

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES

**QUALIDADE E DIVERSIDADE MICROBIANA DA ÁGUA OBTIDA PELO
SISTEMA DE PURIFICAÇÃO INSTALADO NO PRÉDIO DOS
LABORATÓRIOS DE QUALIDADE E SEGURANÇA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A474q
2013 Alves, Roberta Barbosa Teodoro, 1984-
Qualidade e diversidade microbiana da água obtida pelo
sistema de purificação instalado no prédio dos Laboratórios de
Qualidade e Segurança de Alimentos / Roberta Barbosa Teodoro
Alves. – Viçosa, MG, 2013.
x, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Nélcio José de Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia. 2. Água - Qualidade. 3. Água -
Purificação. 4. Biologia molecular. 5. Termodinâmica. 6. Água
- Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES

**QUALIDADE E DIVERSIDADE MICROBIANA DA ÁGUA OBTIDA PELO
SISTEMA DE PURIFICAÇÃO INSTALADO NO PRÉDIO DOS
LABORATÓRIOS DE QUALIDADE E SEGURANÇA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2013.

Prof.^a Patrícia Campos Bernardes

Prof.^a Ana Clarissa dos Santos Pires

Prof.^a Edimar Aparecida Filomeno Fontes
(Coorientadora)

Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, criador de todas as coisa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Nélio José de Andrade pela orientação, paciência e ensinamentos.

As Professora Edimar pela disponibilidade.

A Professora Regina pela contribuição.

Aos Professores Antônio Fernandes e Monique pela colaboração e sugestões para o trabalho.

Aos meus pais por acreditarem na concretização deste trabalho.

A minha irmã Laís e ao Vinícius pela amizade.

Aos meus colegas de Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos: Patrícia, Hiasmyne, João, Jackline, Evenlyn e Cássio.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a José Tomaz e Ademir pela ajuda.

Agradeço a ajuda na realização deste trabalho e anseio retribuir a todos.

BIOGRAFIA

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES, filha de Fernando Antônio Teodoro Alves e Suely Rodrigues Barbosa Teodoro Alves, nasceu em Ipanema, Minas Gerais, em 22 de abril de 1984.

Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de Farmácia na Universidade Vale do Rio Doce, graduou-se em dezembro de 2006.

Em agosto de 2009, concluiu o curso de Pós-Graduação *Lato Sensu*, especialização em Farmácia Magistral Alopática pelo Centro Universitário Newton Paiva.

Atuou como Farmacêutica Magistral até setembro de 2010. Também atuou como consultora na indústria de cosméticos.

Em agosto de 2011, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos submetendo-se a defesa da dissertação em dezembro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1	4
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA OBTIDA E DISTRIBUÍDA POR UM SISTEMA DE PURIFICAÇÃO.....	4
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Definições.....	4
1.2. Padrões de qualidade da água purificada.....	4
1.3. Contaminantes presentes na água potável	5
1.3.1. Contaminantes químicos: inorgânicos	5
1.3.2. Contaminantes químicos: orgânicos.....	7
1.3.3. Contaminantes microbiológicos	8
1.4. Tecnologias empregadas para obtenção de água purificada	8
1.4.1. Tratamento de água por filtração em carvão ativado	9
1.4.2. Tratamento de água por tecnologia de microfiltração.....	11
1.4.3. Tratamento de água por tecnologia de osmose reversa.....	12
1.4.4. Tratamento de água por sistema de eletrodeionização.....	13
1.4.5. Tratamento de água com radiação ultravioleta	13
1.5. Distribuição e armazenamento para água purificada.....	14
1.6. Higienização do sistema de purificação de água.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Sistema de purificação de água Elix 35 [®] Millipore	17
2.1.1. Descrição do processo de purificação de água pelo sistema Elix 35 [®] .	20
2.2. Avaliação da qualidade da água potável e purificada	21
2.3. Análises físico-químicas.....	22
2.3.1. Alcalinidade	23
2.3.2. Cálcio	23
2.3.3. Cloro residual livre	24

2.3.4. Condutividade elétrica.....	24
2.3.5. Dureza	24
2.3.6. Índice de saturação de Langelier	25
2.3.7. pH e temperatura	25
2.3.8. Sílica.....	25
2.3.9. Sólidos totais dissolvidos	26
2.3.10. Substâncias oxidáveis.....	26
2.3.11. Turbidez	27
2.4. Análises microbiológicas	27
2.4.1. Água potável e água purificada distribuída.....	27
2.4.2. Água purificada	28
2.5. Procedimento de higienização do sistema de purificação de água.....	29
2.6. Análises estatísticas.....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Avaliação da qualidade da água de alimentação (potável)	31
3.1.1. Alcalinidade e dureza	32
3.1.2. Condutividade	33
3.1.3. Índice de Saturação de Langelier	34
3.1.4. pH.....	35
3.1.5. Sílica.....	36
3.1.6. Análises microbiológicas	37
3.2. Análises físico-químicas e microbiológicas da água purificada obtida pelo sistema Elix 35®	38
3.3. Análises físico-químicas e microbiológicas da água purificada distribuída	39
3.3.1. Condutividade	41
3.3.2. pH.....	42
3.3.3. Sílica, sólidos totais e substâncias oxidáveis	43
3.3.4. Análises microbiológicas	44
3.4. Higienização do sistema de purificação de água	47
4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 2.....	56

DIVERSIDADE BACTERIANA E HIDROFOBICIDADE DOS ISOLADOS DO SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA.....	56
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1. Isolamento das bactérias da água potável e água purificada.....	59
2.2. Identificação genética dos isolados bacterianos.....	59
2.2.1. Extração de DNA das amostras.....	59
2.2.2. Amplificação parcial do gene 16S rDNA	60
2.3. Sequenciamento do produto amplificado na PCR	61
2.4. Determinação da energia livre de Gibbs e hidrofobicidade das superfícies	61
2.4.1. Medida do ângulo de contato para a superfície.....	61
2.4.2. Medida do ângulo de contato para micro-organismos	62
2.4.3. Cálculos para a determinação da energia livre de interação hidrofóbica (ΔG^{TOT}) e energia livre de Gibbs de adesão entre as superfícies ($\Delta G_{adesão}$)	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1. Isolamento das bactérias da água potável e água purificada.....	66
3.2. Análise das sequências de 16S rDNA.....	67
3.3. Energia livre de interação hidrofóbica (ΔG^{TOT}).....	71
3.3.1. Energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$)	72
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
3. CONCLUSÃO GERAL.....	81
4. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82

RESUMO

ALVES, Roberta Barbosa Teodoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Qualidade e diversidade microbiana da água obtida pelo sistema de purificação instalado no prédio dos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Edimar Aparecida Filomeno Fontes e Antônio Fernandes de Carvalho.

A água purificada exerce um papel fundamental na rotina laboratorial e em diversas aplicações, exigindo elevado grau de pureza. Deste modo, foi realizada uma avaliação da qualidade da água distribuída pelo sistema de purificação de água instalado nos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. A primeira parte do trabalho aborda a qualidade físico-química e microbiológica da água potável que alimenta o sistema de purificação e também a qualidade da água obtida e distribuída nos pontos de uso. A instalação e as condições de operação e desempenho do sistema de purificação de água foram avaliados. A avaliação da água potável que abastece o sistema de purificação permitiu constatar uma boa qualidade, tanto para as especificações físico-químicas (alcalinidade $20,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, condutividade $62,7 \text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, cloro residual livre $0,84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,17, temperatura 25°C , índice de saturação de Langelier -3,76, dureza $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, e sílica $15,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ SiO}_2$) quanto microbiológicas ($1,24 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$). A água purificada obtida pelo sistema esteve sempre de acordo com as especificações físico-químicas e microbiológicas estabelecidas pelo fabricante do equipamento e pela Farmacopeia Brasileira. A água purificada distribuída foi aprovada nas especificações físico-químicas, porém o nível de contagem de bactérias heterotróficas estava acima do permitido ($>2 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$), o que pode comprometer alguns resultados analíticos dos laboratórios. Foi verificado ainda que higienização do reservatório de água potável e do reservatório de água purificada deve ser feita a cada 6 meses, uma vez que os resultados deste procedimento mostraram redução significativa ($p<0,05$) na contagem de bactérias heterotróficas. Além disso, o sistema deve apresentar manutenção e reposição dos elementos filtrantes e acessórios do equipamento. A segunda parte do estudo teve como objetivo identificar os isolados bacterianos por meio de técnicas moleculares. Com o sequenciamento do gene ribossômico 16S rDNA, as espécies identificadas na água potável foram *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia fergusonii* e *Enterobacter cloacae* subsp. Dissolvens. Na água purificada, foram encontradas as espécies *Acinetobacter calcoaceticus* e *Staphylococcus warneri* e na água distribuída, *Enterococcus faecium* e *Enterobacter cloacae* subsp. Dissolvens. A superfície dos isolados identificados foi

submetidas à medida do ângulo de contato, com intuito de fazer a previsão teórica da adesão em função da hidrofobicidade das superfícies dos micro-organismos e da superfície do *Loop* de distribuição. As espécies e a superfície estudadas foram consideradas hidrofílicas. A adesão não foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{\text{adesão}} > 0$) entre a superfície e todas as espécies identificadas. Os resultados de predição termodinâmica foram compatíveis com as contagens de bactérias heterotróficas da superfície de polipropileno (*loop* de distribuição) que atingiram valores de aproximadamente $5 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, indicando que não se caracteriza como biofilmes.

ABSTRACT

ALVES, Roberta Barbosa Teodoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2013. **Microbial diversity and quality of water obtained by purification system installed in the building of Quality and Food Safety Laboratories.** Adviser: Nélcio José de Andrade. Co-Advisers: Edimar Aparecida Filomeno Fontes and Antônio Fernandes de Carvalho.

