influence the Microbiological Quality of Mineral Waters. **Journal of Food Protection**, 71,(6); 1253-1257, 2008.

NSANZE, H. and BABARINDE, Z. **Microbiological Quality of Bottled Drinking Water in the UAE and the Effect of Storage at Different Temperatures**. Environment Internacional, v. 25, n.1, p. 53-57,1999.

OLIVEIRA, L. A.T. et al. **Biofilme na Indústria de Alimentos. Revisão**. Rev. Higiene Alimentar, v.. 20, n.141, p. 33 – 35, Maio/Junho 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Água e Saúde**. Maio, 2001. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/sistema/fotos/agua.PDF>>. Acesso em: 05 jan 2009.

PETRACCIA, L. et al. **Water, mineral waters and health**. Clinical Nutrition,v. 25, p. 377 – 385, 2006.

PONTES, C. A. A.; SCHRAMM, F. R. **Bioética da Proteção e Papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável**. Cad. Saúde Pública, v. 20, n.5, p. 1319 –1327. Set – Out 2004. Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 mai 2007.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD). **Além da escassez: poder, pobreza e a crise mundial da água**. Relatório de Desenvolvimento Humano. Nova Iorque, 2006. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/rdh/>>. Acesso em: 05 jan 2009.

RAMIRES, I. et al. **Avaliação da concentração de flúor e do consumo de água mineral**. Rev. Saúde Pública, v. 38, n. 3, p. 459- 465. Jun 2004. Disponível em:

<www.scielo.br>. Acesso em: 15 mai 2007.

ROMÃO, C.M.C.P.A. **Estudo de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em unidades hospitalares quanto os aspectos moleculares e de resistência aos antibióticos, anti-sépticos e desinfetantes.** Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ,2005. p.1- 9. il. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade/ Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ROSENBERG, F. A. **The Microbiology of Bottled Water.** Clinical Microbiology Newsletter, v. 25, n. 6, p. 41 – 44, Mar 2003.

SABIONI, J.G.; SILVA, I.T. **Qualidade Microbiológica de Águas Minerais comercializadas em Ouro Preto, MG.** Revista Higiene Alimentar, v. 20, n. 143, p.72-78. Ago 2006.

SANT´ANA, A . S.; SILVA, S.C.F.; FARINI, I.O.JR.; AMARAL, C.H.R. e MACEDO, V.F. **Qualidade Microbiológica de Águas Minerais.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 23, p.190 –194. Dez 2003.

SILVA, M. E. Z. et al. **Comparison of bacteriological quality of tap water an bottled mineral water.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 211, p. 504 – 509, 2008.

SILVEIRA, F. G. et al. **Gasto e consumo das famílias brasileiras contemporâneas.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, IPEA. Brasília, 2006.

STEPANOVIC, S. et al. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods, v. 40, n.2, p. 175-179, Abr 1999.

Stockholm International Water Institute (SIWI) and the International Water Management Institute (IWMI). **WATER– MORE NUTRITION PER DROP.** p.5, 2004.

TRAUTMANN, M. et al. **Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism.** Infection Control and Epidemiology, v. 33, n. 5, supplement 1, p. 41 – 49, June 2005.

VAISTMAN, D. S.; VAISTMAN, M. S. **Águas Minerais**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

VENIERI, D. et al. **Microbiological evaluation of bottled non – carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece**. International Journal of Food Microbiology, v. 107, p. 68 – 72, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION a. **Guidelines for drinking-water quality** [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3<sup>rd</sup> ed. p. 29; 50; 146; 289-290, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION b. **Preventing disease through healthy environments**. Towards an estimate of the environmental burden of disease. p. 35, 2006.

## **VII. ANEXOS**

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

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

Fonte: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998

## **ANEXO B : Definições**

Água mineral natural: água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando as flutuações naturais (BRASIL, 2006).

Água natural: água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, em níveis inferiores aos mínimos estabelecidos para água mineral natural. O conteúdo dos constituintes pode ter flutuações naturais (BRASIL, 2006).

Água Potável de Mesa: água para o consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde (BRASIL, 2002).

Captação: conjunto de operações necessárias à obtenção da água mineral natural ou da água natural, sem alteração da sua qualidade higiênico-sanitária e da sua característica natural e de pureza (BRASIL, 2006).

Desinfecção: operação de redução, por método físico e ou agente químico, do número de microrganismos em nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária da água mineral natural e da água natural (BRASIL, 2006).

Envase: operação que compreende o enchimento e a vedação com tampa da embalagem com água mineral natural ou com água natural (BRASIL, 2006).

Hiperpirexia: Febre muito alta, acima de 40°C.

## **ANEXO C : Meios de Cultura**

### **Agar M-PA (g/L)**

HCL L-lisyna	5.0g
NaCl	5.0g
Xilose	2.5g
Sacarose	1.25g
Lactose	1.25g
Vermelho de fenol	0.08g
Citrato amônico de ferro	0.8g
Tiosulfato de Sódio	6.8g
Agar	15.0g
Reagente – qualidade da água	1L

### **Ágar Mueller-Hinton (g/L)**

Infusão de carne	2.0g
Hidrolisado de caseína	17.5g
Amido	1.5g
Ágar	17.0g

### **Ágar TSA (g/L)**

Peptona de caseína	15.0g
Peptona de farelo de soja	5.0g
NaCl	5.0g
Polisorbato 80	5.0g

Lecitina	0.7g
Ágar	15.0g

### **Caldo Asparagina (g/L)**

Asparagina	3.0g
Anidro fosfato hidrogênio dipotássio - $K_2HPO_4$	1.0g
Sulfato de Magnésio	0.5g
Reagente	1.25g

### **Caldo Acetamida (g/L)**

Acetamida	10.0g
NaCl	5.0g
Anidro fosfato hidrogênio dipotássio - $K_2HPO_4$	1.39g
Anidro fosfato di-hidrogênio potássio - $KH_2PO_4$	0.73g
Sulfato de Magnésio	0.5g

### **Caldo BHI**

Infusão de cérebro de bezerro	12.5g
Infusão de coração de boi	5.0g
Proteose peptona	10.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Fosfato monoácido de sódio	2.5g
Glicose	2.0g
Água destilada	1L

