



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**

**ALINE ÁVILA MATOS**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS  
DE ÁGUA MINERAL**

**Tubarão**

**2018**

**ALINE ÁVILA MATOS**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS  
DE ÁGUA MINERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial ao grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Vinicius José Maschio, Dr.

Tubarão

2018

**ALINE ÁVILA MATOS**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS  
DE ÁGUA MINERAL**

Esta Monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 26 de novembro de 2018.

---

Prof. Vinicius José Maschio, Dr.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof. Jairo Nunes Balsini, Msc.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof. Renê Darela Blazius, Dr  
Universidade do Sul de Santa Catarina

Dedico esta monografia aos que me apoiaram e me auxiliaram no decorrer de minha trajetória. A todos que de certa forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional, dando-me suporte emocional e financeiro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, antes de tudo, pela vida, proteção e realizações.

Agradeço os meus pais pela educação que me deram, pelos conselhos não só como pais mas como amigos, e por terem me feito acreditar em meu potencial.

Ao meu orientador Vinícius José Maschio, pela oportunidade, bem como, conhecimentos transmitidos e experiências compartilhadas, assim como à banca Jairo Nunes Balsini e Renê Darela Blazius por suas sugestões e considerações que contribuíram muito para o aperfeiçoamento desta monografia.

À coordenadora do curso e também professora Maricelma Jung, pela disponibilidade de auxílio nos custos dos recursos utilizados.

À Patricia Menegaz pelas ajudas repentinas, contribuições éticas e profissionais. Expresso aqui a você minha admiração e agradecimento.

À minha família e o Eduardo Marques, que sem muito compreender o que eu fazia, me deram apoio, se dedicaram por mim mostrando-se presentes e ensinando-me a construir meus valores e princípios.

Agradeço aos meus amigos, em especial, Flávia, Felipe e Douglas pelo suporte em todos meus momentos de desespero, pelas experiências que sem dúvida vou guardar eternamente, pelos conhecimentos trocados, toda amizade e companheirismo durante anos de curso.

Aos demais colegas e familiares que me fizeram sorrir e acreditaram em mim, muito obrigada.

“Todo conhecimento está sujeito ao erro e à ilusão”

(Edgar Morin)

## 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, livre de impurezas, o que leva o aumento do envasamento e comercialização dessas águas. A falta da potabilidade da água nem sempre é perceptível à visão ou olfato, sendo necessária uma análise laboratorial para detectá-la. Torna-se importante o controle microbiológico da água devido à sua característica de veículo de transmissão de bactérias, protozoários, vírus e fungos causadores de inúmeras doenças. Esses microrganismos são responsáveis pela ocorrência de disenterias, hepatites, cólera, entre outras enfermidades graves. Por este motivo, esta pesquisa teve como objetivo analisar a presença de bactérias em amostras de água mineral comercializadas no município de Tubarão – SC e avaliar a suscetibilidade dos microrganismos isolados frente a antimicrobianos. No presente estudo, foram analisadas catorze amostras de água mineral de marcas diferentes. A metodologia empregada na pesquisa para o isolamento bacteriano foi a técnica de membrana filtrante nos meios Ágar Cromogênico Geral e Ágar Pseudomonas. A fim de complementar a identificação, foi realizada coloração de Gram, visualizando a morfologia, arranjo e coloração. O perfil de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos foi mensurado pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. O resultado desta pesquisa revelou por meio de análise microbiológica, que onze amostras (78,57%) de água mineral apresentaram crescimento microbiano, sendo destas 71,42% de bactérias (76,9% Gram negativas e 23,1% Gram positivas) e 14,28% de fungos. Quanto à morfologia, arranjo e coloração, as bactérias mostraram-se em sua maioria bacilos Gram negativos (46,15%). No TSA a maior resistência observada foi para o aztreonam (100%) e os mais sensíveis foram a amicacina, ampicilina, cefoxitina, gentamicina, sulfazotrim e tetraciclina (0%). Todos os isolados Gram negativos foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos. Desta forma, com os resultados obtidos nessa pesquisa conclui-se que as águas minerais comercializadas no município de Tubarão demonstram a presença de bactérias multirresistentes, fato este, que merece atenção pelo impacto à saúde pública.

Palavras-chave: Água mineral. Análise bacteriológica. Antibiograma.

## ABSTRACT

There is a perception that the consumption of natural mineral water represents a healthy style of life and that these products are relatively safe, free of impurities, which leads to increased potting and marketing of these waters. The lack of potability of water is not always perceptible to sight or smell, and a laboratory analysis is necessary to detect it. It becomes important the microbiological control of water due to its characteristic of transmission vehicle of bacteria, protozoa, viruses and fungi causing numerous diseases. These microorganisms are responsible for the occurrence of dysentery, hepatitis, cholera, among other serious diseases. For this reason, this research had as objective to analyze the presence of bacteria in mineral water samples commercialized in the city of Tubarão - SC and to evaluate the susceptibility of the isolated microorganisms to antibiotics. In the present study, fourteen mineral water samples of different brands were analyzed. The methodology used in the research for bacterial isolation was the filtering membrane technique in the media General Chromogenic Agar and Pseudomonas Agar. In order to complement the identification, Gram staining was performed, visualizing the morphology, arrangement and staining. The susceptibility profile to different antibiotics was measured by the Kirby-Bauer disk diffusion method. The results of this research revealed that, through microbiological analysis, eleven samples (78.57%) of mineral water presented microbial growth, 71.42% of which were bacteria (76.9% Gram negative and 23.1% Gram positive) and 14.28% fungi. As for the morphology, arrangement and coloration, the bacteria were mostly gram-negative bacilli (46,15%). In the TSA the highest resistance was observed for aztreonam (100%) and the most sensitive were amikacin, ampicillin, cefoxitin, gentamicin, sulfazotrim and tetracycline (0%). All Gram negative isolates were resistant to at least two antimicrobials. Thus, with the results obtained in this research, it is concluded that the mineral waters commercialized in the municipality of Tubarão demonstrate the presence of multiresistant bacteria, a fact that deserves attention due to the impact on public health.

Keywords: Mineral water. Bacteriological analysis. Antibiograma

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AMI – Amicacina  
AMC – Amoxicilina + Ac. clavulânico  
AMP – Ampicilina  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APHA – American Public Health Association  
ATM – Aztreonam  
CAZ – Ceftazidima  
CCIHs – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar  
CFO – Cefoxitina  
CFZ – Cefazolina  
CIP – Ciprofloxacina  
CLO – Cloranfenicol  
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute  
CPM – Cefepime  
CRO – Ceftriaxona  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral do Ministério de Minas e Energia  
EAEC – *E.coli enteroagregativa*  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
EHEC – *E. coli enterohemorrágica*  
EIEC – *E. coli enteroinvasora*  
EPEC – *E. coli enteropatogênica*  
*E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*  
ETEC – *E. coli enterotoxigênica*  
GEN – Gentamicina  
IPM – Imipenem  
*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*  
MPM – Meropenem  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*  
*P. mirabilis* – *Proteus mirabilis*  
*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*  
*S. agalactiae* – *Streptococcus agalactiae*  
SUT – Sulfazotrim  
TET – Tetraciclina  
UFC/g – Unidades Formadoras de Colônias por grama  
VAN – Vancomicina  
WHO – World Health Organization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Ilustração do processo de coloração de Gram .....  | 34 |
| Figura 2 - Amostra 5 (Marca E) em Ágar Cromogênico Geral.....  | 37 |
| Figura 3 - Amostra 6 (Marca F) em Ágar Cromogênico Geral.....  | 37 |
| Figura 4 - Amostra 2 (Marca B) com a presença de cinco colônias de coloração diferente e um crescimento fúngico..... | 37 |
| Figura 5 - Amostra 6a identificando bactérias Gram positivas em aumento de 1000x.....                                | 39 |
| Figura 6- Amostra 6d identificando bactérias Gram negativas em aumento de 1000x.....                                 | 39 |
| Figura 7 - TSA da amostra 5 (Marca E) .....  | 44 |

## **LISTA DE GRÁFICOS**

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 1 - Porcentagem de amostras de acordo com a quantidade de crescimento microbiológico existente..... | 36 |
| Gráfico 2 - Perfil de suscetibilidade dos Gram negativos frente aos antimicrobianos.....                    | 45 |

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Patógenos transmitidos pela água e as respectivas doenças que podem acarretar.23

Quadro 2 - Os antimicrobianos utilizados nesta pesquisa e as classes a que pertencem.....35

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Levantamento mundial de água mineral consumida nos anos de 2013 e 2014, com base no consumo per capita e total de diferentes países.....                        | 21 |
| Tabela 2 - Amostras de água mineral .....   | 31 |
| Tabela 3 - Quantidade de tipos de crescimento microbiano diferentes e a morfologia, arranjo e coloração em Gram apresentado em cada marca de água mineral analisada ..... | 39 |
| Tabela 4: Resistência dos isolados de amostras bacteriológicas provenientes de Água Mineral .....   | 44 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>16</b> |
| 1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA .....                                  | 17        |
| 1.2 JUSTIFICATIVA .....   | 17        |
| 1.3 OBJETIVOS .....   | 19        |
| <b>1.3.1 Geral.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.3.2 Específicos.....</b>                                     | <b>19</b> |
| 1.4 ESTRUTURA DOS CAPÍTULOS .....                                 | 19        |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                               | <b>20</b> |
| 2.1 A ÁGUA MINERAL.....   | 20        |
| 2.2 CONTAMINANTES DE ÁGUA .....                                   | 22        |
| 2.3 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....                           | 24        |
| 2.4 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....                                 | 25        |
| 2.5 RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS À ANTIMICROBIANOS.....               | 26        |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1 NATUREZA E TIPO DE PESQUISA .....                             | 30        |
| 3.2 OBTENÇÃO DA AMOSTRA .....                                     | 30        |
| 3.3 LOCAL DO PROCESSAMENTO .....                                  | 31        |
| 3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....                                 | 32        |
| 3.5 MEIOS DE CULTURA.....   | 32        |
| <b>3.5.1 Ágar Cromogênico Geral.....</b>                          | <b>33</b> |
| <b>3.5.2 Ágar Pseudomonas.....</b>                                | <b>33</b> |
| <b>3.5.3 Coloração de Gram .....</b>                              | <b>33</b> |
| 3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS..... | 34        |
| <b>4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS DADOS .....</b>                 | <b>36</b> |
| 4.1 CRESCIMENTO MICROBIANO.....                                   | 36        |
| 4.2 MORFOLOGIA, ARRANJO E COLORAÇÃO .....                         | 38        |
| 4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS.....               | 43        |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>   | <b>57</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ANEXO A – ÁGAR CROMOGÊNICO GERAL.....</b>                        | <b>58</b> |
| <b>ANEXO B – ÁGAR PSEUDOMONAS .....</b>                             | <b>59</b> |
| <b>ANEXO C – POLISENSIDISC GRAM NEGATIVO .....</b>                  | <b>60</b> |
| <b>APÊNDICE A: TESTE DE SUSCETIBILIDADE Á ANTIMICROBIANOS .....</b> | <b>62</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural fundamental ao ser humano, sendo indispensável para os organismos em suas funções vitais como nutrição ou higiene (LIMA, 2007). Está presente em corpos hídricos como rios, lagos e águas subterrâneas. Muitos destes locais estão expostos a forte influência da urbanização, sofrendo por contaminação proveniente do acúmulo de lixo, dejetos de animais, esgotos domésticos e hospitalares, resíduos industriais e agrícolas (WAGNER; BELLOTTO, 2008; CANAL, 2010; BAHLIS; SAND, 2012; PINTO, *et al.*, 2014). Essa contaminação gerou aumento no consumo de água mineral nos últimos anos, tornando-se uma tendência observada em vários países, incluindo o Brasil (LIMA, 2007).

Águas minerais são obtidas diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas, de origem subterrânea, caracterizadas pelo conteúdo definido e constante de sais minerais, oligoelementos e outros constituintes (BRASIL, 2000). Existe uma percepção de que o consumo de água mineral natural represente um estilo saudável de vida e que estes produtos são relativamente seguros (FARACHE FILHO *et al.*, 2008). Entretanto, casos com distúrbios gastrointestinais por ingestão dessas águas têm chamado a atenção pela presença de microrganismos contaminantes como: coliformes totais, coliformes fecais (*E. coli*) e *Enterococcus* (FARACHE FILHO *et al.*, 2008; GALVÃO, 2013).

Os coliformes totais são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de gás a 35° C em 24-48 horas (CONTE, *et al.*, 2004). Os coliformes fecais diferenciam-se dos coliformes totais por fermentarem lactose com produção de gás a uma temperatura de 44,5-45,5° C em 24 horas (CONTE, *et al.*, 2004). O representante mais estudado desse grupo fecal é a *E. coli* (SILVA, 2002; CANAL, 2010).

Os coliformes são contaminantes do ambiente e a espécie *P. aeruginosa* apesar de não pertencer ao grupo dos coliformes, também é utilizado como indicador de contaminação (LIMA, 2007). A *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, não esporulado. Assim como o *Enterococcus* spp., é amplamente distribuída no ambiente, responsável por graves infecções e capaz de se desenvolver e sobreviver em água (GALES *et al.*, 2001; FUENTEFRIA, *et al.*, 2008). Os *Enterococcus* spp. são gram-positivos, cocos ovais anaeróbios facultativos, formadores de cadeias de vários comprimentos (SACRAMENTO,

2015). A preocupação de contaminações na água torna-se relevante pelo índice de resistência à antimicrobianos que em geral, essas bactérias vêm apresentando (TORTORA, *et al.*, 2012).