Purified water exerts a fundamental role in routine clinical practice and in many applications requiring high purity. Thus, an assessment of the quality of the water distributed by water purification system installed in the Laboratory of Quality and Food Safety of the Department of Food Technology at UFV was performed. The first part of the paper deals with physical-chemical and microbiological quality of drinking water that feeds the purification system and the quality of water produced and distributed at points of use. The installation and operating conditions and performance of the water purification system were evaluated. The evaluation of drinking water supply purification system have revealed a good quality for both the physical and chemical specifications (alkalinity $20,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, conductivity $62,7 \text{ } \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, chlorine $0,84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6,17, temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Langelier Saturation Index -3,76, hardness $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ and silica $15,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ SiO}_2$) and microbiological ($1,24 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). The purified water produced by the system always in accordance with the specifications established by the equipment manufacturer. Purified water distributed showed the physicochemical requirements within the allowed, but the levels of heterotrophic bacteria counts were higher than allowed ($> 2 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), which may compromise some analytical results performed in laboratories. It was found, although cleaning of drinking water reservoir and the reservoir of purified water should be performed every 6 months, once the results of this procedure showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the count of heterotrophic bacteria. In addition, the system shall provide the maintenance and replacement of filter elements and equipment accessories. The second part of the study aimed to identify the bacterial isolates using molecular techniques. With the sequencing of the ribosomal 16S rDNA species identified in drinking water were *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter cloacae* subsp. Dissolvens. Purified water the *Acinetobacter calcoaceticus* species were found; *Staphylococcus warneri* and distributed water *Enterococcus faecium* and *Enterobacter cloacae* subsp. Dissolvens. The surface of the isolates identified were subjected to measurement of contact angle, in order to realize the theoretical prediction of membership

depending on the hydrophobicity of the micro-organisms and the surface of the Loop distribution. The species studied were considered and the surface hydrophilic. Adherence was not thermodynamically favorable ($\Delta G_{\text{adhesion}} > 0$) between the surface and all identified species. The species studied were considered and the surface hydrophilic. Adherence was not thermodynamically favorable ($\Delta G_{\text{membership}} > 0$) between the surface and all identified species. The results of thermodynamic prediction were consistent with heterotrophic bacteria counts the surface of polypropylene (loop distribution) which reached values of approximately $5 \log_{10} \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$ indicating that it is characterized as biofilms.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Embora a água potável seja adequada para consumo humano, conforme a Portaria MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 2012), somente isso não garante condições de utilização em instalações industriais, equipamentos, preparação de medicamentos e certos tipos de alimentos.

Ao contrário de outras matérias primas, as características da água podem variar, consideravelmente, em aspectos como sazonalidade, região geográfica etc. Deste modo, é necessário que a água passe por algum tratamento adicional quando utilizada em laboratório, fins industriais, ou qualquer atividade que necessite de um grau de pureza elevado, e que venha a atender as exigências dos órgãos competentes (PENNA, MARTINS; MAZZOLA, 2002).

A água é um dos componentes mais utilizados em protocolos experimentais e em praticamente todos os tipos de aplicações em laboratório, tais como reconstituição de reagentes, diluição, soluções brancas ou padrões, soluções tampão, preparação de meios de cultura, alimentação de analisadores automatizados, lavagem, sanitização de equipamentos específicos. Portanto, a água purificada precisa ser controlada qualitativamente para reduzir erros potenciais dos analíticos (ISHII, 2011).

A qualidade da água entregue ao laboratório é tão importante quanto a de qualquer reagente, já que existem interferências em diversos testes, como, por exemplo, a presença de enzimas liberadas por bactérias interfere nas análises de biologia molecular e imunoenaios (MENDES et al., 2011).

A água purificada é um item indispensável nos laboratórios de pesquisa e ensino, sendo, assim, necessário um equipamento e/ou sistema para obtenção deste componente.

A sede do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) encontra-se no campus da Universidade Federal de Viçosa onde são desenvolvidas pesquisas, que culminam em diversos artigos técnicos-científicos publicados em periódicos nacionais e internacionais, teses de doutorado, dissertações de mestrado e tecnologias para a elaboração de vários produtos. Além disso, são desenvolvidos projetos de extensão e de assistência técnica para empresas e órgãos privados e governamentais.

Nos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos do DTA, a rotina laboratorial demanda água em grau de pureza superior àquele encontrado no fornecimento urbano, por isso foi instalado um sistema de purificação. O equipamento Elix 35[®] produz água tipo II. Instalado em 2011, o sistema substituiu o processo de destilação como alternativa de melhor custo/benefício. Trata-se de uma combinação de

tecnologias de purificação composta por sistema de pré-tratamento Progard TL1[®], osmose reversa avançada, eletrodeionização (módulo ELIX[®]) e lâmpada de UV 254 nm.

Assim os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Conhecer a qualidade da água potável que alimenta o sistema de purificação;
- 2) Conhecer e avaliar a qualidade da água produzida pelo sistema instalado nos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos, por meio do monitoramento da água purificada nos pontos de distribuição;
- 3) Identificar e caracterizar as várias espécies de bactérias presentes na água do sistema de purificação por meio de técnicas moleculares;
- 4) Determinar a energia livre de interação hidrofóbica da superfície do *loop* de distribuição de água e das bactérias isoladas da água, bem como calcular a energia livre de adesão entre as superfícies.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jan., 2012.

ISHII, N. Optimal purification technology of ultrapure water for instrumental analysis. **Bunseki Kagaku**, v. 60, n. 2, p. 103-113. 2011.

MENDES, M.; FAGUNDES, C. C.; PORTO, C.C.; BENTO, L.C.; COSTA, T.G.R.; SANTOS, R.A; SUMITA, N. A importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47. n. 3. p. 217-223. 2011.

PENNA, T.C.V.; MARTINS, A.M.S; MAZZOLA, P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. **BioMedCentral Public Health**, v. 2:13, p.1-11.2002.

CAPÍTULO 1

AValiação da Qualidade da Água Obtida e Distribuída por um Sistema de Purificação

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definições

Em muitos compêndios oficiais para análises microbiológicas ou físico-químicas de alimentos, especifica-se o tipo de água a ser utilizada nos respectivos métodos. Já em algumas metodologias, não é especificado o tipo de água a ser utilizado, o que pode levar a erros analíticos pelo uso indevido de uma água sem qualidade adequada.

A Farmacopeia Brasileira (2010) define a água reagente como sendo “produzida por um ou mais processos, como destilação simples, deionização, filtração, descloração ou outro, adequados às características específicas de seu uso”. A água reagente é empregada na limpeza de materiais e de equipamentos e aplicada no abastecimento de equipamentos, autoclaves e banho-maria.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a água purificada “é a água potável que passou por algum tipo de tratamento para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos”. É preparada por uma combinação de tecnologias de purificação, tais como destilação; deionização; osmose reversa; eletrodeionização; ultrafiltração ou por outro processo. É empregada na lavagem de material, preparo de soluções reagentes, meios de cultura, tampões, diluições diversas, microbiologia em geral, técnicas por Elisa ou radioimunoensaio e aplicações diversas na maioria dos laboratórios, principalmente em análises qualitativas ou quantitativas menos exigentes.

1.2. Padrões de qualidade da água purificada

A água purificada é indispensável em organizações científicas, indústrias, no controle de qualidade de matérias-primas, produção de medicamentos, alimentos, bebidas e testes laboratoriais. Assim, normas técnicas sobre a qualidade da água foram estabelecidas. Para atender a crescente sensibilidade exigida em suas pesquisas, várias

entidades científicas e organizações profissionais têm definido padrões de qualidade de água.

Esses grupos, nos Estados Unidos, incluem o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *College of American Pathologists* (CAP), *Association for Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI), *American Chemical Society* (ACS), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Public Health Association* (APHA) e a *United States Pharmacopeia* (USP).

Podem ser citados, entre outros, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ISO (*International Organization for Standardization*) (BREDA, 2001). No Brasil, a Farmacopeia Brasileira, publicação da ANVISA, especifica padrões de qualidade da água purificada.

Atualmente, a maior dificuldade para os usuários é determinar qual tipo de água purificada utilizar em cada processo laboratorial (ELGA, 2012).

A Tabela 1 mostra um resumo das principais características consideradas para a água purificada pelas principais autoridades e organizações.

1.3. Contaminantes presentes na água potável

Existem diferentes tipos de impurezas na água de alimentação que entram no sistema de tratamento de água purificada, cuja remoção é de fundamental importância para preservar a vida útil dos aparelhos, bem como dos filtros e não sobrecarregar o sistema (SILVA, 2006).

Os contaminantes da água são constituídos por dois grandes grupos: químico e microbiológico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.3.1. Contaminantes químicos: inorgânicos

Os contaminantes inorgânicos têm origens diversas na extração de materiais com os quais ela entra em contato como íons cálcio e magnésio dissolvidos; silicatos lixiviados de leitos arenosos de rios; íons ferroso e férrico liberados de superfícies de ferro e íons cloreto e fluoreto das estações de tratamento de água. Também a absorção de gases da atmosfera como o dióxido de carbono, que se ioniza na água e forma ácido carbônico. Além, de resíduos de produtos utilizados na limpeza (fosfatos de detergentes) e resíduos poluentes como nitratos de fertilizantes, íons alumínio, manganês e cobre.

Tabela 1- Principais características em água purificada

	ISO 3696 (1987)			ASTM (D1193-91)				CLSI (2006)		Pharmacopeias			Farmacopeia Brasileira (2010)		APHA (2005)		
Características	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	CLRW	SRW	USP (30)	BP (2009)	Reagente Purificada	Ultra purificada	Alta	Médio	Baixo	
Resistividade $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ (25°C)	10	10	0,2	18	1,0	0,25	0,2	10	-	> 0,77	> 0,23	> 0,2	> 1,0	> 18,0	>10,0	> 1,0	0,1
Condutividade $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ (25°C)	0,1	1,0	5,0	0,056	1,0	4,0	5,0	0,1	-	<1,3	<4.3 (20 °C)	<5,0	1,3	< 0,1	<0,1	<1,0	10,0
pH (25 °C)	-	-	5,0-7,5	-	-	-	5,0-8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbono Orgânico Total $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	-	-	-	0,05	0,05	0,2	NL	0,5	0,05	<0,5	<0,5	< 0,20	< 0,50	< 0,05	-	-	-
Sólidos Totais $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	-	1	2	-	-	-	-	**	**	-	10	-	-	-	-	-	-
Sílica SiO_2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0,01	0,02	NS	0,003	0,003	0,5	NL	-	-	-	-	-	-	-	<0,05	<0,1	<1,0
UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$ Bactérias Heterotróficas	-	-	-	Tipo A* 1	Tipo B* 10	Tipo C* 1000	-	10	10	<100	<100	-	<100	< 1*	<10	<1000	-

Legenda

NS- Não especificado

NL- Nenhum Limite

* UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ** Filtro de 0,22 μm ISO- *International Organization for Standardization*APHA- *American Public Health Association*CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*CLRW- *Clinical Laboratory Reagent Water*SRW- *Special Reagent Water*

A forma mais simples de verificar estas substâncias inorgânicas é realizar a medida direta da condutividade ou da resistividade elétrica. A maioria das substâncias inorgânicas dissolvidas tem carga elétrica, positiva (cátions) ou negativa (ânions), e gera corrente elétrica quando os eletrodos são mergulhados na água e é aplicada uma voltagem (BREDA, 2001).

A resistividade não é uma medida absoluta de concentração de impureza iônica, mas um método efetivo para monitoramento dos níveis de impureza iônica e devendo ser feitas diariamente conforme descrito nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

1.3.2. Contaminantes químicos: orgânicos

Os compostos orgânicos na água de alimentação podem ser de fonte natural e sintética. De fonte natural, são oriundos principalmente da decomposição da matéria orgânica, além de bactérias e outros seres vivos e seus subprodutos. Os compostos orgânicos de fontes sintéticas incluem resíduos industriais, lixo doméstico como detergentes, solventes, produtos agroquímicos, como os fertilizantes, herbicidas e pesticidas. Outros compostos são gerados por reações com produtos químicos decorrente de tratamento como o cloro (WHITEHEAD, 2003).