Bactérias expostas a antimicrobianos podem ativar mecanismos biológicos que resultam em mudanças genéticas intrínsecas ou ainda envolver outras bactérias e processos que viabilizam a troca de material genético, tornando-as “superbactérias”. Essa resistência aos fármacos ocorre por mutação genética ou recombinação mediada por plasmídeos, transformação, transdução ou transposição (LIMA, *et al.*, 2017). Isso posto, que microrganismos são veiculados pela água, pondo em risco à saúde e o bem-estar da população (BAHLIS; SAND, 2012; ARRUDA, 2013).

Por esta razão, trazendo ao cenário atual, foi inevitável a necessidade de avaliar a presença de bactérias resistentes em amostras de água mineral natural de diversas marcas comercializadas no município de Tubarão – Santa Catarina.

## 1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Águas minerais envasadas e comercializadas no município de Tubarão – Santa Catarina apresentam bactérias resistentes a antimicrobianos?

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Mediante a atuação da qualidade da água de abastecimento público, o cidadão passou a utilizar a água mineral com maior intensidade (FARACHE FILHO, *et al.*, 2008). O consumo global de água engarrafada em 2014 foi de 283 bilhões de litros, 6,2% maior que em 2013 (BRASIL, 2015). O aumento está relacionado à percepção de que este produto ofereça uma maior qualidade e segurança para consumo (SOUSA, *et al.*, 2016). Entretanto, a água mineral pode não apresentar qualidade microbiológica superior à das águas de abastecimento público por estar sujeita a contaminantes microbiológicos, embora sua origem em mananciais subterrâneos (ROSENBERG, 2003; DIAS, 2008).

No Brasil, pesquisas avaliaram a qualidade de água mineral comercializada e há relatos de amostras positivas para bactérias heterotróficas, coliformes totais e fecais e/ou *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de vários estados (FARACHE FILHO, *et al.*, 2008). Esses resultados tornam-se preocupantes para a saúde do consumidor se houver a possível e ocasional presença de patógenos como: *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp, *Aeromonas hydrophilla*, *Escherichia coli*, vírus entéricos, coliformes, protozoários e patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*. Destaca-se ainda, o fato de o Brasil aderir a exportação e importação de água mineral comercializada (SANT'ANA *et al.*, 2003; BRASIL, 2015).

De acordo com dados do Departamento Nacional de Produção Mineral (2015), o Brasil em 2014 exportou 485 mil litros de água mineral e importou 2,85 milhões de litros. Essa informação demonstra a preocupação crescente que se deve ter com os aspectos da qualidade do produto comercializado. A preocupação com a presença de bactérias nas águas minerais, reside no fato de muitas espécies serem resistentes a antimicrobianos, pois esta defesa criada pode fazer com que o efeito do medicamento seja anulado posteriormente, visto que a prática favorece a seleção de linhagens cada vez mais resistentes trazendo consequências futuras (KASNOWSKI, 2004).

As infecções causadas por cepas resistentes estão associadas ao aumento das taxas de mortalidade, morbidade, necessidade de intervenções cirúrgicas, permanência da estadia hospitalar e cuidados crônicos (HIRSCH; TAM, 2010). Essas infecções por cepas resistentes não podem estar vigentes pelo consumo de água mineral, já que como forma de prevenção os registros do Ministério da Saúde, obrigam que o produto envasado não pode apresentar risco à saúde do consumidor e deve estar em conformidade com o padrão microbiológico previstos na Resolução RDC nº 275, 2005, não podendo ser comercializada se fora das previsões (BRASIL, 2005).

A presente pesquisa mostrou a importância de análises em águas minerais comercializadas no município de Tubarão – SC, perante o crescente consumo dessas águas, visto que ocorre registros de patógenos oportunistas causadores de infecções em indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos. Além disso, muitas linhagens de bactérias recuperadas de água potável são resistentes a antimicrobianos.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Geral

Analisar a presença de bactérias resistentes em águas minerais comercializadas no município de Tubarão (SC).

#### 1.3.2 Específicos

- Avaliar a existência de diferentes microrganismos presentes nas amostras de água mineral comercializadas no município de Tubarão (SC);
- Caracterizar os isolados quanto à suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos, de acordo com a literatura existente.
- Identificar a presença de bactérias multirresistentes nas amostras a serem estudadas;

### 1.4 ESTRUTURA DOS CAPÍTULOS

No primeiro capítulo, faz-se uma apresentação desta monografia. O segundo capítulo traz a base teórica necessária para análise dos dados. No terceiro capítulo, descreve-se a metodologia utilizada nesta pesquisa. O quarto capítulo trata da apresentação, análise e discussão dos dados. Por último, no quinto capítulo, conclui-se a pesquisa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A ÁGUA MINERAL

A água pode ser classificada como meteórica (advinda, por exemplo, de chuva ou neve), superficial (como a dos rios, lagos e mares) ou profunda (subterrânea, aquíferos e poços) (MONTES, 1977). As águas minerais são águas profundas, obtidas diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais, oligoelementos e outros constituintes (BRASIL, 2000). Surge a partir da infiltração da água no solo – gravidade, capilaridade do solo ou atração molecular – até atingir pontos de saturação, formando lençóis freáticos (JOHNSON, 1978).

A exploração de água mineral 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) (BERNARDO, 2009).

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).

A água mineral natural comercializada 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).

O mercado brasileiro de água mineral disponibiliza à sociedade os mais variados tipos de água em diferentes volumes e embalagens. Apesar da maior parte das águas engarrafadas ainda ser produzida por marcas locais nos países consumidores, a tendência de consolidação mundial das quatro grandes empresas Nestlé, Danone, Coca-Cola e PepsiCo, permanece e desenvolve em muitos países (CAETANO, 2009; BRASIL, 2015).

A consultoria internacional Beverage Marketing Corporation-BMC estimou o consumo global de água engarrafada em 2014 de 283 bilhões de litros, 6,2% maior que no ano

anterior. A DNPM de 2014 compara, que os maiores aumentos percentuais de consumo de água mineral, ocorreram na China com 10%, na Tailândia com 9,8% e no Brasil, com 7,4%. O Brasil permaneceu como 5º maior mercado de água engarrafada do mundo, tendo consumido 19,5 bilhões de litros (7,4%), com o consumo per capita de 96,2 litros por ano, 6 litros a mais que no ano anterior (Tabela 1).

No Brasil, a primeira informação disponível sobre produção de água mineral envasada foi em 1911. Nessa época, só os estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro tinham indústrias montadas de água mineral. São Paulo iniciou suas atividades de envase em 1921, seguido do Paraná em 1923, Rio Grande do Sul em 1925, Pernambuco e Espírito Santo em 1927, Santa Catarina em 1931 e a Bahia e o Ceará em 1936 (CAETANO, 2009).

Tabela 1- Levantamento mundial de água mineral consumida nos anos de 2013 e 2014, com base no consumo per capita e total de diferentes países.

| Países        | Consumo per capita<br>(litros/ano) |       | Consumo (milhões de litros) |         |
|---------------|------------------------------------|-------|-----------------------------|---------|
|               | 2013                               | 2014  | 2013                        | 2014    |
| Alemanha      | 143,8                              | 148,4 | 11.769                      | 12.215  |
| Brasil        | 90,3                               | 96,2  | 18.158                      | 19.500  |
| China         | 118,1                              | 123,8 | 39.438                      | 43.377  |
| EUA           | 121,1                              | 128,7 | 38.347                      | 41.165  |
| França        | 138,2                              | 141,6 | 9.118                       | 9.125   |
| Itália        | 196,5                              | 201,0 | 12.018                      | 12.269  |
| México        | 254,8                              | 264,2 | 31.171                      | 32.726  |
| Tailândia     | 225,2                              | 246,4 | 15.086                      | 16.563  |
| Outros países | -                                  | -     | 65.499                      | 67.940  |
| <b>TOTAL</b>  |                                    |       | 266.385                     | 282.799 |

Fonte: Adaptado de BRASIL (2015)

Em 2014, os estados brasileiros que tiveram maior produção de água envasada declarada foram: São Paulo (21%), Pernambuco (10%), Bahia (9%), Ceará e Minas Gerais (6%), Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte (5%). Neste mesmo ano, foi declarado uso de 3,23 bilhões de litros de água mineral para fabricação de bebidas, volume 12% menor que o declarado no ano anterior (BRASIL, 2015).

Conforme dados do DNPM (2015), em 2014, o Brasil importou 2,85 milhões de litros de água mineral, com um valor declarado de US\$ 2,22 milhões, dos países: França (48%), Itália (41%), Portugal (5%) e Noruega (5%). Neste mesmo ano, exportou 485 mil litros de água mineral equivalentes a US\$ 136 mil, para os países: Guiana (77%), Paraguai (7%), Bolívia (5%), França (3%) e Argentina (3%).

Apesar do aumento no consumo de água mineral chegando a movimentar a importação e exportação brasileira, Pontara *et al.* (2011) afirmam que a ideia de que a água é segura e livre de impurezas deve ser repensada, sendo necessário avaliar critérios de monitoramento, pois pode ser contaminada. Sua contaminação pode ocorrer no ambiente, na fonte, no envase (devido à natureza do processo ou a reutilização de recipiente não devidamente higienizado), no transporte inadequado e armazenamento impróprio, sem ventilação e com excesso de umidade, no caso de a embalagem não ser absolutamente estanque (SANT'ANA *et al.*, 2003; CARVALHO, 2015).

## 2.2 CONTAMINANTES DE ÁGUA

Os patógenos veiculados pela água contaminada iniciam infecções resultantes de doenças, mesmo se estiver presente em pequenas quantidades. Se a exposição em questão desencadeia ou não a doença, depende da virulência do agente patógeno e da capacidade do hospedeiro em resistir à infecção (MADIGAN, *et al.*, 2016). Embora se conheçam diferentes microrganismos causadores de doenças por consumo de água, apenas alguns aparecem frequentemente (Quadro 1).

Quadro 1 - Patógenos transmitidos pela água e as respectivas doenças que podem acarretar.

| Patógeno            | Doença  |  |
|---------------------|---|--|
| <b>Bactérias</b>    | <i>Vibrio cholerae</i>  | Cólera   |
|                     | <i>Legionella pneumophila</i>                                   | Legionelose                                      |
|                     | <i>Salmonella typhi</i>   | Febre Tifoide                                    |
|                     | <i>Escherichia coli</i>   | Doença gastrintestinal                           |
|                     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                   | Doença gastrintestinal                           |
|                     | <i>Salmonella entérica</i>                                      | Salmonelose                                      |
|                     | <i>Shigella</i> sp.   | Doença gastrintestinal –<br>Disenteria           |
|                     | Coliformes totais e fecais                                      | Doença gastrintestinal                           |
|                     | <i>Aeromonas hidrophilla</i><br><i>Plesiomonas shigelloides</i> | Doença gastrintestinal<br>Doença gastrintestinal |
| <b>Vírus</b>        | Norovírus   | Doença gastrintestinal                           |
|                     | Vírus da hepatite A   | Hepatite viral                                   |
| <b>Protozoários</b> | <i>Cryptosporidium parvum</i>                                   | Criptosporidiose                                 |
|                     | <i>Giardia intestinalis</i>                                     | Giardíase  |
|                     | <i>Entamoeba histolytica</i>                                    | Amebíase   |
|                     | <i>Toxoplasma gondii</i>  | Toxoplasmose                                     |
| <b>Helmintos</b>    | <i>Schistosoma mansoni</i>                                      | Esquistossomose                                  |

Fonte: Adaptado de Brasil, 2006; Yamaguchi, *et al.*, 2013; Madigan, *et al.*, 2016

Em águas minerais alguns organismos são encontrados com mais frequência, como: coliformes totais, coliformes fecais (*E. coli*) e *P. aeruginosa* (BRASIL, 2006). Estes organismos chegam até a água por contaminação fecal ou outras vias, sejam diretamente na fonte ou durante algum processo do engarrafamento (COELHO *et al.*, 1998; DIAS, 2008). Já houve ocorrência de distúrbios gastrointestinais quanto ao consumo de águas com a presença desses microorganismos. Estes crescem, irritam a mucosa do intestino e invadem outros tecidos, causando problemas adicionais (ALVES, 2012). Estes problemas não se limitam aos países em desenvolvimento onde o tratamento de água poderia não existir ou ser insuficiente (BERNARDO, 2009).

### 2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* são bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos (1 a 5  $\mu\text{m}$  x 0,5 a 1  $\mu\text{m}$ ), não esporulados, pertencente à família Pseudomonadaceae (QUINN, *et al.*, 2005; MURRAY, *et al.*, 2006). Podem ser observados como células isoladas, aos pares (mais comum), ou em cadeias curtas e com flagelo polar que lhe confere motilidade (PESSOA, 2013). Produz a pioverdina e a piocianina, pigmentos fluorescentes e solúveis em água, e algumas cepas ainda produzem pigmentos vermelho-escuro (piorrubina) ou preto (piomelanina) (MURRAY, *et al.*, 2006).

A temperatura ótima de crescimento é 37 °C, porém esse bacilo tolera alta temperatura entre 45-50 °C (DATABIO, 2016). Apresenta odor doce semelhante a uva, proveniente de suas colônias em meios de cultura (ZAVASCKI, 2003). Esta bactéria tem grande capacidade de resistir e proliferar em água destilada e águas minerais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). A presença de altos números de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável, notavelmente em água engarrafada, pode estar associado com alteração de paladar, odor e turbidez (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; DIAS, 2008). Em relação a seu metabolismo é aeróbio, catalase positivo e oxidase positivo (QUINN, *et al.*, 2005; DATABIO, 2016).

Tais bacilos são microrganismos oportunistas ambientais de ocorrência mundial tanto na água, como no solo, vegetais, humanos e animais, objetos e mucosas e capazes de desenvolverem resistência aos antimicrobianos (GALES, *et al.*, 2001; QUINN, *et al.*, 2005 FUENTEFRÍA, *et al.*, 2008). Podem ser encontrados na pele e têm sido isolados das fezes e garganta de 3% a 5% dos indivíduos normais (DIAS, 2008). A ampla distribuição ambiental de *Pseudomonas* tornou-se possível devido à sua exigência simples para crescimento e versatilidade nutricional (MURRAY, 2006).