A análise de carbono orgânico total (COT) é necessária para monitorar os níveis de contaminação por impurezas orgânicas e auxiliar no controle dos processos de purificação e distribuição. A análise do COT deve ser realizada mensalmente para garantir a ausência de moléculas orgânicas (CLSI, 2006).

O carbono orgânico assimilável (AOC) é a porção do carbono orgânico total que pode ser utilizada pelos organismos aquáticos para sua multiplicação, constituindo uma fração de 0,1 a 9 % do COT. A quantidade de $73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AOC pode prover nutrientes suficientes para suportar o crescimento de $3,5 \times 10^5$ bactérias por mL de água (SILVA, 2006).

A especificação de COT é incluída por causa da contaminação da água purificada, pois pode ser uma fonte de interferências, por exemplo, inativar reagentes por ação enzimática (CLSI, 2006).

A Tabela 2 apresenta os valores médios de COT esperados para as principais tecnologias de purificação de água.

Tabela 2 - Valores típicos de carbono orgânico total em água.

Tipo de purificação	Faixa esperada de COT (mg·L ⁻¹)
Água potável	0,5 a 7,0
Destilação	Cerca de 0,10
Deionização	0,05 a 0,50
Osmose Reversa	0,04 a 0,10
Osmose reversa + Deionização	0,01 a 0,05
Tecnologias Combinadas	0,003 a 0,005
Tecnologias Combinadas + Oxidação UV	<0,002

Fonte: Farmacopeia Brasileira, (2010).

1.3.3. Contaminantes microbiológicos

A água de mananciais contém uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, protozoários, algas, sendo um grande desafio à qualidade da água. Por este motivo, deve receber intensivo tratamento para sua remoção.

A contaminação bacteriana nos sistemas de purificação é originária da própria microbiota da fonte de água podendo levar à formação de biofilmes e, por consequência, instalar um ciclo contínuo de crescimento a partir de compostos orgânicos que são os próprios nutrientes para os micro-organismos (SILVA, 2006).

A presença de bactérias na água purificada pode afetar a qualidade da água por inativar reagentes ou alterar substratos por ação enzimática, aumentar o conteúdo em COT, alterar a linha de base (ruído de fundo) em análises espectrais e produzir pirogênios e endotoxinas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As metodologias utilizadas para a quantificação de bactérias heterotróficas em água são as técnicas *pour plate*, *spread plate* e membrana filtrante com porosidade de 0,45 µm, para posterior cultura em meios adequados (MENDES et al., 2011).

1.4. Tecnologias empregadas para obtenção de água purificada

A água potável, como diretriz fundamental, é o ponto de partida para qualquer processo de purificação. A água potável é obtida pelo tratamento da água retirada de mananciais, utilizando processos adequados para atender às especificações da legislação brasileira relativa às características físico-químicas, microbiológicas e radioativas para

um determinado padrão de potabilidade, que deve estar de acordo com a Portaria MS nº 2.914 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2012).

Para se tornar adequada na utilização no laboratório ou em uma indústria, a água deve passar por um processo de purificação para a eliminação de seus contaminantes, tornando-se água purificada. É necessário que todo o sistema de obtenção, armazenamento e distribuição seja devidamente validado e monitorado quanto às características físico-químicas e microbiológicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Existem vários processos de purificação para remoção de impurezas. Sua efetividade está ligada ao tipo de contaminante a ser tratado e o tipo de aplicação em que a água será usada. Porém, não existe uma única tecnologia capaz de remover todos os tipos de contaminantes presentes na água (STEWART, 2000). Por isso, é necessário recorrer a uma combinação de tecnologias associando suas vantagens a fim de se obter uma água com a qualidade requerida (SILVA, 2006).

A tecnologia atual permite a utilização de vários processos de purificação de água, que incluem deionização, destilação, osmose reversa, microfiltração, ultrafiltração, filtração com carvão ativado, oxidação com radiação ultravioleta, adsorção orgânica ou outros procedimentos adequados (BREDA, 2001; APHA, 2005).

Na Tabela 3 encontra-se a comparação de eficiência e remoção de contaminantes nas diversas tecnologias de purificação de água.

Determinadas medidas anteriores e posteriores ao processo de purificação da água podem ser necessárias para melhorar a eficiência do processo de purificação, como exemplo, instalação de filtros prévios ao sistema de purificação, manutenções preventivas e higienizações do reservatório de água. O resultado efetivo na produção de água purificada é devido aos equipamentos utilizados e à sua manutenção correta (MENDES et al., 2011).

1.4.1. Tratamento de água por filtração em carvão ativado

A filtração é um processo de separação de partículas contaminantes presentes na água por meio da utilização de um material poroso. O carvão ativado é usado para remover biocidas oxidantes (cloro) e compostos orgânicos da água (CLSI, 2006; APHA, 2005).

Tabela 3- Efetividade de várias tecnologias de purificação de água

Tecnologias de Purificação	Contaminantes							Observação
	Sílica	Íons	Gases	Substâncias orgânicas	Partículas	Bactérias	Endotoxinas	
Destilação	RA	B	R	B	E	E	E	Alto custo e consumo de energia
Deionização	E	E Remove eficientemente	RA	R	R Acúmulo de fragmentos nas resinas	R Acúmulos nas camadas	R	Saturação rápida das resinas de troca iônica necessita regeneração
Eletrodeionização	R	E Remove Continuamente	R	R	R	Inibição do crescimento microbiano por eletricidade	R	Remove íons inorgânicos, porém não remove partículas e matéria orgânica
Osmose reversa	B	B Remove 90-95%	R	E	E	E	E	Membranas sujeitas a incrustações e obstruções à longo prazo
Carvão Ativado	R	R	R	E	R Acúmulos nas camadas	R Acúmulo no Carvão	R	Adequado para remoção de cloro e compostos orgânicos
Microfiltração	R	R	R	R	E	E*	R	Adequado para remoção de partículas e
Ultrafiltração	RA	RA	R	R	E	E	E	Adequado para remoção de endotoxinas
Ultravioleta 185 nm	RA	R	R	B	R	B	R	
Ultravioleta 254 nm	R	R	R	R	R	B	R	Danifica o mecanismo de replicação, sem remoção dos micro-organismos

E - EXCELENTE (capacidade de remoção quase total)

B - BOA (capacidade de remoção de larga porcentagem)

RA - RAZOÁVEL

R - RUIM (capacidade de remoção pequena ou incapaz de remover)

Fonte: Adaptado ISHII, (2011); APHA (2005).

* Filtros de 0,05 a 0,22 µm

Os filtros de carvão removem o cloro e substâncias orgânicas dissolvidas por adsorção, (BREDA, 2001) em virtude de interações eletrostáticas e atrações fracas (forças de Van der Waals e polar) (CLSI, 2006).

É um processo utilizado como uma etapa de pré-tratamento. O filtro de carvão ativado é colocado nos sistemas de purificação de água antes da osmose reversa e antes da deionização, visto tanto as membranas de osmose quanto as resinas de troca iônica são sensíveis ao cloro e podem ser colmatadas pela matéria orgânica dissolvida (CARTWRIGHT, 1987; BREDA, 2001; CLSI, 2006).

O carvão ativado não remove todos os compostos orgânicos na água, mas seu uso produz uma considerável redução de COT. O tempo necessário e a eficiência para remover compostos orgânicos dependem da natureza dos contaminantes orgânicos, da estrutura e das características físicas do carvão (APHA, 2005; CLSI, 2006).

O carvão ativado tem uma porosidade e uma grande área interfacial de contato, assim, substâncias inorgânicas e orgânicas podem acumular e proporcionar o crescimento e adesão de micro-organismos (CLSI, 2006).

O uso de carvão ativado requer, portanto, meios para sanitização. O controle efetivo da proliferação microbiana nos filtros de carvão é, por outra parte, difícil e de altos custo. Atualmente não existe uma via completamente satisfatória para controlar o desenvolvimento microbiano. A sanitização periódica com água quente a 90 ° C por 90 min é uma prática aceitável, porém é necessário que a carcaça que contém o carvão seja capaz de suportar a temperatura da água (UNITEK, 2012).

1.4.2. Tratamento de água por tecnologia de microfiltração

Essa tecnologia utiliza membranas microporosas, sendo utilizada para remover sólidos em suspensão como partículas de carvão do filtro de carvão ativado, fragmentos de resina do sistema de deionização e bactérias que possam ter penetrado no sistema (CARTWRIGHT, 1997).

Os filtros de 1 µm a 50 µm são utilizados como proteção para equipamentos, por exemplo, osmose reversa ou uma nanofiltração e os filtros de 0,05 µm a 0,22 µm são usados para reter micro-organismos e finas partículas (CLSI, 2006).

Algumas substâncias podem ficar aderidas nos filtros (principalmente substâncias de origem orgânica ou microbiana), sendo necessário recorrer à aplicação de retrolavagem com limpadores químicos, que variam dependendo do processo considerado. O meio filtrante é construído em polipropileno, celulose, fibra de vidro e

nylon; acetatos de celulose (CA), poliacrilonitrilo, policarbonato e polissulfona. A polisulfona apresenta uma vantagem especial, pois resiste a uma temperatura de até 93 °C, e pH variando de 0,5 até 13 e a uma grande variedade de agentes químicos (UNITEK, 2012).

1.4.3. Tratamento de água por tecnologia de osmose reversa

A osmose reversa é uma tecnologia de purificação baseada no processo de passagem da água através de uma membrana semipermeável em um sistema de alta pressão (CASTANHEIRA, 2010). Este processo pode remover íons, micro-organismos e endotoxinas bacterianas, turbidez, compostos orgânicos, pesticidas e a maioria dos contaminantes presentes na água, porém não é efetivo na remoção de muitos dos gases dissolvidos, como o dióxido de carbono (TAYLOR, JACOBS, 1996; CLSI, 2006; BERESCHENKO, 2010).

A técnica empregada remove 90% a 99% da maioria dos contaminantes (CARTWRIGHT, 1997; MACÊDO, 2007). No entanto, diversos fatores como pH, pressão diferencial ao longo da membrana, temperatura, tipo do polímero da membrana e a própria construção dos cartuchos de osmose reversa podem afetar consideravelmente essa separação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As membranas de poliamida podem operar numa faixa de temperatura entre 0 e 35 °C e pH entre 4 e 11, porém agentes oxidantes como cloro são prejudiciais às membranas (CLSI, 2006).