A transmissão do *P. aeruginosa* ocorre através do contato direto causando intoxicações ou infecções (DATABIO, 2016). O indivíduo saudável se tiver contato com a bactéria em casos de ruptura da barreira cutânea-mucosa ou queda da imunidade, poderá se contaminar (SANTOS, 2004; ZAMBRANO; HERRERA, 2004; PESSOA, 2013). As fontes de infecções incluem a ingestão de alimentos ou água contaminada (Ibid).

*P. aeruginosa* pode determinar ou estar associado com infecções no sistema respiratório, queimaduras, dermatites, pneumonia, meningite, endocardite, osteoartrite, episódios de diarreia e septicemia (ZAMBRANO, HERRERA, 2004; MAIA, *et al.*, 2009).

Muitas das contaminações pela bactéria são associadas com alta morbidade e mortalidade, como o caso de uma fibrose cística (NEVES, *et al.*, 2011; PESSOA, 2013).

*P. aeruginosa* em água mineral é inaceitável por ser um patógeno oportunista e apresentar a maior resistência dentre os demais microrganismos, sendo capaz de inibir as bactérias do grupo coliforme (FARACHE FILHO, *et al.*, 2008). O grupo mais afetado pelo patógeno são os imunodeficientes, recém-nascidos e idosos (DIAS, 2008).

As águas minerais são recomendadas por profissionais da saúde principalmente para indivíduos imunocomprometidos como os que apresentam complicações renais, problemas urinários ou no coração. Por apresentarem a saúde mais fragilizada, são alvos frequentes e com maior incidência de contaminação, desta forma, a ingestão de bactérias oportunistas não é aconselhável por agravar o quadro de infecção (ROSENBERG, 2003).

#### 2.4 *Escherichia coli*

*E. coli* são bacilos Gram-negativos não esporulados (0,5 µm x 1 a 3 µm), anaeróbios facultativos, oxidase-negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. Podem ser agrupados em categorias distintas, levando em consideração o conjunto de genes que caracterizam sua patogenicidade, imóveis ou móveis por múltiplos flagelos (peritricas) dispostos em volta da célula, que lhes conferem motilidade, e fímbrias ou adesinas que lhes permitem fixação (KASNOWSKI, 2004).

A temperatura ideal é 37 °C, porém crescem em temperaturas entre 15 a 45 °C (ALMEIDA, 2013). Seu pH ótimo é 7,5, entretanto sobrevive por longos períodos, embora tenha crescimento lento, em meios fermentados ou ácidos (ELSAS, *et al.*, 2011). Essa bactéria também é caracterizada por suas propriedades bioquímicas; positiva para reação para indol, lisina, motilidade e reação de vermelho metila; negativa para testes para urease e hidrogênio e utilização de citrato. Além disso, algumas cepas podem produzir H<sub>2</sub>S (QUINN, *et al.*, 2005; ALMEIDA, 2013).

Distinguem-se dos demais coliformes por possuírem as enzimas β-galactosidase e β-glucoronidase; fermentam a lactose e o manitol com a produção de ácido e gás e produzem indol a partir de triptofano a 44-45 °C em 24 horas (BRASIL, 2006).

*E. coli* é um dos habitantes mais comuns do trato intestinal dos seres vivos. Consideradas patogênicas, possuem linhagens agrupadas em classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusivamente aderente) (HAMELIN, *et al.*, 2007). Podem ser benéficas ou prejudiciais à saúde dependendo da espécie e quantidade no organismo (KASNOWSKI, 2004).

A contaminação com a *E. coli* ocorre através do consumo de água ou alimentos contaminados com a bactéria (KASNOWSKI, 2004). Alguns exemplos de doenças que podem determinar ou estar associadas são: gastroenterite, infecção urinária, pielonefrite, apendicite, peritonite, meningite e septicemia (CARDOSO, 2009; ROSA, *et al.*, 2015).

## 2.5 RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS À ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas que têm a capacidade de impedir a multiplicação de microrganismos ou de destruí-los, (ALVES, 2012). Em 1940, a introdução destes para o tratamento de doenças revolucionou a medicina, sendo muito importante na redução de infecções e complicações, como a tuberculose, a sífilis, a lepra e infecções pulmonares. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A maioria dos antimicrobianos atuais foram descobertos até 1960. Os antimicrobianos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antimicrobianos em uso clínico e podem ser classificados em  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc) (GUIMARÃES *et al.*, 2010; LIMA, *et al.*, 2017). Os antimicrobianos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas.

Após o ano 2000, a formulação de novos antimicrobianos ocorre de forma lenta, mostrando a defasagem em pesquisar e extrair novos antibióticos devido ao alto custo e baixo retorno financeiro para as indústrias farmacêuticas. Segundo LIMA *et al.*, (2017) até 50% de todos os antimicrobianos prescritos são considerados desnecessários, pois as bactérias

desenvolveram mecanismos de resistência para os vários mecanismos de ação existentes dos antimicrobianos, apresentando algumas estirpes resistentes e não fazendo mais efeito os medicamentos.

Segundo Arruda (2013), o mecanismo de resistência ocorre quando a bactéria é exposta diariamente a antimicrobianos que foram introduzidos no meio ambiente através de algum resíduo humano, agrícola, pecuário ou farmacêutico. Conforme o contato diário, ela pode adquirir resistência. A resistência bacteriana aos antibióticos 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 mudança na permeabilidade da membrana celular que impede a entrada do antimicrobiano na célula ou sistema ativo de efluxo, inativação enzimática, uma aquisição da capacidade de degradar ou ainda inativar o antibiótico (LIMA, *et al.*, 2017; BERNARDO, 2009).

As formas de transferência de material genético entre bactérias podem ocorrer por transformação, transdução, conjugação ou transposição (TORTORA, *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2017).

No processo chamado transformação, a bactéria capta fragmentos de DNA livre e adere a si. A transformação bacteriana ocorre pela absorção de fragmentos de DNA presentes no ambiente, originados de outras bactérias mortas e decompostas. Essa molécula ou fragmento será incorporado ao DNA da bactéria através da permuta de bases entre o DNA original e o fragmento absorvido. Caso haja compatibilidade nesta troca, o fragmento passa a fazer parte do material genético da bactéria sendo duplicado e passado durante a reprodução.

No processo chamado transdução a transferência do DNA bacteriológico é mediado por fagos. É quando uma bactéria tem pedaços de seu material genético transportado para outra bactéria, através da ação de vírus bacteriófagos. Para que isso aconteça há necessidade de que, no momento em que novos bacteriófagos são formados, pedaços do DNA bacteriano sejam incorporados ao material genético viral. Com a liberação dos bacteriófagos e o ataque a outra bactéria, os genes bacterianos presentes poderão ser transferidos para o DNA da bactéria agora infectada.

Isso pode acontecer desde que a ação do material genético infectante proveniente do vírus não promova a destruição da bactéria. Assim, haverá incorporação de fragmentos do material genético. E, ocorrendo sua reprodução assexuada, haverá a formação de uma nova linhagem, modificada.

A conjugação é o tipo de reprodução recombinante mais conhecido. Neste evento, existe a formação de uma ponte ou pelo que conectará duas bactérias. É o processo no qual é

necessário contato físico de uma bactéria com outra, sendo que uma delas será a doadora que transfere por fímbria ou pilus sexual o material genético para a bactéria receptora. A bactéria que doar seu material genético não sofrerá modificação, mas a receptora sairá desta conjugação modificada.

O ato de conjugar é geralmente atribuído aos plasmídeos, estes podem possuir genes de resistência, passando para a bactéria receptora uma nova característica. Durante a ligação é transferido, da bactéria doadora, um pedaço de DNA chamado de plasmídeo F (de fertilidade) que se recombina com o material genético da bactéria receptora, ocorrendo modificações.

Transposição é quando a bactéria necessita de alguns pequenos segmentos de DNA, os chamados transposóns, que apesar de possuírem genes de resistência para até mais de um antimicrobiano, não têm autorreplicação e necessitam dos replicons, que são partes de DNA com capacidade de duplicação individual. Estes “pulam” dentro da célula entre plasmídeos, cromossomos e bacteriófagos, ocorrendo uma variação genética. Estes genes, quando se ligam a segmentos de DNA para fazer sua replicação, podem inserir genes de resistência.

A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau adquirido, são propriedades variáveis entre as bactérias (KASNOWSKI, 2004). As que sofrem alterações metabólicas e permitem o aumento da resistência ao fármaco em contato, são chamadas de “superbactérias” (ARRUDA, 2013). Para Keen e Patrick (2013), isso é um fenômeno natural, perante o aumento dos impactos gerados das atividades humanas. Neste caso, as causas da sua ocorrência são multifatoriais, contudo a subutilização, uso excessivo e uso indevido de antimicrobianos na área humana, agrária e veterinária são fatores significativos para a seleção destes microrganismos a nível mundial (CANAL, 2010).

O surgimento de superbactérias faz com que o efeito do medicamento seja anulado posteriormente, pois a prática favorece a seleção de linhagens cada vez mais resistentes (KASNOWSKI, 2004). Por isso, a indicação correta, a dispensação fiscalizada, os cuidados padronizados e supervisionados pelos CCIHs nos hospitais, são essenciais para o controle da resistência bacteriana frente aos fármacos (LIMA, *et al.*, 2017).

Messi e colaboradores (2005), observaram em sua pesquisa com amostras de água mineral, que as *Pseudomonas* spp. (55%) foram predominantes no total de isolados e ainda apresentaram cepas com resistência a múltiplos antimicrobianos. Outros autores associam determinadas bactérias a infecções resistentes aos antibióticos podem-se referir os serótipos *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Vibrio* sp., *S. aureus*, *E. coli*,

*Pseudomonas* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus* sp., entre outras, todas associadas a morbidade e/ou mortalidade na saúde humana e animal (SANTOS, 2004).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 NATUREZA E TIPO DE PESQUISA

O método adotado para a monografia foi descritivo, pois se baseou em analisar os crescimentos bacterianos e a suscetibilidade a antimicrobianos, em diferentes marcas de águas minerais comercializadas no município de Tubarão – SC. Pesquisa descritiva é aquela que analisa, observa, registra e correlaciona aspectos (variáveis) que envolvem fatos ou fenômenos, sem manipulá-los (UNISUL, 2005). Quanto à natureza, trata-se de uma pesquisa quantitativa.

#### 3.2 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

As águas minerais comercializadas no município de Tubarão – SC são oriundas da própria região. Em todos os locais de ramo alimentício (padarias, supermercados, distribuidoras, etc.) do município é comercializado água mineral envasada em diversos tipos de embalagens, que vão desde copos contendo 250 ml a galões com 20 litros, plásticos ou em vidros. Por essa razão a obtenção das amostras foi de livre acesso, não havendo qualquer empecilho para sua obtenção.

Foram consideradas somente as águas minerais envasadas em embalagens plásticas, contendo no mínimo 500 ml do produto, não gaseificadas, de marcas aleatórias comercializadas no município de Tubarão. Ao todo foram utilizadas 14 marcas comerciais de água mineral diferentes, sendo que de cada uma foi feita duplicatas da amostra contendo 100 ml de produto cada (Tabela 2). A obtenção das amostras ocorreu no mês de outubro de 2018.

Tabela 2 - Amostras de água mineral

| <b>Marcas comerciais</b> | <b>Total de unidades</b> | <b>Amostras representativas</b> |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| A                        | 1                        | 2                               |
| B                        | 1                        | 2                               |
| C                        | 1                        | 2                               |
| D                        | 1                        | 2                               |
| E                        | 1                        | 2                               |
| F                        | 1                        | 2                               |
| G                        | 1                        | 2                               |
| H                        | 1                        | 2                               |
| I                        | 1                        | 2                               |
| J                        | 1                        | 2                               |
| K                        | 1                        | 2                               |
| L                        | 1                        | 2                               |
| M                        | 1                        | 2                               |
| N                        | 1                        | 2                               |
| <b>TOTAL</b>             | <b>14</b>                | <b>28</b>                       |

Fonte: Autora (2018).

### 3.3 LOCAL DO PROCESSAMENTO

Os experimentos da monografia foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia e Microscopia, situado no bloco da saúde (bloco C) pertencente a Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), campus de Tubarão – SC.

As amostras de água mineral comercializada foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia e Microscopia na embalagem original e assim mantidas em temperatura ambiente até o momento do processamento da amostra, filtração e plaqueamento.

### 3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

A filtração e plaqueamento da amostra foi realizada em duplicata. Cada amostra foi homogeneizada e duas alíquotas de 100 ml cada foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  x 47 mm (APHA, 2012) utilizando uma bomba de vácuo Tecnal TE-058. Cada membrana foi colocada na superfície do meio de cultura após a filtração. As placas foram identificadas com numeração e data do processamento para o controle, e logo incubadas em estufa bacteriológica a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Antes do processamento das amostras foi esterilizado todos os instrumentos que seriam utilizados, bem como, realizado uma limpeza no laboratório, sempre tomando os devidos cuidados e hábitos de higiene para mantê-los limpos. Em cada etapa necessária para o plaqueamento era esterilizado com álcool e fogo todos os recursos utilizados e a bancada utilizada, antes e depois do procedimento. Em todos os momentos no laboratório foram utilizados EPI's.

### 3.5 MEIOS DE CULTURA

A técnica para identificação dos isolados bacterianos nas amostras de água mineral foi a visualização do crescimento característico das espécies nos meios de cultura utilizados e confirmados através da coloração de Gram, onde foi possível verificar a morfologia e arranjo bacteriano. Os meios de cultura Ágar Cromogênico Geral (Anexo A) e Ágar Pseudomonas (Anexo B), foram utilizados no estudo, sendo que os procedimentos e interpretação dos resultados a princípio seguiram as orientações do fabricante vide bula.