Durante o processo, a água de alimentação é bombeada, passa pela membrana de OR sob pressão (4×10^5 Pa a 15×10^5 Pa) e forma o *permeado*. Os contaminantes se acumulam na água residual, chamada de *concentrado*. A razão entre o volume de permeado e o volume de água de alimentação é referido como o de *recuperação*, sendo utilizado para descrever a eficiência de operação de um sistema, estando relacionada ao potencial de formação de incrustações. A operação de um sistema de baixa recuperação irá reduzir incrustações nas membranas, especialmente incrustações que resultam da precipitação dos sais de baixa solubilidade. Entretanto, as recuperações de 75% são possíveis, dependendo da qualidade da água de alimentação e utilização de pré-tratamento.

Para aumentar a vida útil das membranas de osmose reversa, é necessário controlar e prevenir a formação de incrustações provenientes de sais de cálcio, magnésio e outros, e de biofilme, fonte crítica de contaminação microbiana (FARMACOPEIA

BRASILEIRA, 2010). O pré-tratamento da água de alimentação é imprescindível. A utilização de filtros microporosos e carvão ativado é geralmente necessária para proteger as membranas de partículas, metais e cloro livre, e, em paralelo, deve-se fazer, periodicamente, a sanitização das membranas (CLSI, 2006).

É necessária a análise prévia da qualidade da água potável (alimentação) para elaboração de quais pré-tratamentos serão utilizados. A forma mais eficaz para evitar a precipitação de sais é a operação da membrana dentro de limites que impeçam que as concentrações de sais retidos atinjam valores próximos aos limites de solubilidade.

1.4.4. Tratamento de água por sistema de eletrodeionização

O sistema de eletrodeionização é uma tecnologia que combina resinas de troca iônica e membranas íon-seletivas com corrente direta para remover íons de forma contínua, isso é, sem necessidade de parada para regeneração das resinas (CLSI, 2006).

O processo da remoção de íons é contínuo, em que a água corre em canais, migra para o canal do eletrodo, atravessa membranas permeáveis a ânions e cátions e, por fim, passa pelo canal de concentração. O campo elétrico criado remove os íons através de canais por onde transitam e ficam concentrados, enquanto o produto transita por outro canal e é estocado (MENDES et al., 2011).

1.4.5. Tratamento de água com radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta é utilizada em sistemas de purificação de água para promover dois efeitos: bactericida, no comprimento de onda 254 nm, e oxidação de contaminantes orgânicos a 185 nm (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Em contato com a luz, os micro-organismos são inativados pela luz UV (na faixa de 250 a 270 nm), resultado do dano fotoquímico ao DNA microbiano e de enzimas (RNA polimerase), afetando o mecanismo de replicação, porém não removendo os micro-organismos (Figura 1). É utilizada na recirculação da água sob o foco de luz ultravioleta, que minimiza a proliferação microbiológica, incluindo os biofilmes (CLSI, 2006).

A oxidação por ultravioleta resulta da absorção da luz a 185 nm, produzindo radicais hidroxil, que, por sua vez, oxida os materiais orgânicos ionizáveis, transformando-os em dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O), mas este processo, isoladamente, não garante a remoção das substâncias orgânicas da água.

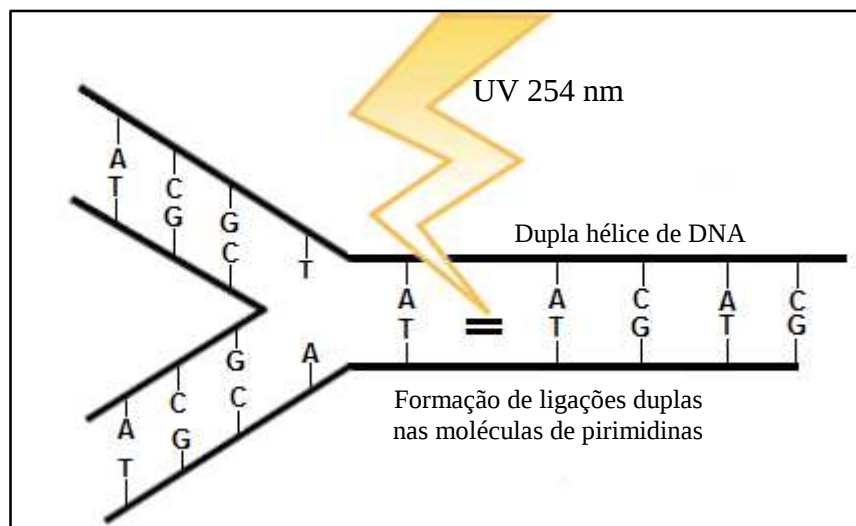


Figura 1 - Efeito da luz ultravioleta sobre DNA microbiano
 Fonte: Unitek, (2012).

A eficiência de ambos os processos depende da quantidade de luz que penetra na água e também do tempo de exposição (CLSI, 2006).

1.5. Distribuição e armazenamento para água purificada

O sistema de armazenamento e distribuição deve ser configurado para evitar a recontaminação da água após o tratamento e ser submetido a uma combinação de monitoramento (WHO, 2005; CLSI, 2006).

Para armazenamento da água purificada, a diretriz fundamental é levar em conta que, quanto maior o grau de purificação da água, mais rapidamente ela tende a se recontaminar, como exemplo, a contagem de bactérias, que em geral, aumenta com o tempo de estocagem da água (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A contaminação por bactérias é um dos problemas mais persistentes no armazenamento e distribuição de água, pois estas têm a capacidade de ajustar a um ambiente pobre de nutrientes, como os sistemas de purificação de água. As características das superfícies de tubulações podem contribuir para a adesão de bactérias e influenciar a formação de biofilmes (CLSI, 2006).

O material de construção necessita apresentar características de rugosidade apropriadas para dificultar a aderência de resíduos, a formação de biofilme e corrosão pelos agentes químicos utilizados na higienização do reservatório (WHO, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O aço inoxidável AISI (*American Iron and Steel Institute*) 316L eletropolido, com rugosidade menor que 0,5 μm , é a escolha mais frequente para atender a essas exigências. Outros materiais como polipropileno, polietileno, fluopolímeros (PTFE) podem ser utilizados desde que a água seja mantida em recirculação constante (CLSI, 2006).

O reservatório precisa estar protegido de fontes de luz e sua geometria deve permitir seu esgotamento total pelo fundo, sem volumes mortos. Também o sistema de armazenamento deve ter um filtro de respiro/ventilação para evitar a contaminação do volume do tanque pela entrada de ar/umidade e evitar uma recontaminação por essa via (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.6. Higienização do sistema de purificação de água

A formação indesejável de depósitos nas superfícies de membranas é chamada de *fouling*. Isto ocorre quando os sais dissolvidos, os sólidos suspensos e os micro-organismos retidos não são transportados da superfície da membrana para a corrente do fluxo de alimentação. Podem ser classificadas em três categorias: depósitos inorgânicos (*scaling*), colóides (*fouling* coloidal), sólidos em suspensão e material biológico (*biofouling*) (AMJAD, 1993).

O *biofouling* da membrana é um problema em sistemas de membranas de osmose reversa, pois a fixação das bactérias às superfícies da membrana e o desenvolvimento de biofilmes influenciam o desempenho do sistema, reduzindo o fluxo permeado ou levando à necessidade de maior consumo de energia pelo aumento da pressão de operação (RIDGWAY et al., 1983; BERESCHENKO et al., 2008).

A limpeza química é importante para reduzir as incrustações nos sistemas de purificação. Os produtos químicos podem ser utilizados isoladamente ou em combinação. Este procedimentos são necessários e devem ser aplicados quando a vazão do permeado cai a 10 % ou mais de seu valor (SOHRABI et al., 2011). Existem diferentes produtos químicos utilizados para a limpeza das membranas, que podem ser ácidos, alcalinos, detergentes, enzimas e agentes complexantes (KRAMER, 2009).

As incrustações provocadas pela precipitação de sais solúveis levam a uma redução do fluxo do permeado, sendo os ácidos e agentes complexantes indicados para solubilizar esses depósitos, removendo-os da superfície da membrana (MADAENI; SAMIEIRAD, 2010). A incrustação mais grave em sistemas de osmose reversa é aquela causada por sílica. A remoção dos depósitos sobre a membrana é difícil, sendo indicada

uma limpeza em dois estágios, um estágio utilizando uma solução ácida de limpeza e outro, uma solução de limpeza alcalina contendo um agente complexante (KRAEMER, 2009).

Ridgway et al. (1983), investigaram a bioincrustação das membranas de osmose reversa. As membranas estavam revestidas por uma camada de incrustação compostas de resíduos orgânicos e inorgânicos (cálcio, fósforo, enxofre) e as contagens de bactérias heterotróficas foram de até $5,6 \times 10^6$ UFC·cm⁻². A microscopia revelou que o biofilme sobre a superfície da membrana foi de 10 a 20 µm de espessura e era composto por várias camadas bacterianas compactadas.

Existem vários métodos para a sanitização dos sistemas de purificação, distribuição e armazenamento da água. Porém o material de construção do sistema deve ser resistente aos agentes empregados e a temperatura utilizada no processo é crítica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Algumas contaminações microbiológicas da água estão associadas à presença de biofilmes aderidos nas superfícies das tubulações, filtros, conexões e tanques de estocagem. No biofilme, os micro-organismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos usados em procedimentos de higienização. Esse acúmulo indesejável de depósitos biológicos sobre uma superfície contribui com a diminuição da eficiência e da vida útil do equipamento. Desta forma, o procedimento de higienização dos equipamentos purificadores de água deve ser periódico para evitar a formação de biofilme bacteriano nas paredes do reservatório, equipamentos, conexões, entre outros (MACÊDO, 2007).

A determinação da frequência de sanitização é dada pelo histórico dos resultados do monitoramento, de forma que o sistema funcione sem exceder o limite de alerta (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Devido à natureza ubíqua dos micro-organismos, é quase impossível criar um ambiente livre destes contaminantes. O sistema de tratamento de água pode ser contaminado por passagem da água pelo filtro de carvão ativo ou outras fontes. Assim, a manutenção deve ser praticada para minimizar a contaminação (CARTWRIGHT, 1987).

Os compostos clorados são úteis para a sanitização em tanques de armazenamento e linha de distribuição aos pontos de uso.

O crescimento microbiano pode ser inibido pela adição de cloro, no entanto, as membranas de osmose reversa são vulneráveis ao cloro livre, mas são altamente tolerantes a cloraminas, que podem ser utilizadas para prevenir bioincrustações (MALAEB; AYOUB, 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Química e Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

A água purificada avaliada foi obtida e distribuída pelo sistema de purificação Elix 35[®] da Millipore instalado nos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

2.1. Sistema de purificação de água Elix 35[®] Millipore

O sistema de Purificação de água Elix 35[®] Millipore (Figura 2) foi projetado para atender ou exceder os requisitos descritos na norma ISO[®] 3696 (Grau 2); CLSI[®] (CLRW); CAP e das Farmacopeias Americana (USP) e Européia para purificação de água.

O sistema patenteado Elix[®] (Figura 3) combina a tecnologia da eletrodeionização (módulo ELIX[®]) com as tecnologias de purificação, como o pré-tratamento Progard TL1[®], osmose reversa avançada e lâmpada de UV 254 nm (MILLIPORE, 2012).

As principais características da água produzida pelo sistema Elix[®] 35 encontram-se na Tabela 44.

Tabela 4- Qualidade da água produzida pelo sistema Elix 35[®]

Característica da água Elix 35 [®]	
Resistividade (25 °C)	>5,0 MΩ·cm ⁻¹ * (tipicamente 10-15 MΩ·cm ⁻¹)
Condutividade (25 °C)	< 0,2 μS·cm ⁻¹ * (tipicamente 0,06-0,10 μS·cm ⁻¹)
Carbono Orgânico Total (COT)	< 0,3 mg·L ⁻¹
Contagem de Bactérias Heterotróficas	< 10 UFC·mL ⁻¹
Rejeição de Sílica	> 99,9%

*quando o CO₂ é <30 mg·L⁻¹ na água de alimentação

Fonte: Millipore, (2012).

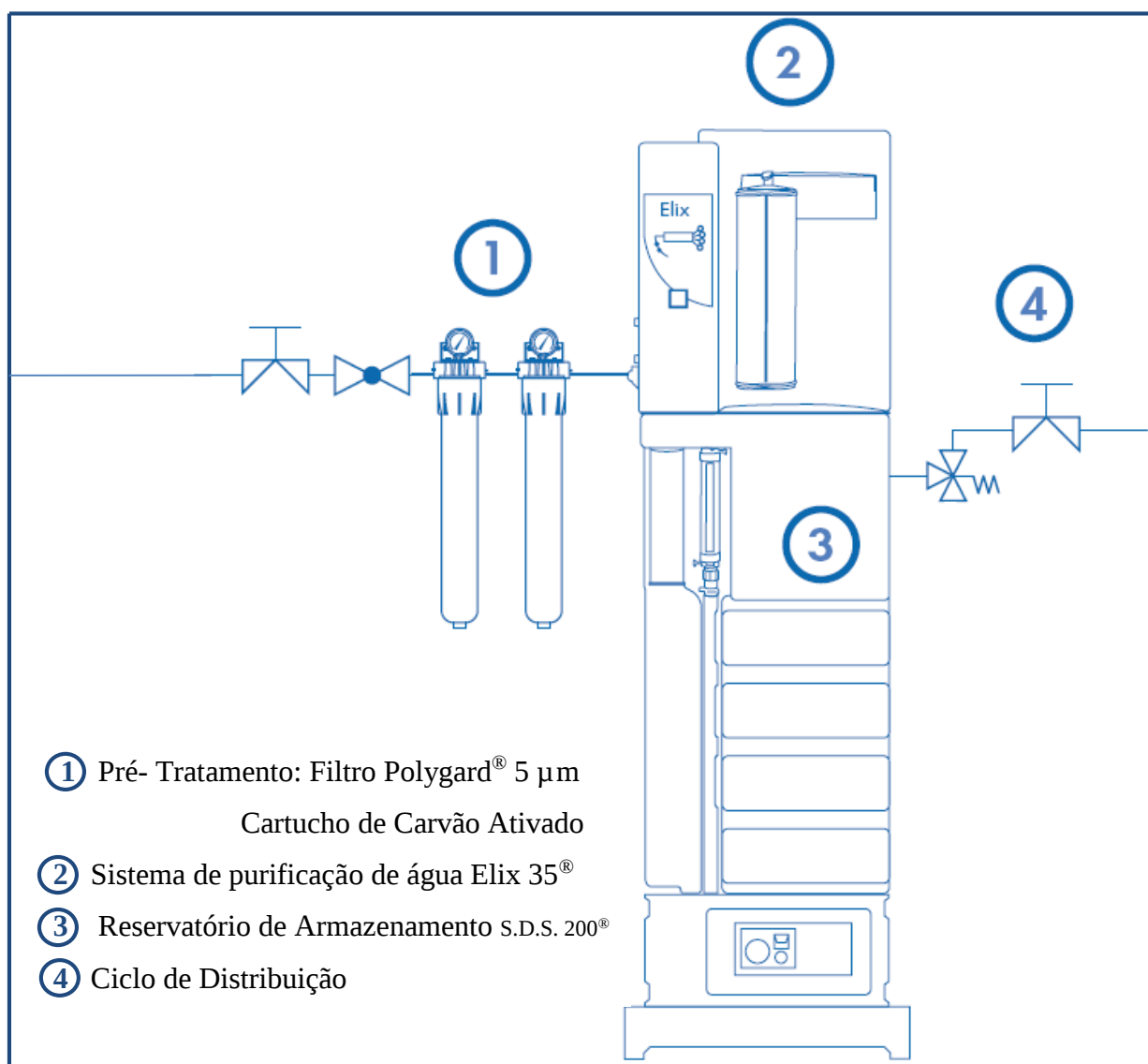


Figura 2 - Equipamento básico do sistema Elix 35®

Fonte: Millipore, (2012).

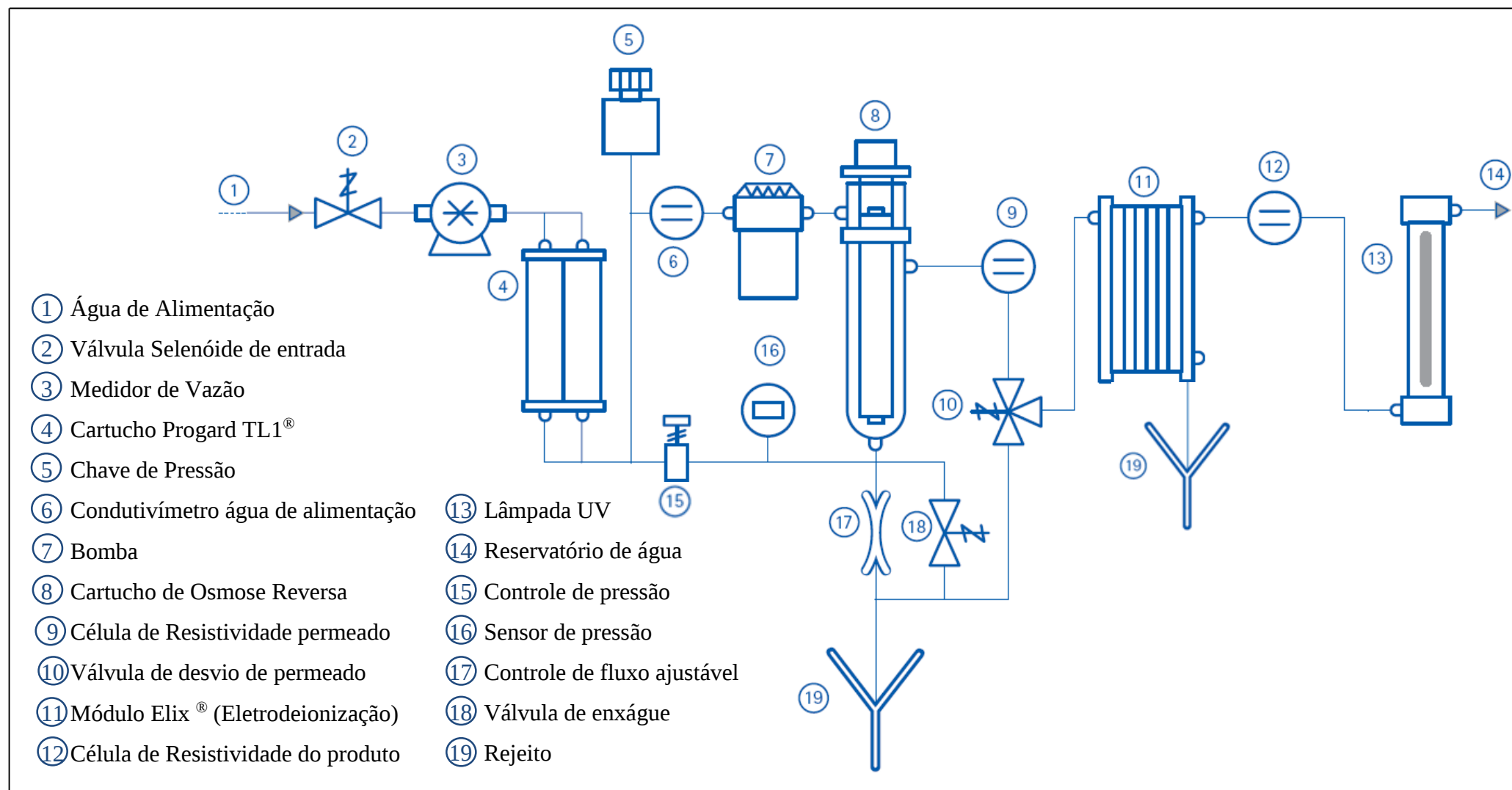


Figura 3 - Componentes internos do sistema de purificação de água Elix 35®

Fonte: Millipore, (2012).

2.1.1. Descrição do processo de purificação de água pelo sistema Elix 35®

O Sistema de purificação de água compreende três componentes principais: Pré-Tratamento, Purificação, Estocagem/Distribuição (Figura 2). Os pontos de amostragem para as análises físico-químicas e microbiológicas estão distribuídos em alguns estágios do sistema de purificação de água (Quadro 1).

Estágio do sistema de purificação		Pontos de amostragem
Pré-tratamento	Entrada de água potável	I
	Filtro Polygard® 5 µm	-
	Cartucho de Carvão Ativado	-
Purificação	Cartucho Progard TL®	-
	Osmose Reversa	-
	Módulo Elix® (Eletrodeinizador)	-
	Lâmpada Ultravioleta	-
	Saída do sistema de purificação	II
Estocagem e distribuição	Tanque de Estocagem	-
	Distribuição de água purificada	III, IV e V
	Laboratórios	-

Quadro 1 - Estágios do sistema de purificação de água.

No processo de purificação, a água potável (I) proveniente do sistema de abastecimento da UFV é armazenada em dois reservatórios de fibra de vidro com capacidade para 2000 litros de água cada. É bombeada por um sistema automático com fluxo de $20 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, que pressuriza a água para o sistema de purificação.

A água, antes de chegar ao sistema de purificação, atravessa o pré-tratamento composto do filtro Polygard®, polipropileno com poros de 5 µm, que retém material particulado e outras impurezas. Após, a água passa através de um cartucho de carvão ativado que remove o cloro para que não danifique as membranas de osmose reversa, sensíveis ao cloro, e então chega ao sistema de purificação (MILLIPORE, 2012). O primeiro passo do sistema é o cartucho Progard TL1®, filtro de tamanho 0,5 µm, usado para prevenir incrustações orgânicas na membrana de osmose reversa.

O cartucho Progard TL1® contém carvão ativado impregnado no filtro (MILLIPORE, 2012). A água alcança a unidade de osmose reversa (membrana de

poliamida), onde é forçada, por pressão, a atravessar tangencialmente as membranas, que removem aproximadamente 95-99 % de íons e 99 % de materiais orgânicos dissolvidos, micro-organismos e partículas.