Após 48h do plaqueamento em cada Ágar (Cromogênico Geral e Pseudomonas) as amostras foram retiradas da estufa bacteriológica para analisar o crescimento das colônias formadas afim de identificar as espécies encontradas. Cada colônia formada nas amostras foi dividida em metades e para cada metade foi submetido um novo procedimento.

Uma metade de cada colônia serviu para realizar a Coloração de Gram, e a outra metade, separada para fazer o Teste de Suscetibilidade à Antimicrobianos (TSA).

### 3.5.1 Ágar Cromogênico Geral

O Ágar Cromogênico Geral é um meio de cultura seletivo, indicado para isolamento, diferenciação e enumeração de microrganismos em amostras diversas. É utilizado para testes presuntivos e baseia-se na coloração diferenciada das colônias, identificando microrganismos de interesse clínico e não clínico. Este ágar permite a contagem das colônias de espécies como *E. coli* expressada na coloração rosa, *K. pneumoniae* na coloração azul escuro, *P. mirabilis* em amarelo, *S. agalactiae* em tom azul claro, *S. aureus* em branco e por fim, *E. faecalis* em pigmentação azul turquesa.

### 3.5.2 Ágar Pseudomonas

O Ágar Pseudomonas, é um meio de cultura indicado para recuperação seletiva e enumeração de *P. aeruginosa* em amostras de água, através do método de filtração por membrana. O aparecimento das colônias de coloração rosa, caracteriza a espécie e inibi o crescimento de qualquer outra.

### 3.5.3 Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram permite diferenciar bactérias pela morfologia, arranjo e coloração que estas adquirem após procedimentos realizados com agentes químicos específicos. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fuccina básica, seguindo algumas etapas (Figura 1).

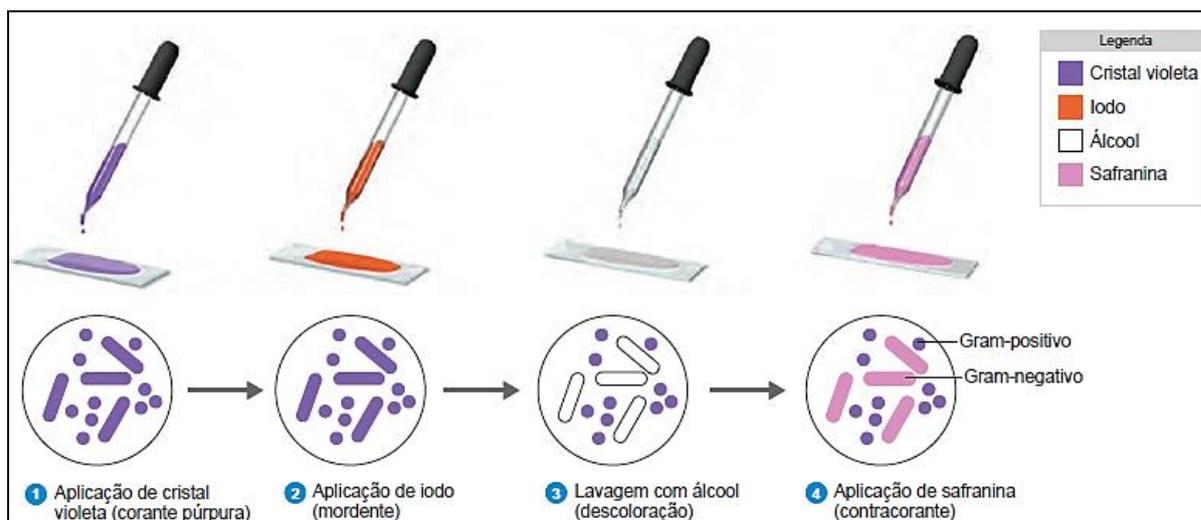


Figura 1- Ilustração do processo de coloração de Gram

Fonte: Tortora, Funke & Case (2012).

Em cada processo de coloração de Gram, as lâminas passaram por um leve e rápido enxágue de água corrente para tirar o excesso de produto. Seguindo todo o procedimento experimental conforme a literatura prevê.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade de bactérias aos antimicrobianos foi mensurada através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer, seguindo as normas preconizadas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (2015). Para a preparação da suspensão bacteriana de cada isolado, foram retiradas colônias isoladas de placas e foram suspensas em solução salina 0,9% até que atingissem a turbidez correspondente 0,5 da Escala de MacFarland. Após o preparo do inóculo, os isolados foram semeados de forma homogênea com o auxílio de suabes estéreis, em placas de petri contendo 150 mm de Ágar Muller Hinton (Oxoid). Após semeados, os discos contendo antimicrobianos foram colocados sob o meio.

Os agentes antimicrobianos utilizados foram: Amicacina (AMI) 30µg; Aztreonam (ATM) 30µg; Ampicilina (AMP) 10µg; Cefazolina (CFZ) 30µg; Cefepime (CPM) 30µg; Cefoxitina (CFO) 30µg; Ceftazidima (CAZ) 30µg; Ceftriaxona (CRO) 30µg; Ciprofloxacina (CIP) 5µg; Cloranfenicol (CLO) 30µg; Gentamicina (GEN) 10µg; Meropenem (MPM) 10µg;

Sulfazotrim (SUT) 25µg; Tetraciclina (TET) 30µg; Amoxicilina + Ac. clavulânico (AMC) 30µg; para os Gram negativos. E Ampicilina (AMP) 10µg; Amoxicilina + Ac. clavulânico (AMC) 30µg; Imipenem (IPM) 10µg; Vancomicina (VAN) 30µg; para os Gram positivos. As classes que cada antimicrobiano utilizado pertence, foi retratada no Quadro 2.

O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, foi obtido através dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento ao redor de cada disco em milímetros depois de 18 horas da submissão. Após a medição dos halos foi feita sua interpretação utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI específicos para a bactéria testada e resumido na bula dos antimicrobianos comprados, Polisensidisc (Anexo C). Desta maneira, as amostras bacterianas foram categorizadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias.

Quadro 2 - Os antimicrobianos utilizados nesta pesquisa e as classes a que pertencem

| Classe           |                               | Antimicrobiano |
|------------------|-------------------------------|----------------|
| β-lactâmicos     | Cefalosporinas                | Cefazolina     |
|                  |                               | Cefepime       |
|                  |                               | Cefoxitina     |
|                  |                               | Ceftazidima    |
|                  |                               | Ceftriaxona    |
| Carbepenam       |                               | Meropenem      |
|                  |                               | Imipenem       |
| Penicilina       | Amoxicilina + Ac. clavulânico |                |
|                  |                               | Ampicilina     |
|                  | Monobactama                   | Aztreonam      |
| Glicopeptídeos   |                               | Vancomicina    |
| Tetraciclina     |                               | Tetraciclina   |
| Aminoglicosídeos |                               | Amicacina      |
|                  |                               | Gentamicina    |
| Anfenicol        |                               | Cloranfenicol  |
| Fluoroquinolona  |                               | Ciprofloxacina |
| Sulfas           |                               | Sulfazotrim    |

Fonte: Autor (2018).

## 4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS DADOS

### 4.1 CRESCIMENTO MICROBIANO

A presente pesquisa teve por objetivo avaliar bactérias resistentes em águas minerais comercializadas no município de Tubarão (SC), assim, as amostras de água mineral processadas foram avaliadas após 48h de incubação. O resultado observado foi crescimento microbiano na maioria das amostras (78,5%), equivalente a onze marcas: A, B, C, D, E, F, G, H, K, L e M.

A presença desse crescimento pode ser justificada pelas características *in natura*, dessas amostras, que não passam por qualquer processo que altere suas características bacteriológicas e físico-químicas desde o momento da captação até o envase (YAMAGUCHI, *et al.*, 2013). A água mineral natural não é esterilizada, pasteurizada ou tratada para remover ou destruir os microrganismos, o que pode explicar a quantidade de amostras positivas para algum crescimento microbiológico.

Através de uma análise macroscópica observou-se variações no crescimento das colônias pela presença de diferentes tamanhos, colorações e proporções (Figura 2 e 3). Cinco amostras (35,71%) apresentaram crescimentos de colônias com apenas uma coloração, geralmente azuladas. Seis amostras apresentaram crescimentos de colônias com mais de uma coloração (42,85%) e três amostras não apresentaram nenhum crescimento (Gráfico 1). A amostra 2, correspondente a marca B, apresentou colônias com o maior número de crescimento microbiano diferente, cinco (Figura 4).

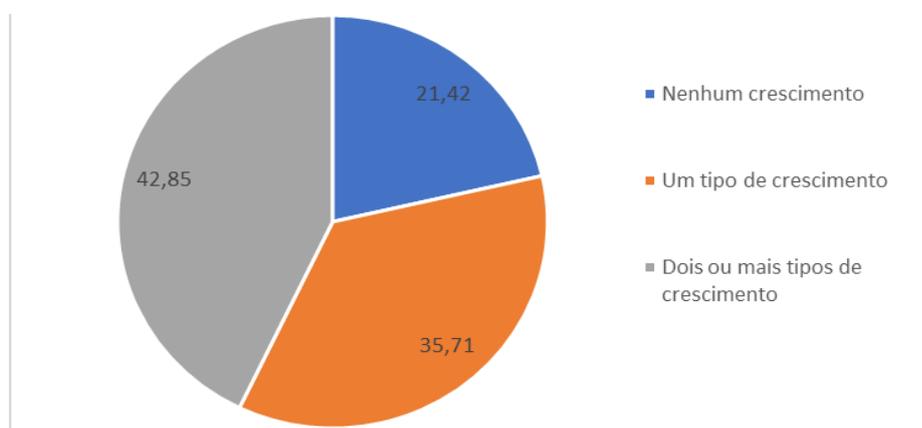


Gráfico 1 - Porcentagem de amostras de acordo com a quantidade de crescimento microbiológico existente

Fonte: Autor (2018).



Figura 2 - Amostra 5 (Marca E) em Ágar Cromogênico Geral  
Fonte: Autor (2018).

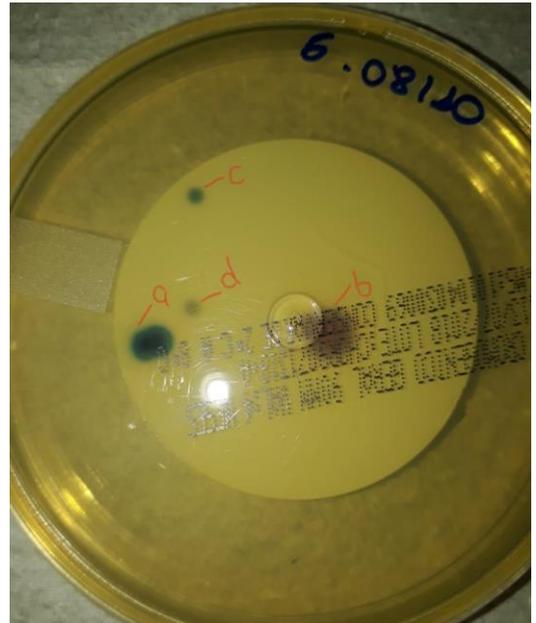


Figura 3 - Amostra 6 (Marca F) em Ágar Cromogênico Geral  
Fonte: Autor (2018).

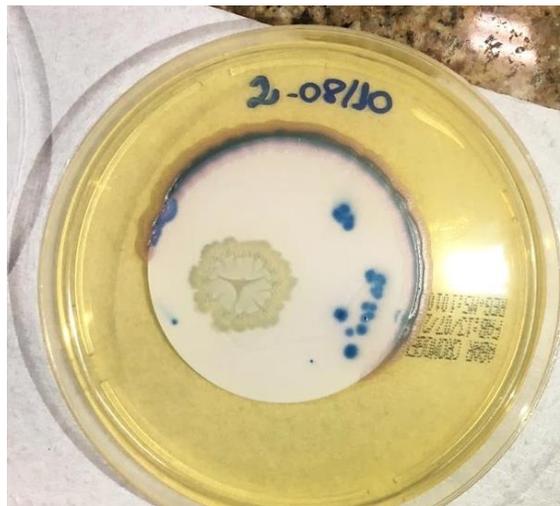


Figura 4 - Amostra 2 (Marca B) com a presença de cinco colônias de coloração diferente e um crescimento fúngico  
Fonte: Autor (2018).

Foi possível observar crescimento fúngico no Ágar Cromogênico Geral em duas amostras processadas. Ottoni *et al.* (2014) em Maringá – PR, relataram sobre a presença de fungos ser comum nas águas minerais e encontraram em seu estudo 40% das amostras positivas.

Os fungos são organismos heterotróficos encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta. Desta forma, em um meio nutritivo e com condições ambientais favoráveis, o seu crescimento ocorreu, mesmo sendo em uma pequena porção do meio (Figura

4). Os crescimentos fúngicos não foram identificados, apenas descartados por não serem o objetivo da pesquisa.

O meio específico para o isolamento de *P. aeruginosa* apresentou um (7,1%) crescimento no Ágar *Pseudomonas* na amostra 2 (Marca B), entretanto, não foi considerado os resultados expressos neste ágar. A única amostra com crescimento neste ágar não foi aceita pois, apresentou uma coloração (amarelo) fora do padrão estipulado pelo fabricante, a rosa. Desta forma, foi descartada a amostra sem a realização de nenhum procedimento de confirmação por morfologia ou TSA.

#### 4.2 MORFOLOGIA, ARRANJO E COLORAÇÃO

Os meios de cultura permitiam o crescimento bacteriano de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Em estudos realizados com amostras de água mineral já foram encontrados algumas das espécies acima citadas, como os coliformes total e fecal. Os coliformes são Gram negativos, alguns exemplos são *E. coli* e *K. pneumoniae*. Outras bactérias Gram negativas, porém, não pertencentes ao grupo dos coliformes são a *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*. Os gêneros enterococos e streptococos são Gram positivos de interesse clínico, bem como o *S. aureus*.

Das colônias bacterianas obtidas no Ágar Cromogênico Geral, treze foram submetidos a Gram. Destas, dez amostras (76,9%) apresentaram morfologia, arranjo e coloração característico de bactérias Gram negativas e três (23,1%) de Gram positivas (Figura 5 e 6). Nem todas as amostras que apresentaram crescimento foram submetidas a Gram, por motivos financeiros, e por apresentarem características macroscópicas iguais em outras amostras já selecionadas ao Gram.

As bactérias Gram negativas avaliadas possuíam formato de cocobacilos e bacilos. Já as Gram positivas eram somente em formato de bacilos e aparentemente muito maiores em relação ao tamanho das Gram negativas. Cinco amostras apresentaram morfologia como cocobacilos Gram negativos (38,46%), seis amostras como bacilos Gram negativos (46,15%) e três amostras como bacilos Gram positivos (23,07%). Não houve nenhum crescimento de cocobacilos positivos (Tabela 3).

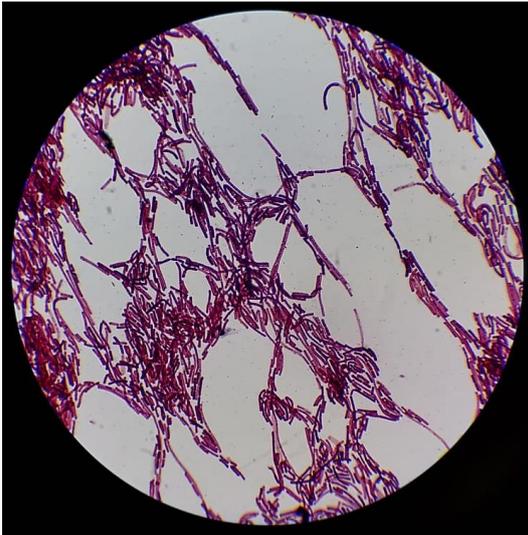


Figura 5 - Amostra 6a identificando bactérias Gram positivas em aumento de 1000x.

Fonte: Autor (2018).

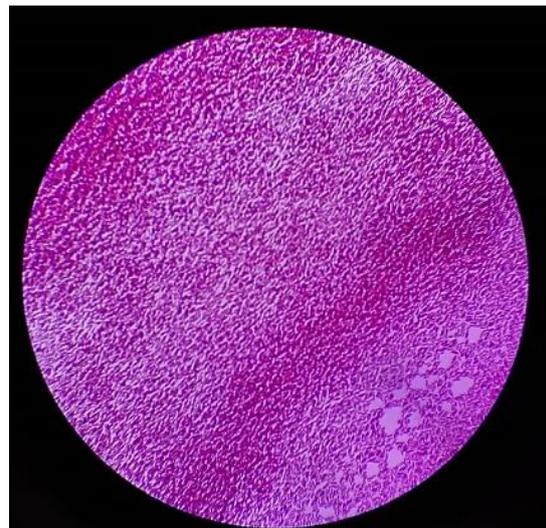


Figura 6- Amostra 6d identificando bactérias Gram negativas em aumento de 1000x.

Fonte: Autor (2018).

Tabela 3 - Quantidade de tipos de crescimento microbiano diferentes e a morfologia, arranjo e coloração em Gram apresentado em cada marca de água mineral analisada

| <b>Marcas de água mineral</b> | <b>Qtdd. de tipos de crescimento diferentes</b> | <b>Qtdd. de Gram realizado</b> | <b>Morfologia, arranjo e coloração em Gram</b>             |
|-------------------------------|---|--------------------------------|--|
| A                             | 2   | 1                              | Cocobacilos Gram negativos                                 |
| B                             | 5   | 2                              | Bacilos Gram positivo (2)                                  |
| C                             | 2   | 0                              |  |
| D                             | 1   | 0                              |  |
| E                             | 3   | 3                              | Bacilos (1); Cocobacilos (2)<br>Gram negativos             |
| F                             | 3   | 4                              | Bacilos Gram negativos (3) e<br>Bacilos Gram positivos (1) |
| G                             | 1   | 0                              |  |
| H                             | 1   | 1                              | Bacilos Gram negativos                                     |
| I                             | 0   | 0                              |  |
| J                             | 0   | 0                              |  |
| K                             | 1   | 0                              |  |
| L                             | 1   | 0                              |  |
| M                             | 2   | 2                              | Bacilos (1); Cocobacilos (2)<br>Gram negativos             |
| N                             | 0   | 0                              |  |

Fonte: Autora (2018).

Nesta pesquisa, as marcas B, E, F e M (28,57%) apresentaram coloração rosa em análise macroscópica, indicando a presença de *E. coli*, um coliforme fecal, e junto a coloração de Gram pela morfologia, coloração e arranjo apresentou uma forte caracterização presuntiva de *E. coli*. As marcas A, E, F e H (28,57%) apresentaram coloração azul escuro, indicando a presença de *K. pneumoniae*, um coliforme que em Gram pela morfologia, coloração e arranjo, presuntivamente seria *K. pneumoniae*.

Em alguns estudos analisando amostras de água mineral já foram encontradas algumas bactérias, tais como, de Oliveira *et al.* (2016) em Recife-PE com 69,56% das amostras com coliformes totais. Martins *et al.* (2014) em Cascavel-PR, observaram 2,1% das amostras contendo coliformes fecais e 4,1% com coliformes totais. Oliveira *et al.* (2013) em Recife-PE verificaram que 57,2% das marcas apresentaram coliformes totais; destas, 28,6% também foram positivas para *E. coli*. Coelho *et al.* (2009) em Recife-PE, identificaram 10% das amostras com coliformes fecais e 38,33% com coliformes totais. Guimarães (2006) em Goiânia-GO, observou que todas as amostras apresentaram coliformes totais, cinco por coliformes fecais e uma por *P. aeruginosa*.

Sant'ana, *et al.* (2003) em Vassouras-RJ, se aproximaram do presente estudo por identificarem 25% das amostras de água mineral contaminadas por coliformes totais e 20,4% por *E. coli*. Nossos resultados apresentam valores maiores quando comparados com Albano *et al.* (2013) em Curitiba-PA e Diniz (2017) em Campina Grande-PB, que observaram a presença de coliformes totais em 6,67% e 16,66% respectivamente.

Por outro lado, Silva *et al.* (2008), não observaram contaminação por nenhum microrganismo em 10 marcas de água mineral em João Pessoa-PR. Assim como Reis *et al.* (2006) que não verificaram contaminação por coliformes totais e termotolerantes em amostras de águas minerais de São José do Rio Preto-SP. Silva (2017) em Campina Grande-PB, Gusmão *et al.* (2014) em Vitória da Conquista-BA, Neta *et al.* (2013) em Teresina-PI, Recondo *et al.* (2010) em Pelotas-RS e Ritter & Tondo (2009) em Porto Alegre-RS também não encontraram coliformes em seus estudos.

A presença de coliformes nas águas engarrafadas evidencia que houve uma contaminação de origem externa visto que estas bactérias não fazem parte da composição do produto. Esta contaminação pode ter ocorrido na fonte, no envase, no transporte ou armazenamento no caso de a embalagem não ser absolutamente estanque (WHO, 2006; DIAS, 2008).

Pode indicar ausência de cuidados sanitários, problemas nas operações de captação, canalização, filtração, envasamento ou outros que possam alterar as propriedades

características e a composição das mesmas (COELHO *et al.*, 1998). Isso demonstra certa vulnerabilidade do sistema industrial frente às contaminações, o que não é desejável (CABRINI; GALLO, 2001; DIAS, 2008).

Os resultados dessa pesquisa não apresentaram confirmação em Gram para cocos positivos, características provenientes de *E. faecalis*. Entretanto, duas amostras equivalentes as marcas K e L (14,28%) apresentaram coloração azul turquesa no meio de cultura, indicando *E. faecalis*, e não foram submetidas a Gram. Estudos como o de Lima (2007), Sabioni & Silva (2006), Sant'ana *et al.* (2003) e Silva & Calazans (2002) obtiveram o mesmo resultado, não encontraram nenhuma amostra positiva para o gênero Enterococos.

Por sua vez, Dias (2008) analisou 69 amostras de água mineral e duas foram positivas para enterococos. Giacomett *et al.* (2005), em análise de 225 amostras de água mineral obtiveram resultado positivo em 40 amostras.

A utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal apresenta algumas restrições, pois eles também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2003). A presença de enterococos em águas minerais pode indicar contaminação externa do poço, portanto, a necessidade de intensificação de cuidados nas indústrias engarrafadoras para evitar a presença desses microrganismos no produto final, pois podem causar danos à saúde dos consumidores (DIAS, 2008; RITTER; TONDO 2009).

Ainda sobre crescimentos microbianos no Ágar Cromogênico Geral, as marcas C, E e M (21,42%) apresentaram nas análises macroscópicas *P. mirabilis*, com características em Gram fortemente presuntivas para a tal. E as marcas B, C e G (21,42%) apresentaram coloração azul claro no meio, indicando *S. agalactiae*, mas não foram analisadas em Gram.

Analisando o Ágar Pseudomonas, neste estudo não houve crescimento de *P. aeruginosa* em nenhuma das amostras. Resultado semelhante aos estudos de Câmara & Silveira (2001) e Sant'ana *et al.* (2003), que não detectaram a presença deste microrganismo, sugerindo respectivamente, qualidade satisfatória quanto as pesquisas.

Já Farache Filho *et al.* (2008) detectaram que todas as amostras atenderam ao padrão (ausência) para coliformes totais e coliformes fecais/*E. coli*, entretanto, cinco amostras (4,5%) não atenderam ao padrão para *P. aeruginosa*. No estudo de Lima (2007), das 106 amostras de água mineral analisadas, 17 (16%) foram consideradas impróprias para consumo por apresentarem coliformes e ainda em uma (0,94%) das amostras, um número considerável de *P. aeruginosa*.

Dias (2008), Faria & Reis (2001) e Sabioni & Silva (2006) encontraram valores de 4,34%, 11% e 14%, respectivamente, das amostras de água mineral analisadas positivas para *P. aeruginosa*. Keese *et al.* (2017) detectaram a *P. aeruginosa* em quatro (4,2%) amostras. Bernardo (2009) observou resultados de *P. aeruginosa* em 40% das amostras em galões de 20L e em 2% das amostras em embalagens de 1.5L. Nascimento *et al.* (2000), verificaram a incidência de *P. aeruginosa* em 35 das 70 amostras analisadas em São Luís-MA.

A preocupação com a presença de *P. aeruginosa* nas águas minerais, reside no fato de muitas espécies serem resistentes a antimicrobianos, sua capacidade de multiplicação em água com reduzido conteúdo de nutriente e pelo fato de ser um patógeno oportunista. Além disso, pode alterar a cor, turbidez e sabor de águas (SANTANA, 2003; FARACHE FILHO *et al.*, 2008; GALVÃO, 2013).

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

Não se pode afirmar que o crescimento de todos os microrganismos é certamente originário das fontes ou vinda de águas superficiais em contato com a mesma. Cabrini & Gallo (2001), avaliando a qualidade microbiológica de fontes de águas minerais, observaram que de 30 amostras coletadas diretamente de um aquífero, somente duas apresentaram coliformes totais, enquanto que de 30 amostras coletadas após o engarrafamento, oito estavam contaminadas por coliformes. Tal fato indica falhas nas boas práticas de processamento e envasamento das águas. Neste caso, os resultados podem ser um indicador das condições higiênicas do processo de envase de cada amostra.

Os resultados apresentados na Tabela 3, demonstram que a maioria das colônias do crescimento bacteriano apresentaram características morfológicas em Gram correspondente a identificação a nível de espécie defendida pela empresa Probac através da coloração. Entretanto, apesar da utilização do meio de cultura utilizado, algumas colorações das colônias não bateram com o gram inviabilizando a identificação em nível de gênero (Amostra 1, 2, 6a e 6d). Desta maneira, devido ao imprevisto, as colônias não puderam ser identificadas a nível de espécie. Contudo, foram consideradas a partir da sua morfologia, arranjo e coloração, como Gram positivos e Gram negativos.

Por serem amostras ambientais comercializadas, ou seja, amostras de água mineral sem nenhum processo industrial de tratamento ou filtração para não alterar as propriedades físicas, químicas e biológicas naturais e a pureza da água, é possível que os meios de cultura utilizados tenham permitido o crescimento de outras bactérias que estavam presentes na amostra. Pode ser que estas tenham metabolismo semelhante as de interesse clínico selecionadas no meio de cultura, o que explicaria as morfologias das colônias mas a não correspondência na coloração de Gram.

#### 4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS

Foi avaliado a suscetibilidade de bactérias à antimicrobianos através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Os discos com os antimicrobianos foram dispostos com auxílio de uma pinça estéril nas placas já semeadas. As placas foram incubadas por 18h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os resultados reportados com base nos critérios estabelecidos pela Probac, que permite classificar o perfil de cada isolado em sensível, intermediário e resistente (Apêndice A). Todos os isolados que apresentaram perfil intermediário à antimicrobianos foram incluídos na categoria de suscetibilidade.

O TSA foi realizado em colônias de 7 marcas, cinco de colônias Gram negativas (Marcas A, E, F, H e M) e dois de Gram positivas (Marcas B e F). Nem todas as amostras que apresentaram crescimento foram replicadas para serem submetidas a TSA, por motivos financeiros, e por apresentarem características em Gram iguais à outras amostras já selecionadas.

Aos Gram negativos, utilizou-se quinze discos contendo antimicrobianos diferentes. Já aos Gram positivos, utilizou-se quatro discos contendo antimicrobianos diferentes. A Tabela 4 descreve os resultados pós TSA.