A etapa seguinte é a passagem da água pelo módulo Elix Merck[®], que remove o restante de íons por eletrodeionização. As resinas de troca iônica são continuamente regeneradas pelo campo elétrico aplicado dentro do módulo, o que elimina a necessidade de interromper a produção de água para a regeneração química (MILLIPORE, 2012). A água é monitorada com a medida em linha da resistividade por um condutivímetro instalado no sistema.

O último passo é a incidência de uma lâmpada UV 254 nm que conduz a uma redução de 4 ciclos logaritmos na contagem de bactérias heterotróficas na água.

A água segue (II) para um tanque de armazenamento de polietileno (S.D.S. 200[®]) com capacidade para 200 L, equipado com filtro de respiro que impede a penetração de possíveis contaminantes a partir do ambiente como dióxido de carbono, partículas, micro-organismos e compostos orgânicos voláteis.

A água é armazenada neste tanque onde circula continuamente com um volume de aproximadamente 200 L de água purificada. A água é distribuída aos pontos de uso através de um *loop*¹ construído em tubos de polipropileno (marca Belfano, modelo *tubelli* DE 32). Em cada andar do prédio, foram conectados torneiras para a coleta de água (pontos de amostragem III, IV e IV).

A água purificada é coletada em recipiente pelos usuários dos laboratórios de pesquisa e armazenada em reservatório próprio nos laboratórios.

2.2. Avaliação da qualidade da água potável e purificada

Para avaliação da qualidade da água purificada utilizada pelos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos, foram monitorados a água que alimenta o sistema de purificação (potável), a água obtida por este sistema e seus três pontos de distribuição da água.

As coletas das amostras foram realizadas de acordo com os pontos mencionados no Quadro 1.

¹ *loop* é o anel formado pela tubulação de distribuição contínua da água, proveniente dos sistemas de purificação, sob pressão.

A água potável (Ponto I) foi monitorada por período mínimo de 12 dias de amostragens quanto à turbidez, temperatura, condutividade, pH, dureza, cálcio, alcalinidade, cloro residual livre, sólidos totais dissolvidos, sílica, índice de saturação de Langelier e contagem de bactérias heterotróficas.

A água purificada distribuída nos três pontos de coletas (III, IV e V), foi monitorada por período mínimo de 20 dias de amostragens quanto à temperatura, condutividade, pH, sílica e contagem de bactérias heterotróficas.

Também foi verificada a qualidade da água purificada (ponto II) quanto à resistividade, temperatura, pH e contagem de bactérias heterotróficas, pH. Devido a dificuldades na coleta das amostras, foi possível, apenas, fazer o monitoramento em 8 dias de amostragem.

Ao mesmo tempo, foram avaliadas as condições de funcionamento do sistema de purificação de água quanto a suas especificações de instalação e operação.

2.3. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas para água de alimentação foram embasadas nos requisitos indicados pelo fabricante do equipamento (Tabela 5), além de alguns dos critérios de aceitação a serem atendidos pela Portaria MS nº 2.914/2011.

Tabela 5 - Requisitos da água de alimentação

Condutividade	< 2000 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ (25 °C)
pH	4-10
LSI máximo	< + 0.3
Dureza (CaCO_3)	< 300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Cloro Residual Livre	< 2,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Temperatura (°C)	5 °C a 35 °C
Índice de Fouling (SDI)	12
Pressão água	Pressão mínima de 2 bar, máximo 6 bar
Taxa de Fluxo	5 L/min a 2 bar (1,3 gal/min a 29 psi)

Fonte: Millipore, (2003).

2.3.1. Alcalinidade

Com o auxílio de uma proveta, uma amostra de 100 mL foi transferida para um erlenmeyer 250 mL e adicionados 3 gotas de solução alcólica de fenolftaleína 0,1% (m/v). As amostras que adquiriram coloração rósea foram titulada com a solução de H_2SO_4 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, até o desaparecimento da cor. Nas amostras incolores foram adicionadas 3 gotas do indicador metilorange e tituladas com H_2SO_4 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ até a viragem de amarelo para laranja. As análises foram realizadas em triplicata. Os cálculos foram realizados seguindo a Equação (1) expressos em $\text{CaCO}_3\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$$\text{Alcalinida de} = \frac{A \times 0,01 \times f.c \times 100,000}{V} \quad (1)$$

Em que,

A= Volume (mL) de solução de H_2SO_4 .

f.c= Fator de correção volumétrica da solução de H_2SO_4 .

V= Volume (mL) da amostra

2.3.2. Cálcio

A quantificação de cálcio foi realizada de acordo com método 35500- B da APHA (2005). Em uma amostra de 50 mL de água foram adicionados 2,0 mL de uma solução de NaOH 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou um volume suficiente para atingir um pH entre 12 e 13. Adicionou-se 0,2 g do indicador murexida à amostra e agitou-se até completa dissolução. A amostra foi titulada com uma solução de EDTA 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adicionada lentamente e com agitação constante, até a mudança da coloração rósea para púrpura. O cálculo do teor de cálcio seguiu a equação (2) sendo expressos em $\text{Ca}^{2+} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$$\text{Cálcio} = \frac{A \times 0,01 \times f.c \times 40,080}{V} \quad (2)$$

Em que,

A= Volume (mL) de solução de EDTA.

f_c= Fator de correção volumétrica da solução de EDTA.

V= Volume (mL) da amostra

2.3.3. Cloro residual livre

As concentrações do cloro livre foram realizadas de acordo com método colorimétrico DPD 4500 Cl G da APHA, 2005. Utilizando o equipamento marca Lamotte modelo I200 em uma cubeta foram pipetados 0,5 mL de solução tampão fosfato, 0,5 mL de reagente indicador DPD e 10 mL da amostra com homogeneizou-se por 2 min. Realizou-se a leitura direto no equipamento. Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro residual livre (CRL).

2.3.4. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica na água é uma medida de íons dissociados que variam em função do valor de pH e da temperatura (APHA, 2005). A condutividade foi medida por um condutivímetro, segundo o método 5.2.24 da Farmacopeia Brasileira (2010), para água purificada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.3.5. Dureza

A dureza foi determinada seguindo a metodologia da APHA (2005). Um volume de 50 mL da amostra de água foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e adicionado de 1 mL de solução tampão (pH 10) e duas gotas do indicador Eriocromo T. A amostra foi titulada com a solução de EDTA $0,01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, até mudança da cor vermelha para cor azul. Os doseamentos foram realizados em triplicata. A dureza foi expressa em $\text{CaCO}_3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando a Equação (3).

$$Dureza = \frac{A \times 0,01 \times f.c \times 100,000}{V} \quad (3)$$

Em que,

A= Volume total (mL) de solução de EDTA.

f_c = Fator de correção volumétrica da solução de EDTA.

V= Volume da amostra

2.3.6. Índice de saturação de Langelier

O índice de saturação de Langelier foi determinado seguindo a metodologia proposta por Ning & Netwig (2002). Para calcular o índice foi necessário conhecer a alcalinidade ($\text{CaCO}_3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a dureza de cálcio ($\text{Ca}^{2+} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), os sólidos totais dissolvidos ($\text{TDS mg}\cdot\text{L}^{-1}$), o pH, e a temperatura da água ($^{\circ} \text{C}$). O cálculo foi realizado tomando-se a diferença entre o pH da água (pH) e o pH (pH_s) calculado quando esta mesma água apresenta-se saturada com CaCO_3 (Equação 4).

$$\text{ISL} = \text{pH} - \text{pH}_s \quad (4)$$

O pH calculado (pH_s) foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{pH}_s = (9,3 + A + B) - (C + D) \quad (5)$$

Em que:

$$A = \frac{(\text{Log}_{10}[\text{TDS}] - 1)}{10} \quad (6)$$

$$B = -13,12 \times \text{Log}_{10}(C^{\circ} + 273) + 34,35 \quad (7)$$

$$C = \text{Log}_{10}(\text{Ca}^{2+} \text{ de } \text{CaCO}_3) - 0,4 \quad (8)$$

$$D = \text{Log}_{10}(\text{alcalinidade de } \text{CaCO}_3) \quad (9)$$

2.3.7. pH e temperatura

A leitura de pH (método 4500-B APHA, 2005) foi realizada diretamente nas amostras utilizando um pHmetro modelo MA PA210p. A medida da temperatura foi realizada no momento da leitura de pH por meio de um sensor de temperatura do aparelho de pHmetro.

2.3.8. Sílica

O princípio do método baseia na reação em meio ácido da sílica solúvel com o íon molibdato para formar um complexo amarelo sílica-molibdato (ácido molibdosilício), cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de sílica na amostra (APHA, 2005).

Em um tubo de centrífuga de 15 mL acrescentaram-se 5 mL da amostra de água purificada (pontos III, IV e V) e 2 gotas do reagente molibdato. Em seguida, homogeneizou-se em vórtex por 2 min. Determinaram as absorvâncias em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22) a 410 nm. Quando a absorvância medida apresentou $\geq 0,010$ a concentração de sílica foi superior a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, indicando que a água está acima do limite estabelecido para água purificada.

Para determinação da concentração de sílica para água de alimentação no ponto I foi utilizado o kit HI 38067 HANNA[®] que é a adaptação do método 4500 SiO₂ azul de heteropoly (APHA, 2005). Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sílica (SiO₂).

2.3.9. Sólidos totais dissolvidos

A determinação dos sólidos totais é uma medida do total de compostos orgânicos e sais inorgânicos dissolvidos na água (ELGA, 2012). Foram evaporados 100 mL de amostra de água em cadinhos de porcelana utilizando chapa aquecedora (marca DigTech), após o resíduo foi seco em forno a 100-105 °C. O cadinho foi transferido para um dessecador para atingir o equilíbrio com a ambiente (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

O cálculo foi realizado tomando a diferença entre o peso do cadinho vazio e o peso do cadinho após a secagem da água (Equação 10). Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sólidos totais dissolvidos (STD).

$$\text{STD} = \frac{A - B}{V} \quad (10)$$

Em que,

A= Massa (resíduo seco+ cadinho) (mg)

B= Massa do cadinho (mg)

V= volume da amostra (L)

2.3.10. Substâncias oxidáveis

Foram levados à fervura em chapa aquecedora (marca DigTech) 100 mL da amostra com 10 mL ácido sulfúrico $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Adicionaram-se 0,2 mL da solução de permanganato de potássio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo mantida em ebulição durante 5 min. A

coloração rosada não deve desaparecer completamente após a fervura, pois a perda desta coloração indica presença de substâncias oxidáveis na amostra. Os resultados foram expressos em presença ou ausência da perda da coloração (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

2.3.11. Turbidez

A análise de turbidez foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela APHA (2005). Realizou-se a leitura direta em turbidímetro (marca HACH, modelo 2.100 P). Os resultados foram expressos em unidades de turbidez (uT).