Tabela 4: Resistência dos isolados de amostras bacteriológicas provenientes de Água Mineral

| Gram-negativo                       |                             |            |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------|
| Antimicrobiano<br>( $\mu\text{g}$ ) | Isolados<br>Resistentes N=5 | Percentual |
| AMI 30                              | 0                           | 0%         |
| AMC 30                              | 1                           | 20%        |
| AMP 10                              | 0                           | 0%         |
| ATM 30                              | 5                           | 100%       |
| CFZ 30                              | 3                           | 60%        |
| CPM 30                              | 2                           | 40%        |
| CFO 30                              | 0                           | 0%         |
| CAZ 30                              | 2                           | 40%        |
| CRO 30                              | 1                           | 20%        |
| CIP 05                              | 1                           | 20%        |
| CLO 30                              | 2                           | 40%        |
| GEN 10                              | 0                           | 0%         |
| MPM 10                              | 2                           | 40%        |
| SUT 25                              | 0                           | 0%         |
| TET 30                              | 0                           | 0%         |

Fonte: Autor (2018).

A marca E, caracterizada por conter cocobacilos Gram negativos, apresentou a maior resistência à antimicrobianos comparada as demais amostras testadas. Sua resistência à 7 (46,6%) antimicrobianos: Amoxicilina + Ac. Clavulânico, Aztreonam, Cefazolina, Cefepime, Ceftazidima, Cloranfenicol e Meropenem é visível na Figura 7. A amostra 6c (Marca F), caracterizada por bacilos Gram negativos, apresentou resistência a quatro antimicrobianos.

A amostra 1 (Marca A), caracterizada por cocobacilos Gram negativos, apresentou resistência a três antimicrobianos. A amostra 8 (Marcas H), caracterizada por bacilos Gram negativos e a amostra 13 (Marca M), caracterizada por cocobacilos negativos, apresentaram resistência a dois antimicrobianos.

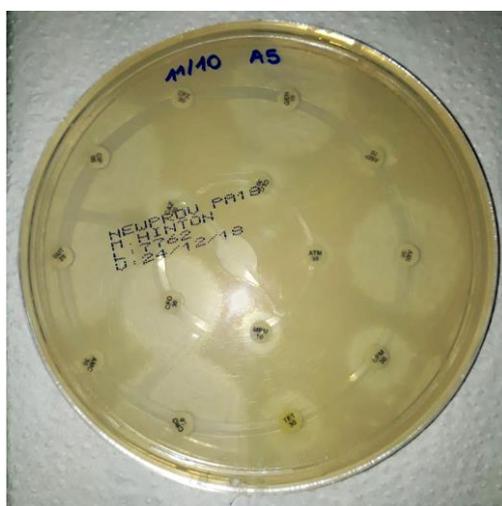


Figura 7 - TSA da amostra 5 (Marca E)  
Fonte: Autor (2018).

Com os resultados obtidos observamos que nos TSA em Gram negativos a amoxicilina + ác. clavulânico, o ceftriaxona e ciprofloxacina apresentaram um isolado resistente e o cefepime, ceftazidima, cloranfenicol e meropenem apresentaram dois isolados resistentes ao fármaco. O aztreonam apresentou a menor eficiência com 100% de isolados resistentes, seguida da cefazolina com 60% de isolados resistentes. Os antimicrobianos para os quais os isolados apresentaram maior suscetibilidade foram seis: a amicacina, ampicilina, cefoxitina, gentamicina, sulfazotrim e tetraciclina com nenhum isolado resistente (Gráfico 2).

Já nos isolados Gram positivos, os halos foram medidos mas foi avaliado a suscetibilidade à antimicrobianos, devido ao fato de as bactérias analisadas microscopicamente não obtiveram características presuntivas semelhantes as espécies em que o meio seletivo e diferencial permitia de crescimento, não podendo identificar as bactérias a nível de gênero, nem muito, mensurar a sua resistência.

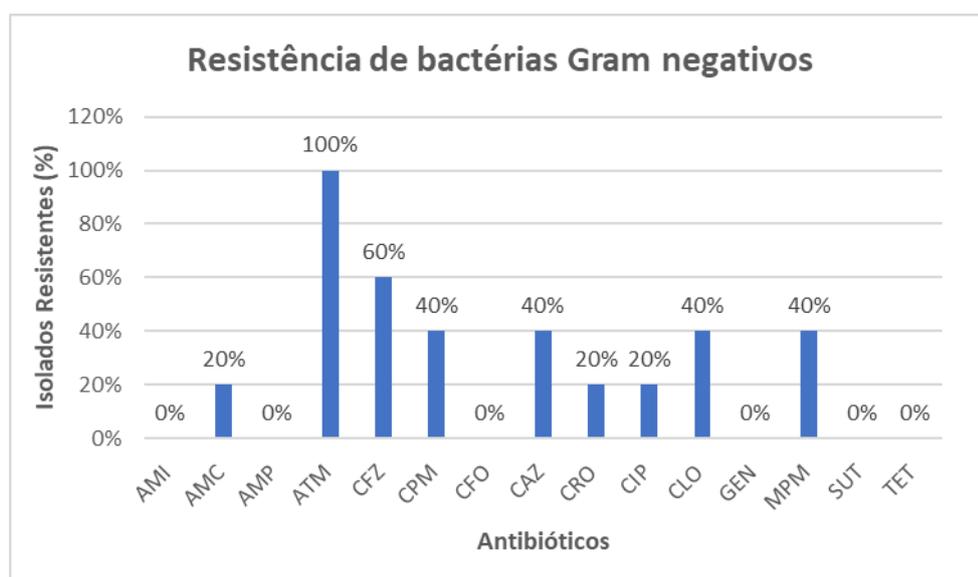


Gráfico 2 - Perfil de suscetibilidade dos Gram negativos frente aos antimicrobianos

Fonte: Autor (2018).

Daood (2009) observou que a sensibilidade de bactérias heterotróficas gram negativas em água mineral foi completa em relação ao aztreonam. Jeena *et al.* (2006), observam que as maiores resistências de bactérias heterotróficas gram negativas estão no antimicrobiano ampicilina, diferente do presente estudo, que traz o aztreonam como antibiótico menos eficaz em 100% das amostras analisadas. Sobretudo, os estudos de Bortoloti (2016) corroboram com o presente, pois apresentou altos índices de resistência

(85%) de bactérias heterotróficas gram negativas em água mineral ao antimicrobiano aztreonam.

Schneider *et al.* (2009) em Concórdia – SC, observou em estudos que todas as suas amostras de águas subterrâneas e superficiais foram sensíveis à amicacina em Gram negativos.

Canal (2010), avaliou amostras de água ao longo da Lagoa dos Patos e observou que as maiores percentagens de isolados gram negativos resistentes foram encontrados frente à tetraciclina (22,2%). Neste estudo, nenhum isolado apresentou resistência à tetraciclina.

A gentamicina neste estudo apresentou total suscetibilidade à todas as amostras, também caracterizada como a menor eficiência na pesquisa de Jeena *et al.* Ainda com Jeena *et al.*, analisando apenas coliformes isolados, o cloranfenicol foi o antimicrobiano de maior resistência, já os resultados deste estudo apresentaram resistência em 40% dos isolados para este antimicrobiano.

Segundo Jeena *et al.* (2006) as cepas resistentes a mais de dois antimicrobianos são considerados multirresistentes, deixando 45% dos isolados encontrados na sua investigação nessa categoria. Comparando o presente estudo, o resultado ultrapassa consideravelmente, pois todos os isolados foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos cada. Portanto, considera-se que todos os isolados deste estudo são multirresistentes.

A resistência a mais de um antimicrobiano em isolados de bactérias *E. coli* é relatada em outros trabalhos e parece ser uma observação frequente. Canal (2010) encontrou 50% dos isolados de *E. coli* resistentes a somente um antimicrobiano e 16,5% multirresistentes. Schneider *et al.* (2009) analisando *E. coli* isoladas de amostras de água superficial, verificou que 86,14% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Também Gallert *et al.* (2005) encontraram elevados índices de resistência (90%).

Grande parte das bactérias Gram negativas possui resistência aos antimicrobianos da classe de  $\beta$ -lactâmicos. Bahlis & Sand (2012), depararam-se com 50% das bactérias gram negativas encontradas no Rio dos Sinos, em Esteio – RS, resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos cefalotina e cefoxitina.

As cefalosporinas, assim como outros  $\beta$ -lactâmicos, são alguns dos antimicrobianos mais prescritos atualmente, e em sua maioria são de fácil absorção para uso oral, podendo ser administradas via intravenoso ou intramuscular. Geralmente, são amplamente utilizadas para infecções, como, por exemplo, a cefoxitina, para infecções

abdominais (BAHLIS; SAND, 2012). Dessa forma, esperava-se isolar bactérias resistentes principalmente a  $\beta$ -lactâmicos nesse estudo, pois estes são de uso recorrente na população.

Nossos resultados para  $\beta$ -lactâmicos foi resistência na maioria dos utilizados, como esperado. O aztreonam (100%), amoxicilina + ác. clavulânico (20%), meropenem (40%), ceftriaxona (20%), ceftazidima (40%), cefepime (40%), cefazolina (60%). Aos que apresentaram suscetibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos utilizados foram somente a cefoxitina e a ampicilina.

Um outro aspecto observado nesse estudo é o baixo índice de resistência aos aminoglicosídeos, como amicacina e gentamicina, o que pode ser indicativo do baixo uso desses fármacos no tratamento de infecções. Os percentuais de Schneider *et al.* (2009) foram semelhantes para esses dois antimicrobianos, nenhuma resistência à amicacina e 5,6% à gentamicina.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo analisou a presença de bactérias resistentes em águas minerais comercializadas no município de Tubarão – SC. As técnicas basearam-se na identificação em meios de cultura (Ágar Cromogênico Geral e Pseudomonas) e Coloração de Gram e por fim, foi mensurada a resistência antimicrobiana por discos nas colônias em TSA.

Os resultados apresentaram crescimento microbiano em onze (78,57%) amostras de água mineral, com bactérias tanto Gram negativas (76,9%) quanto positivas (23,1%), e 14,42% de fúngicos. Confirmou-se a existência de diferentes microrganismos nas amostras, perante a formação de colônias em colorações diferentes nos meios de cultura e ainda morfologia, arranjo e coloração em Gram.

No TSA todos os isolados Gram negativos foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos. A maior resistência observada foi para o aztreonam com 100%, seguida da cefazolina com 60%. Além disso, foi possível observar a presença de bactérias multirresistentes nas amostras estudadas. A marca E, caracterizada por cocobacilos Gram negativos, possuiu a maior resistência à antimicrobianos comparada as demais amostras testadas. Apresentou resistência a sete (46,6%) antimicrobianos. Seguida da amostra 6c (Marca F), caracterizada por bacilos Gram negativos, resistente a quatro antimicrobianos.

Percebendo a existência de bactérias resistentes, este estudo mostrou-se importante, pois demonstra certa vulnerabilidade do sistema industrial frente às contaminações, o que não é desejável. Todos os crescimentos microbianos presentes, podem indicar não necessariamente contaminação fecal, mas também falhas na higiene durante o processamento dos produtos, necessitando de uma educação continuada com os funcionários e uma maior atenção na fiscalização.

A partir da análise de dados, pode-se afirmar que este estudo apresentou algumas limitações. Destaca-se o fato que apesar da utilização do meio de cultura seletivo e diferencial comercializado pela empresa Probac algumas colorações das colônias não bateram com o gram inviabilizando a identificação em nível de gênero. Ainda, apesar do número da amostra ser pequeno, as informações são relevantes para a comunidade científica tendo em vista que os resultados apresentados têm interesse da comunidade local.

Como sugestão as futuras pesquisas, acrescento a utilização de testes bioquímicos e o aumento do número de amostras por marca.

## REFERÊNCIAS

- ALBANO, R. C.; SILVA, L. L. da; CASTRO, F. B. G. de. Análise de Indicadores Microbiológicos em Amostras de Água Mineral Natural. **Cadernos das Escolas de Saúde**, v. 1, n. 9, 2013.
- ALMEIDA, A.M.S. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência**. Universidade Federal de Goiás Escola Veterinária e Zootecnia Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Goiânia, 2003.
- ALVES, A.R.F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. Universidade Fernando Pessoa Faculdade Ciências da Saúde: Setembro de 2012.
- ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 6, p. 749-751, 2002.
- APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, AWWA, WEF, 22 Edition, 2012.
- ARRUDA, K.L.S. **Resistência das *Pseudomonas* à Ciprofloxacina e sua Relação com a Saúde Ambiental**. Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC. Florianópolis: 2013.
- BAHLIS, M.G.; SAND, S.V.D. **Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas das águas do Rio dos Sinos, Esteio, RS**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 2012.
- BORTOLOTTI, K.C.S. **Qualidade microbiológica de fontes de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos, no município de Itajubá (MG)**. Universidade Federal de Itajubá. Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Itajubá. 2006.
- BRASIL. Resolução nº 54, de 15 de junho de 2000. **Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1. 16 jun. 2000.
- \_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 3. Resolução nº 275, de 22 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, Seção 1, 23 set. 2005.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- \_\_\_\_\_. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral** / Coordenadores Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves Brasília: DNPM, 2015.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas. **Hig. Alim.**, v.15, n.90/91, p.83-92, 2001.

CAETANO, L.C. **Perfil da água mineral**. Ministério de minas e energia – MME. Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral-SGM. 2009.

CÂMARA, S.A. SILVEIRA, K.C.S. Determinação de *Pseudomonas aeruginosa* em águas minerais consumidas em alguns municípios do Mato Grosso do Sul. **Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**, 12 Macció, p 195. 2001.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS**. UFRGS. Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola e do Ambiente. Porto Alegre – RS. 2010.

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.

CARDOSO, P. A. **Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de Shiga toxina em queijo mussarela produzido** – Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

CARVALHO, M.F. **Avaliação da qualidade da água mineral comercializada em postos de combustíveis no município de Goiânia** – Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, Goiânia, 2015.

CLSI/ National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne, PA. 2015.

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

COELHO, M. I. S., MENDES, E. S., CRUZ, M. C. S., BEZERRA, S. S., SILVA, R. P. P. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco-DOI: 10.4025/actascihealthsci. v32i1. 3837. Acta Scientiarum. **Health Science**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2009.

CONTE, V. D.; COLOMBO, M.; ZANROSSO, A. V.; SALVADOR, M. **Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul**. Universidade de Caxias do Sul-UCS/RS. Rev. Informa, v.16, nº 11-12, 2004.

DAOOD, N. Risk Assessment of Heterotrophic Bacteria from Bottled Mineral Water Consumed in Syria. Department of Botany, Faculty of Sciences, Tishreen University, Syria. Damascus University **Journal for Basic Sciences** Vol. 25, No 1, 2009.

DATABIO. INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. *Pseudomonas aeruginosa*. 2016.

DIAS, M.F.F. **Qualidade microbiológica de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara-SP**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição – Araraquara, 2008.

DINIZ, N. M. R. **Avaliação da qualidade das águas minerais mais comercializadas no município de Campina Grande.** 20f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

ELSAS, J.D.V.; SEMENOV, A.V.; COSTA, R.; TREVORS, J.T. **Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects.** The ISME Journal 5, 173–183. 2011.

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

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

FARIA, N.C.; REIS, J.D.P. Qualidade bacteriológica das águas minerais engarrafadas comercializadas no Distrito Federal. **Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**, 12, Macció, p 195. 2001.

FUENTEFRIA, 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** 41(5):470-473, set-out, 2008.

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

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 69: 106-112. 2005.

GALES A.C., REIS A.O., JONES R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 183-190, 2001.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates:** Occurrence Rates, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Molecular Typing in the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases* 2001.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; JONES, R.N. **Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America:** frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 44. 301–311. 2002.

GALVÃO, M.F.; SILVA, P.A.S.S.; FIGUEIREDO, E.L. Perfil físico-químico e microbiológico de águas minerais comercializadas no município de Marabá – PA. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.** v. 07, n. 02: p. 1088-1097, 2013.

GIACOMETTI, L. **Qualidade microbiológica, concentração de nitratos em águas de consumo alternativo (minerais e de poços) da cidade de Jaboticabal-SP.** 2001. 64 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001.

GUIMARÃES, A. P. R. C. **Avaliação Microbiológica de amostras de água mineral natural, sem gás, envasadas, comercializadas em Goiânia-GO.** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. 2006.

GUSMÃO, I. C. C. P. Avaliação microbiológica, físico-química de águas minerais comercializadas em Vitória da Conquista. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2014.

HIRSCH EB, TAM VH. **Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients outcomes.** Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 10: 441-451. 2010.

JEENA, M.I., DEEPA, P., MUJEE RAHIMANA, K.M., SHANTHI, R.T., HATHA, A.A.M. **Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water. sold in Indian markets.** International Journal of Hygienic and Health. pp: 91-96. (2006).

JOHNSON, E.E. **Água subterrânea e poços tubulares.** 3 ed. São Paulo: CETESB, 482 P. 1978.

KASNOWSKI, M.C. ***Listeria spp. Escherichia coli.* Isolamento, Identificação, Estudo Sorológico e Antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída.** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Niterói, 2004.

KEEN, P.L.; PATRICK, D.M. **Tracking Change: A Look at the Ecological Footprint of Antibiotics and Antimicrobial Resistance.** Antibiotics, 2, 191-205. 2013.

KEESE, N.G., MORELII, S.A. IMAZAKI, F.T.; OKAZAKI, M.; IAMANAKA, B.T. **Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais de diferentes marcas e volumes comercializadas no estado de São Paulo.** 11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – Campinas, São Paulo. 2017.

LIMA, M.C.; GIACOMELLI, M.B.O.; ST-UPP, V.; ROBERGE, F.D. **Especiação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método tessier.** Artigom Quim. Nova, Vol. 24, No. 6, 734-742, 2001.

LIMA, A.P. **Qualidade Microbiológica de águas minerais comercializadas no Distrito Federal.** Monografia (Especialização) – Universidade de Brasília Centro de Excelência em Turismo. Brasília, 2007.

LIMA, C.C.; BENJAMIM, S.C.C.; SANTOS, R.F.S. **Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma Revisão.** CuidArte Enfermagem. São Paulo. Campinas: 2017.

MACFADDIN, J.F. **Media for Isolation-Cultivation-Identification\_Maintenance of Medical Bacteria**, V. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. 1985.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.N.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock.** 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. **Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 29(1): 114-119, jan.-mar. 2009.

MARTINS, L. L., SIMM, K. C. B., PINTO, F.G.S., MOURA, A. C. de. Avaliação Microbiológica de Águas Minerais e Fontes Públicas na Cidade de Cascavel-PR. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 1, 2014.

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.

MONTES, A.L. **Microbiologia de los alimentos: Curso teórico e practico.** São Paulo: Resenha Universitária, v.2. 1977.

MURRAY P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica.** [tradução Carlos Pelleschi Tabora... *et al.*] 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NASCIMENTO, A. R. et al. Qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na cidade de São Luís- MA. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 76, p. 69-72, 2000.

NETA, M. S. B.; LEAL, M. P. N.; DOS REIS, A. Análise físico-química, microbiológica de água mineral produzida no nordeste e comercializada em Teresina-Piauí. **Revista Interdisciplinar**, v. 6, n. 2, p. 33-37, 2013.

NEVES, P.R. MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. ***Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil.** Bras Patol Med Lab, v. 47, n. 4, p. 409-420, agosto 2011.

OLIVEIRA, E.S.; MARQUES, L.J.P.; SANTOS, E.R.S.; GALDINO, R.M.N. **Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes em águas minerais envasadas, comercializadas na cidade do Recife-PE.** XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE: Recife, 2013.

OLIVEIRA, F.H.P.C.; SHINOHARA, N.K.S.; PADILHA, M.R.F.; CABRAL, J.V.B. Avaliação de parâmetros de qualidade de águas minerais comercializadas em Recife - PE. **Higiene Alimentar** - Vol.30 - nº 260/261 - Setembro/Outubro de 2016.

OTTONI, L.C.C.; YAMAGUCHI, N.U.; OYAMA, J.; YAMAGUCHI, M.U. **Ocorrência de fungos em água para consumo humano.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; 2014.

PDS, HPPC. **Guia de Microbiologia.** ABDI, ABIHPEC e SEBRAE. 1ª edição. 2015.

PESSOA, V.S. ***Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiologia e resistência a antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil.** Uberlândia: 2013.

PINTO, G.M.F.; SILVA, K.R.; PEREIRA, R.F.A.B; SAMPAIO, S.I. **Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil.** Artigos científicos: Engenharia Sanitária Ambiental. v.19. n.3. São Paulo: 2014.

PONTARA, A. V.; OLIVEIRA, C. D. D.; BARBOSA, A. H.; SANTOS, R. A.; PIRES, R. H.; MARTINS, C. H G. **Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, n. 2, p. 554-559, 2011.

QUINN, P.J., MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. ; DONNELLY, W. J. ; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 512 pág. Artmed Editora: 2005.

RAMIRES, I.; GREC, R.H.C.; CATTAN, L.; MOURA, P.G.; LAURIS, J.R.P.; BUZALAF, M.A.R. Evaluation of the fluoride concentration and consumption of mineral water. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 459- 465. Jun 2004.

RECONDO, N. L.; FERREIRA, L. R.; HUBER, C. S. **Avaliação da qualidade na distribuição de água mineral em embalagens de 20 litros na cidade de Pelotas/RS**. Trabalho (Monografia) de Conclusão de Curso em Tecnologia em Gestão Ambiental, Rio Grande do Sul, 2010.

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

RITTER, A. C.; TONDO, E. C. Avaliação microbiológica de água mineral natural e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da grande Porto Alegre/RS. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 203-208, 2009.

RODWAN JR., J.G. BOTTLED WATER. **Sustaining Vitality, U.S and international developments and statistics, in Bottled Water Reporter**. IBWA, International Bottled Water Association (p. 12-22). 2014.

RODWAN JR., J.G. BOTTLED WATER. **Reinvigoration, U.S and international developments and statistics, in Bottled Water Reporter**. IBWA, International Bottled Water Association (p. 11-19). 2015.

ROSA, J.L. BARROS, R.F. ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**. Faculdade Alfredo Nasser, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. 2015.

ROSENBERG, F. A. **The Microbiology of Bottled Water**. Clinical Microbiology Newsletter. Vol. 25 No. 6, 2003.

SABIONI, J. G.; SILVA, I. T. Qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em Ouro Preto, MG. **Hig. alimentar**;20(143):72-77, ago. 2006.

SACRAMENTO, A.G. **Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos**. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2015.

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

SANTOS, N.Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar**. Florianópolis: 2004.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Rev. Biotemas**, 22 (3): 11-17, setembro de 2009.

SILVA, A. R. dos S. **Análise físico-química e microbiológica de águas minerais comercializadas na cidade de Campina Grande (PB)**. 24f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SILVA, J.C.; CALAZANS, G.M.T. **Avaliação bacteriológica de águas minerais consumidas na cidade do Recife-PE**. In: I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2002, João Pessoa/PB. 2002.

SILVA, M.C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SILVA, V. P., FERREIRA, D. N., RAMOS, N. P., SILVEIRA, O. E., BRITO, A. P., CABRAL, T. M. A., e NASCIMENTO, G. J. Estudo da qualidade microbiológica de 10 amostras de água mineral natural envasada por uma empresa de mineração da cidade de João Pessoa-PB. **XI Encontro de Iniciação à Docência. Universidade Federal da Paraíba**, 2008.

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. A.; SOUZA, A. P. H. M, **Coloração de Gram: Como fazer, interpretar e padronizar**. 2002.

SOUZA, E.D.S.; COSTA, J.D.S.; SANTOS, G.F.F.S.; MIRANDA, A.C.P.; LIMA, S.K.R. **Avaliação da qualidade das águas minerais comercializadas na cidade de Bacabal-MA**. VII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Campina Grande/PB – 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. MARTINS, R. M. (trad. atual.). 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.) 20. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

WAGNER, A.G.; BELLOTTO, V.R. Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário: Análise Econômica de Alternativas para Municípios Litorâneos - Estudo de Caso – Balneário Camboriú e Itajaí (SC), Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada** 8. UNIVALI. Itajaí: 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality: incorporating first addendum**. Volume 1. 3rd ed. 2006.

YAMAGUCHI, M.U.; CORTEZ, L.E.R.; OTTONI, L.C.C.; OYAMA, J. **Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR**. Mundo da Saúde, São Paulo - 37(3):312-320. 2013.

ZAMBRANO A. F. ; HERRERA A.N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. **Rev Chil Infect**, 21 (2): 117-124. 2004.

ZAVASCKI, A.P. **Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem em pacientes hospitalizados.** Dissertação de Mestrado: Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Faculdade de Medicina: 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO A – Ágar Cromogênico Geral

### PLACAS ESPECIAIS PROBAC – AGAR CROMOGÊNICO GERAL

#### Indicações

Meio de Cultura pronto para uso, não seletivo, indicado para isolamento, diferenciação e enumeração de microrganismos em amostras diversas.

#### Apresentação



PECG90



Pacote com 10 Placas Especiais, na medida de 90 x 15 mm.

#### Composição

Agar Cromogênico e Água Purificada.

#### Princípio

O Agar Cromogênico Geral é um meio utilizado para teste presuntivo, em amostras diversas, que baseia-se na coloração diferenciada das colônias, identificando presuntivamente microrganismos de interesse clínico e não clínico.

As Placas Especiais Probac®, possuem uma ampla linha de meios de cultura, produzidas em condições de total esterilidade e hermeticamente fechadas, que proporciona um maior tempo de vida útil ao produto e uma maior flexibilidade para armazenamento e transporte. Podendo ser transportada e mantida a temperatura ambiente (consulte conservação).

#### Controle de Qualidade

Todos os lotes são submetidos a ensaios de desempenho com cepas padrões ATCC. Após 24hs, a 33°C ± 2°C, em atmosfera adequada, já é possível realizar a contagem das colônias, veja as características conforme descrito no item interpretação dos resultados.

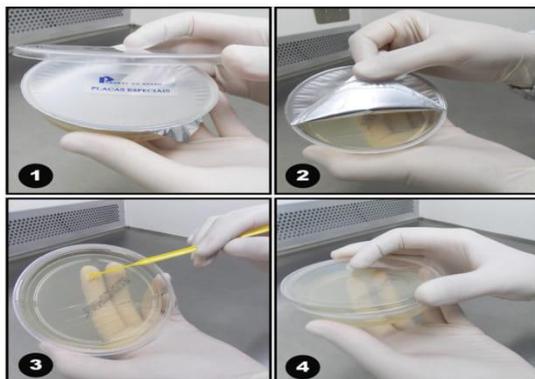
| Cepas*                          | Desempenho | Coloração       |
|---------------------------------|------------|-----------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922       | Bom        | Rosa a Vermelha |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 18883 | Bom        | Azul escuro     |
| <i>P. mirabilis</i> ATCC 25933  | Bom        | Amarelo         |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 12401 | Bom        | Azul claro      |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923     | Bom        | Branco          |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212   | Bom        | Azul turquesa   |
| Outros microrganismos           | Bom        | Creme           |

\* Inóculo 10<sup>6</sup> UFC

Certificado de Análise, FISPQ e Bula estão disponíveis no site [www.probac.com.br](http://www.probac.com.br)

#### Procedimento

Seguir conforme ilustração abaixo:



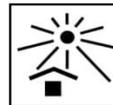
- 1) Retire a tampa plástica;
- 2) Remova o selo protetor;
- 3) Semeie a amostra de acordo com os procedimentos recomendáveis;
- 4) Tampe e incube a placa de acordo com a metodologia utilizada no laboratório.

#### Interpretação dos Resultados:



Verifique a tabela de desempenho no item controle de qualidade.