2.4. Análises microbiológicas

2.4.1. Água potável e água purificada distribuída

Cada ponto de distribuição foi sanitizado com álcool 70 % (v/v), as primeiras porções de água foram desprezadas e 100 mL de amostra de água foram coletados em recipientes de vidro esterilizados (Figura 4).



Figura 4 - Etapa de coletas das amostras. (A) Sanitização do ponto de distribuição III. (B) Coleta em recipiente de vidro esterilizado.

A contagem de bactérias heterotróficas da água potável e água purificada coletadas nos pontos I, III, IV e V foi feita pela técnica *pour plate*, descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* seção 9215 (APHA, 2005) O meio de cultura utilizado foi o R2A (Himedia®).

As placas foram incubadas em posição invertida, à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante por 72 h. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias presentes nas placas de Petri estavam pequenas e de difícil visualização, tendo sido

incubadas por mais 48 horas para aumentar o diâmetro das colônias. O tempo final de incubação das placas foi de 5 dias (120 horas), segundo recomendação da Farmacopeia Britânica (2009).

Após o período de incubação e para melhor visualização das colônias, foi adicionado 1 mL da solução de cloreto de trifênil tetrazólio 0,005% (m/v) às placas de Petri com o meio de cultura R2A por 1 h (Figura 5).

Para a contagem, foi considerada a contagem entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias nas placas de Petri (APHA, 2005).

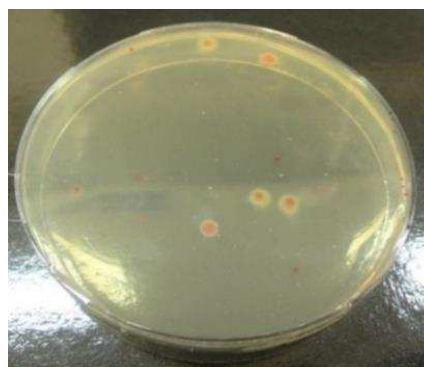


Figura 5 - Adição da solução a 0,005% (m/v) de cloreto de trifênil tetrazólio.

2.4.2. Água purificada

Para as análises microbiológicas da água purificada coletada no ponto II, foi utilizada a técnica de membrana filtrante, segundo a Farmacopeia Britânica (2009).

As membranas estéreis de 0,45 μ m e 47 mm (Millipore®) foram colocadas em um suporte de filtração previamente esterilizados e, com o auxílio de uma bomba a vácuo, 100 mL de amostra de água foram filtrados. Após a filtração, as membrana foram retiradas assepticamente do suporte e dispostas em placas de Petri contendo meio de cultura R2A e incubadas à temperatura de 35 °C $\pm$ 0,5 °C, por 120 h (Figura 6).

Para a pesquisa de micro-organismos patogênicos, a análise foi realizada pela técnica de membranas filtrantes de 0,45 μ m, utilizando 100 mL de amostra de água (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As membranas foram transferidas para a superfície de placas contendo ágar cetrimide (Himedia®) para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e ágar EMB (Difco®) para *Escherichia coli*. As placas foram incubadas em posição invertida, à temperatura de 35°C $\pm$ 0,5 °C durante 24 a 48 horas (APHA, 2005).

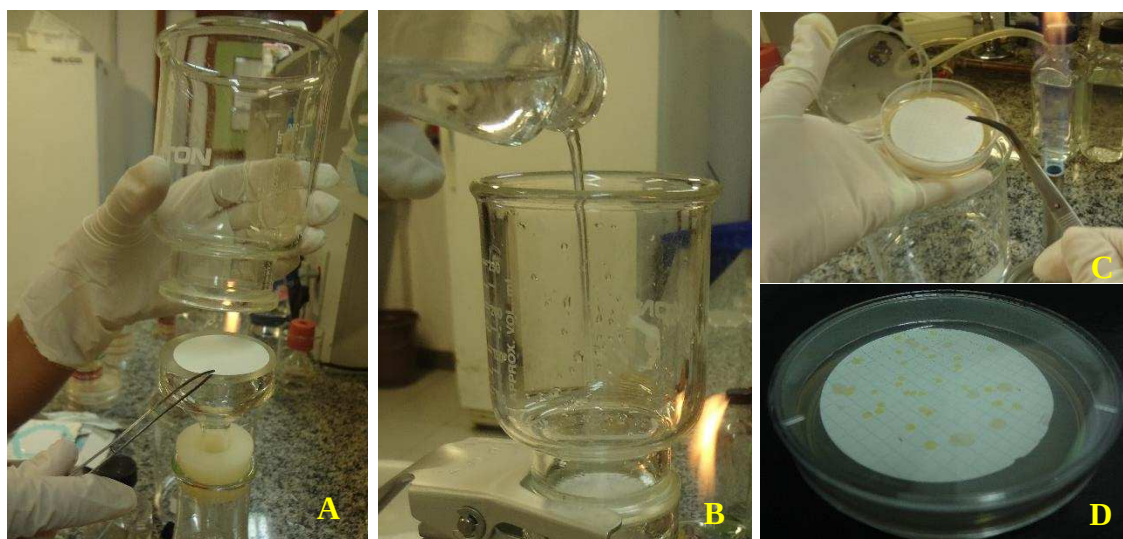


Figura 6 - Etapas da contagem de bactérias heterotróficas pela técnica de membrana filtrante. (A) Preparo do suporte de filtração. (B) Filtração de 100 mL da amostra. (C) Depósito da membrana filtrante sobre ágar R2A. (D) Unidades Formadoras de Colônias nas placas após 120 horas de incubação a 35 °C.

2.5. Procedimento de higienização do sistema de purificação de água

A sanitização do sistema de purificação de água foi realizada após o período de monitoramento inicial (20 dias de amostragens).

O procedimento de sanitização das membranas de osmose reversa foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante com tablets de dihidrato de dicloroisocianurato de sódio (ref. JBR5NT12), solubilizado automaticamente pelo equipamento, com duração de 20 min (MILLIPORE, 2003).

O tanque de estocagem e *loop* de distribuição de água foi sanitizado com uma solução de hipoclorito de sódio na concentração de $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8 e tempo de contato de 120 min.

Para avaliação da eficiência do procedimento de sanitização, a técnica do *swab* foi aplicada na superfície do tanque de estocagem e nas tubulações do sistema de distribuição. Devido a dificuldades para se determinar a área nos equipamentos, foram feitas estimativas, sendo as coletas efetuadas sempre da mesma forma: aplicação do *swab* com pressão constante, em movimentos giratórios por 30 vezes.

Após a sanitização do sistema, a água purificada distribuída foi monitorada quanto à contagem de bactérias heterotróficas por um período mínimo de 20 dias de amostragens.

Também foi realizada a higienização do reservatório de água potável que alimenta o sistema de purificação (Anexo B). Após este procedimento, a água potável foi

monitorada quanto à condutividade, temperatura, pH, dureza, alcalinidade, sílica e contagem de bactérias heterotróficas.

2.6. Análises estatísticas

Os resultados das análises da água potável foram avaliados pela estatística descritiva, expressando-se os resultados em médias e desvio padrão.

Nos pontos de distribuição, foi avaliada a qualidade da água purificada por meio das contagens de bactérias heterotróficas. Os experimentos foram considerados em uma disposição em arranjo fatorial, com duas fases (antes e depois da sanitização) e vinte tempos (dias de produção da água), em delineamentos inteiramente ao acaso, na parcela, com três pontos de distribuição das amostras na subparcela, em duas repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade e para a análise do fator qualitativo tempo, foi realizado análise de regressão.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute, North Carolina, USA), versão 9.1, licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da qualidade da água de alimentação (potável)

Este estudo monitorou a qualidade da água potável por meio de análises físico-química e microbiológicas, além disso, o sistema foi avaliado em conformidade com as especificações de instalação e operação.

Na Tabela 6 estão os resultados das análises físico-química e microbiológicas da água potável usada na alimentação do sistema de purificação.

Tabela 6 - Caracterização da água potável que alimenta o sistema Elix 35[®] (período de maio a agosto de 2013).

Características	N ¹	Média ²	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
Alcalinidade (CaCO ₃ mg·L ⁻¹)	28	20,3	± 3,52	26,4	13,7
Bactérias Heterotróficas (log ₁₀ UFC·mL ⁻¹)	40	1,24	± 0,82	2,55	ND
Cloro Residual Livre (mg·L ⁻¹)	12	0,84	± 0,33	1,83	0,62
Condutividade (µS·cm ⁻¹)	33	62,77	± 7,49	76,18	52,24
Dureza (CaCO ₃ mg·L ⁻¹)	26	20	± 8,97	51,1	10,1
ISL (Índice de Saturação de Langelier)	7	- 3,76	± 0,16	-4,07	-3,60
pH	37	6,17	± 0,34	7,3	5,7
Sílica (SiO ₂ mg·L ⁻¹)	36	15,23	± 2,34	23	11
Temperatura (° C)	37	25	± 2,05	21,3	27,2
Turbidez (uT)	12	0,143	± 0,03	0,100	0,203

N¹ número de amostras; ² Média aritméticas

A água potável distribuída no Brasil pela rede pública deve obedecer à legislação vigente quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos. Segundo os resultados obtidos, a água que alimenta o sistema apresenta qualidade e sempre esteve dentro dos padrões estabelecidos pela Portaria MS nº 2.914/2011, além disso, atende os requisitos químicos recomendados pelo fabricante do equipamento.

Analisando estes resultados, percebe-se que a água de alimentação é uma das principais responsáveis pela boa performance do sistema.

Constata-se pelos gráficos (Figura 8 e 10) e pelas análises estatísticas descritivas, que algumas características físico-químicas da água, principalmente as análises microbiológicas (Figura 12), variaram após a realização do procedimento de higienização do reservatório de água. As concentrações de dureza, alcalinidade e sílica permaneceram praticamente inalteradas.

Os resultados da qualidade da água potável proveniente da ETA/UFV também foram evidenciados no trabalho de Medeiros (2011), apresentando valores semelhantes como turbidez 0,46 uT, pH médio de 6,37 e cloro residual livre 0,47 mg·L⁻¹.

3.1.1. Alcalinidade e dureza

A Figura 7 mostra os valores obtidos para a dureza e alcalinidade, cujos comportamento e distribuição permaneceram constantes, ao longo da coleta de amostras, por 28 dias.