#### Conservação



Manter entre 2° e 27°C, ao abrigo da Luz.

#### Validade



10 meses a partir da data de fabricação.

#### Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Produto isento de registro no Ministério da Saúde de acordo com a RDC nº 36 de 2015, não podendo ser utilizado para diagnóstico humano.

#### Referências Bibliográficas

- 1 - Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW - Manual of Clinical Microbiology. 11<sup>th</sup> Ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.
- 2 - Koneman E.W. et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott, New York: 2016.
- 3 - Atlas R.M., Handbook of Microbiological Media. 4th ed. ASM Press, Washington, DC, 2010.

ISENTO DE REGISTRO Rev.: 00



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.  
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Cecília – São Paulo – SP  
CEP: 01224-001 Fone: 55 11 3367-4777  
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111  
Responsável Técnico: Francisco Donizeti Montagnoli CRF/SP: 47.534  
Site: [www.probac.com.br](http://www.probac.com.br) email: [probac@probac.com.br](mailto:probac@probac.com.br)

## ANEXO B – Ágar Pseudomonas

### AGAR PSEUDOMONAS



#### Indicações

Meio de Cultura indicado para recuperação seletiva e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água, através do método de filtração por membrana.

#### Apresentação



PMPAC49, PMPAC6 e PMPAC9

Meio de Cultura pronto para uso, pacote contendo 10 Placas de Petri nas medidas de 49, 60 e 90 mm.

#### Composição

Extrato de Levedura, L-Lisina HCl, Cloreto de Sódio, Xilose, Sacarose, Lactose, Vermelho de Fenol, Citrato de Ferro Amoniacal, Tiosulfato de Sódio, Sulfato de Magnésio, Kanamicina, Ácido Nalidixico, Agar Bacteriológico e Água Purificada.

#### Princípio

Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são encontrados na água e no solo. *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno humano mais importante, tanto no que se refere ao número e tipos de infecções causadas como à sua morbidade e mortalidade. Vários métodos têm sido utilizados para a enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de amostras de água, alguns dos quais têm sido mais amplamente aceitos do que outros. Os procedimentos de número mais provável (NMP) resultam em níveis de recuperação satisfatórios de *P. aeruginosa*, mas não são utilizáveis para ensaios de amostras de água de grande volume pela falta de precisão. Esta deficiência é eliminada através da técnica de membrana filtrante (MF).

Extrato de Levedura, Lisina e os carboidratos fornecem compostos carbonáceos e nitrogenados, fontes de energia e vitaminas necessárias para o metabolismo bacteriano. O Cloreto de Sódio mantém o equilíbrio osmótico. Os sais fornecem íons essenciais. O Vermelho de Fenol é um indicador de pH, que se torna amarelo em resposta a ácidos produzidos como resultado da fermentação dos carboidratos. A Kanamicina inibe a síntese protéica de microrganismos gram-positivo. O Ácido Nalidixico bloqueia a replicação das bactérias gram-positivas susceptíveis e o Agar Bacteriológico um agente solidificante.

#### Controle de Qualidade

Os seguintes resultados foram obtidos nos ensaios de desempenho do meio, com diferentes espécies de cultura após incubação em temperatura e tempo ideal. Todos os lotes são submetidos a ensaios com cepas padrões ATCC, conforme descrito na tabela a seguir:

| Cepas                           | Crescimento               | Coloração |
|---------------------------------|---------------------------|-----------|
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Bom                       | Rosa      |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922       | Inibição parcial ou total | ---       |

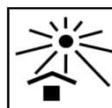
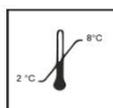
Todos os documentos pertinentes a este produto como Certificado de Análise, FISPQ e Bula estão disponíveis no site [www.probac.com.br](http://www.probac.com.br).

#### Procedimento

- 1) Colete as amostras e processe de acordo com as recomendações para quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em água;
- 2) Depois da filtração da amostra em membrana de 47 mm e 45 µm, coloque a membrana na superfície do meio evitando a formação de bolhas;
- 3) Incubar durante o período e a temperatura ideal para cada microrganismo a ser pesquisado;
- 4) Após o período de incubação, realizar a visualização das colônias.

Consulte o método padrão para informações adicionais a respeito da técnica de filtração por membrana para este meio.

#### Conservação



Manter sob refrigeração, entre 2° e 8°C ao abrigo da luz.

#### Validade



4 meses a partir da data de fabricação.

#### Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

#### Referências Bibliográficas

1. Levin and Cabelli. 1972. Appl. Microbiol. 24:864.
2. Carson, Peterson, Favero, Doto, Collins and Levin. 1975. Appl. Microbiol. 30:935.
3. Dutka and Kwahn. 1977. Appl. Environ. Microbiol. 33:240.
4. Brodsky and Ciebin. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:26.
5. Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.).1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Estevez. 1984. Lab. Med. 15:258.
7. Manual Difco and BBL Microbiology.

SOMENTE PARA USO "IN VITRO" Rev.: 03



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.  
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Cecília – São Paulo – SP  
CEP: 01224-001 Fone: 55 11 3367-4777  
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111  
Responsável Técnico: Francisco Donizeti Montagnoli CRF/SP: 47.534  
Site: [www.probac.com.br](http://www.probac.com.br) email: [probac@probac.com.br](mailto:probac@probac.com.br)

## ANEXO C – Polisenidisc Gram negativo



DIAGNÓSTICOS MICROBIOLÓGICOS ESPECIALIZADOS

Av. Antonio Cavasana, 97 - B. Concórdia III  
 CEP 16013-385 - Araçatuba/SP  
 Telefax: (18) 3621-8670 / 3621-8836  
 comercial@dme.ind.br - www.dme.ind.br  
 CNPJ: 65.013.120/0001-79

Resp. Técnico: Antonio C. De Fendi - CRBM 1005  
 Registro MS 10401600019

# POLISENSIDISC 15

APRESENTAÇÃO

Caixa contendo 25 unidades de Polisenidisc, cada unidade composta de 15 antimicrobianos específicos para cada série.

PRINCIPIO

Sistema Polisenidisc composto de um módulo circular, contendo em seu anel externo 10 antimicrobianos e anel interno 05 antimicrobianos, totalizando 15 antimicrobianos para cada série.

POLISENSIDISC DME é para ser usado em placas de Petri de 150 mm de diâmetro por 20 mm de altura.

## POLISENSIDISC DME SÉRIE GRAM NEGATIVO

Halos de inibição em mm

| Antibacteriano  | Potência/<br>Código | Resistente | Intermediário | Sensível |
|---|---------------------|------------|---------------|----------|
| Amicacina   | AMI 30              | ≤ 14       | 15-16         | ≥ 17     |
| Amoxicilina/Acido Clavulânico   | AMC 30              | ≤ 13       | 14-17         | ≥ 18     |
| Ampicilina  | AMP 10              | ≤ 13       | 14-16         | ≥ 17     |
| Aztreonam   | ATM 30              | ≤ 17       | 18-20         | ≥ 21     |
| Cefazolina parenteral para <i>Enterobacteriaceae</i>  | CFZ 30              | ≤ 19       | 20-22         | ≥ 23     |
| Cefazolina oral para <i>Enterobacteriaceae</i>  |                     | ≤ 14       | -             | 15       |
| Cefepime *  | CPM 30              | ≤ 18       | -             | ≥ 25     |
| Cefoxitina  | CFO 30              | ≤ 14       | 15-17         | ≥ 18     |
| Ceftazidima   | CAZ 30              | ≤ 17       | 18-20         | ≥ 21     |
| Ceftriaxona   | CRO 30              | ≤ 19       | 20-22         | ≥ 23     |
| Ciprofloxacina  | CIP 05              |            |               |          |
| Para <i>Enterobacteriaceae</i>  |                     | ≤ 15       | 16-20         | ≥ 21     |
| Para <i>Salmonella</i> spp extra-intestinal (incluindo <i>S. typhi</i> e <i>S. paratyphi</i> A-C) |                     | ≤ 20       | 21-30         | ≥ 31     |
| Cloranfenicol   | CLO 30              | ≤ 12       | 13-17         | ≥ 18     |
| Gentamicina   | GEN 10              | ≤ 12       | 13-14         | ≥ 15     |
| Meropenem para <i>Enterobacteriaceae</i>  | MPM 10              | ≤ 19       | 20-22         | ≥ 23     |
| Meropenem para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  |                     | ≤ 15       | 16-18         | ≥ 19     |
| Meropenem para <i>Acinetobacter</i> spp   |                     | ≤ 14       | 15-17         | ≥ 18     |
| Meropenem para <i>Burkholderia cepacia</i>  |                     | ≤ 15       | 16-19         | ≥ 20     |
| Sulfazotrim   | SUT 25              | ≤ 10       | 11-15         | ≥ 16     |
| Tetraciclina  | TET 30              | ≤ 11       | 12-14         | ≥ 15     |

\* Cefepime – 30 µg (CPM 30) – SDD (Dose – Dependente - Susceptível) = 19 mm – 24 mm.

CONSERVAÇÃO

Manter ao abrigo da luz, conservar de -15°C a -20°C.

Obs.: Os módulos deverão ser abertos no momento do uso.

Lote e Validade: Vide caixa.

Referências Bibliográficas

\* Referências CLSI 2017.

TRANSPORTE

A estabilidade do Polisenidisc permanece inalterada por até 10 dias, em temperatura de até 30°C.

**APÊNDICE**

**APÊNDICE A: TESTE DE SUSCETIBILIDADE Á ANTIMICROBIANOS**

| AMOSTRA 13          |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMI 30              | ≥ 17           | x        |               |            |
| AMC 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| AMP 10              | ≥ 17           | x        |               |            |
| ATM 30              | 17             |          |               | x          |
| CFZ 30              | ≥ 23           | x        |               |            |
| CPM 30              | 25             | x        |               |            |
| CFO 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| CAZ 30              | 22             | x        |               |            |
| CRO 30              | ≥23            | x        |               |            |
| CIP 05              | ≥21            | x        |               |            |
| CLO 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| GEN 10              | ≥ 15           | x        |               |            |
| MPM 10              | 15             |          |               | x          |
| SUT 25              | ≥ 16           | x        |               |            |
| TET 30              | ≥ 15           | x        |               |            |

| AMOSTRA 13          |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMI 30              | ≥ 17           | x        |               |            |
| AMC 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| AMP 10              | ≥ 17           | x        |               |            |
| ATM 30              | 17             |          |               | x          |
| CFZ 30              | ≥ 23           | x        |               |            |
| CPM 30              | 25             | x        |               |            |
| CFO 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| CAZ 30              | 22             | x        |               |            |
| CRO 30              | ≥23            | x        |               |            |
| CIP 05              | ≥21            | x        |               |            |
| CLO 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| GEN 10              | ≥ 15           | x        |               |            |
| MPM 10              | 15             |          |               | x          |
| SUT 25              | ≥ 16           | x        |               |            |
| TET 30              | ≥ 15           | x        |               |            |

| AMOSTRA 1           |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMI 30              | 28             | x        |               |            |
| AMC 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| AMP 10              | 27             | x        |               |            |
| ATM 30              | 16             |          |               | x          |
| CFZ 30              | 14             |          |               | x          |
| CPM 30              | ≥ 25           | x        |               |            |
| CFO 30              | ≥ 18           | x        |               |            |
| CAZ 30              | ≥ 21           | x        |               |            |
| CRO 30              | ≥ 23           | x        |               |            |
| CIP 05              | ≥ 21           | x        |               |            |
| CLO 30              | ≤ 12           |          |               | x          |
| GEN 10              | 26             | x        |               |            |
| MPM 10              | ≥ 23/19/18/20  | x        |               |            |
| SUT 25              | 21             | x        |               |            |
| TET 30              | ≥ 15           | x        |               |            |

| AMOSTRA 6 III       |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMI 30              | 29             | x        |               |            |
| AMC 30              | 23             | x        |               |            |
| AMP 10              | 19             | x        |               |            |
| ATM 30              | ≥ 21           |          |               | x          |
| CFZ 30              | 25             | x        |               |            |
| CPM 30              | 15             |          |               | x          |
| CFO 30              | 30             | x        |               |            |
| CAZ 30              | ≤ 17           |          |               | x          |
| CRO 30              | 12             |          |               | x          |
| CIP 05              | 34             | x        |               |            |
| CLO 30              | 15             |          | x             |            |
| GEN 10              | 26             | x        |               |            |
| MPM 10              | 40             | x        |               |            |
| SUT 25              | 36             | x        |               |            |
| TET 30              | 30             | x        |               |            |

| AMOSTRA 5           |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMI 30              | 34             | x        |               |            |
| AMC 30              | ≤ 13           |          |               | x          |
| AMP 10              | 14             |          | x             |            |
| ATM 30              | ≥ 21           |          |               | x          |
| CFZ 30              | ≤ 14           |          |               | x          |
| CPM 30              | 18             |          |               | x          |
| CFO 30              | 28             | x        |               |            |
| CAZ 30              | ≤ 17           |          |               | x          |
| CRO 30              | 38             | x        |               |            |
| CIP 05              | 34             | x        |               |            |
| CLO 30              | ≤ 12           |          |               | x          |
| GEN 10              | 35             | x        |               |            |
| MPM 10              | 11             |          |               | x          |
| SUT 25              | 35             | x        |               |            |
| TET 30              | 18             | x        |               |            |

| AMOSTRA 6 I         |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMC 30              | 34             |          |               |            |
| VAN 30              | 21             |          |               |            |
| IPM 10              | 37             |          |               |            |
| AMP                 | 28             |          |               |            |

| AMOSTRA 2           |                |          |               |            |
|---------------------|----------------|----------|---------------|------------|
| Antimicrobiano (µg) | Resultado (mm) | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMC 30              | 33             |          |               |            |
| VAN 30              | 23             |          |               |            |
| IPM 10              | 39             |          |               |            |
| AMP 10              | 27             |          |               |            |