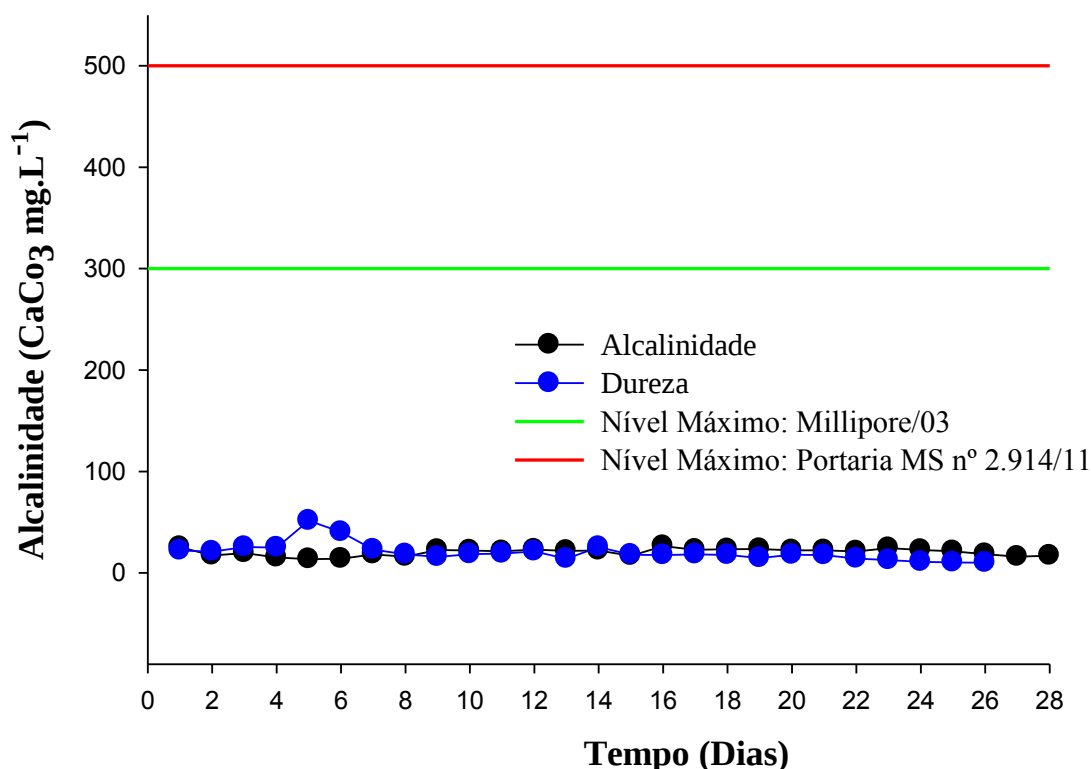


Figura 7 - Monitoramento da dureza e alcalinidade da água potável.

A alcalinidade encontrada no trabalho de Medeiros (2011) foi de 26,2 mg·L⁻¹ de CaCO₃ na ETA/UFV, enquanto a alcalinidade da água da rede de distribuição foi de 18,8 a 21,2 mg·L⁻¹ de CaCO₃.

Todos os pontos no gráfico correspondem a um limite inferior ao previsto, que é de 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCO_3 , pela da Portaria MS nº 2.914/2011, e também inferior ao recomendado pelo fabricante, que é de 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCO_3 .

As altas concentrações de alcalinidade e dureza podem levar à diminuição da rejeição de sais, à permeabilidade e a incrustações nas membranas de osmose reversa, diminuindo sua eficiência (CASTANHEIRA, 2010). Também as concentrações de alcalinidade e dureza influenciam maior frequência de limpeza química nas membranas do equipamento.

3.1.2. Condutividade

A Figura 8 mostra os resultados de condutividade. Os valores de condutividade diminuíram com a higienização do reservatório de água potável, e também pode ser atribuído ao fato, por exemplo, a variações sazonais.

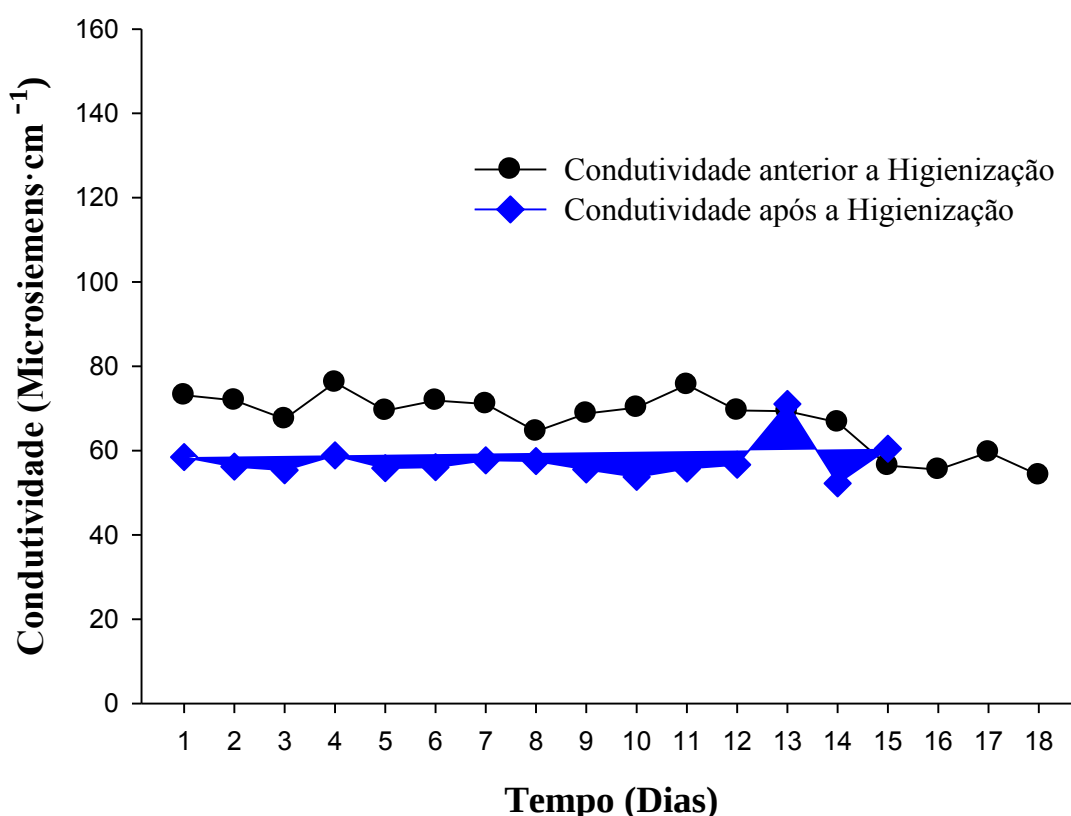


Figura 8 - Monitoramento da condutividade da água potável.

A água potável que alimenta o sistema de purificação de água apresenta baixa condutividade, sendo possível verificar o controle da condutividade da água no

equipamento por meio dos condutivímetros instalados nele, os quais verificam a condutividade da água de entrada quanto o valor de saída. Desta forma, a eficiência de rejeição de sais pelas membranas de osmose reversa pode ser analisada.

3.1.3. Índice de Saturação de Langelier

A Figura 9 mostra os resultados para o Índice de Langelier (ISL), valor numérico usado para prever a estabilidade do carbonato de cálcio da água, isto é, se uma água irá precipitar CaCO_3 , dissolvê-lo ou ficar em equilíbrio (PEÑA et al., 2010).

O ISL é usado por alguns fabricantes de membranas de osmose reversa para auxiliar o uso de produtos químicos no pré-tratamento da água de alimentação (NING, NETWIG, 2002). No sistema de purificação de água Elix 35[®], a Millipore recomenda que o valor máximo do ISL seja +0,3.

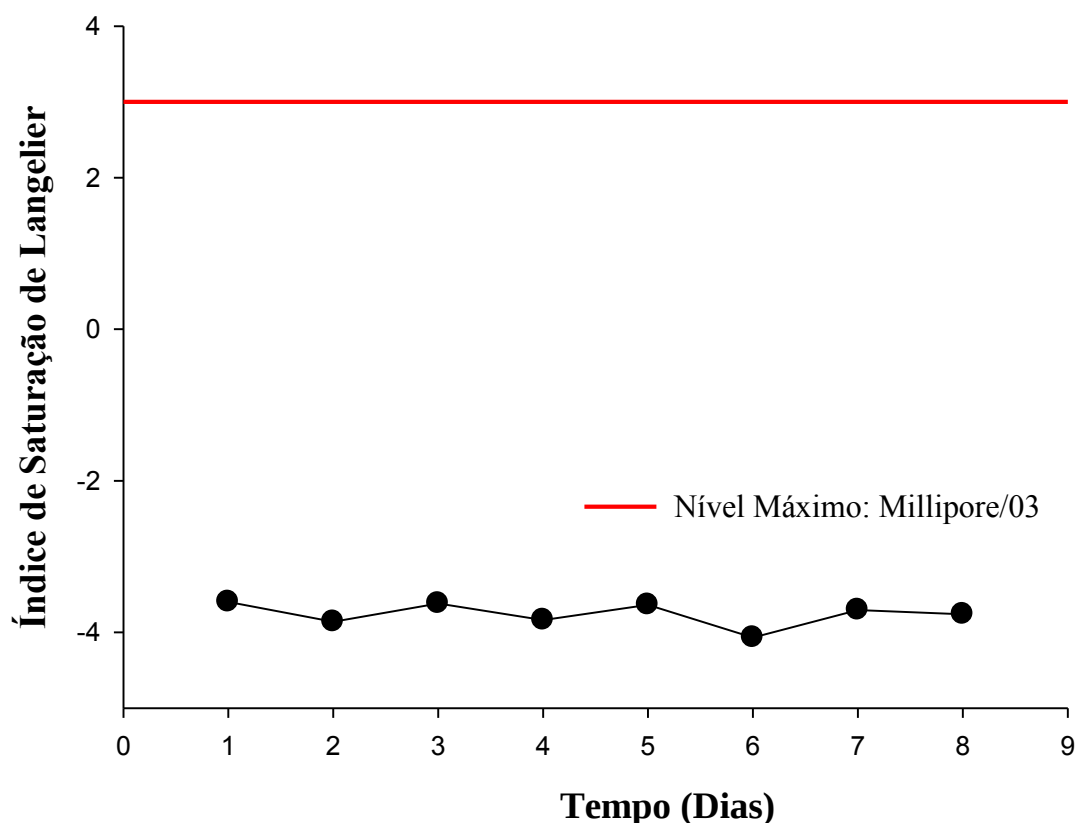


Figura 9 - Monitoramento do Índice de Langelier da água potável.

Valores negativos de ISL indicam que não há potencial de precipitação de carbonato de cálcio, porém tendência corrosiva. Se o ISL for positivo, a precipitação do carbonato de cálcio poderá ocorrer. Para valores de índice cada vez mais positivos, o

potencial de precipitação aumenta (NING, NETWIG, 2002). Para valor igual a zero, não haverá potencial de precipitação do carbonato de cálcio, mas pequenas variações de concentração e temperatura podem mudar o índice.

3.1.4. pH

Os valores de pH para a água potável apresentaram média de 6,0, estando dentro dos padrões exigidos tanto da legislação vigente quanto a faixa requisitada pelo fabricante (Figura 10).

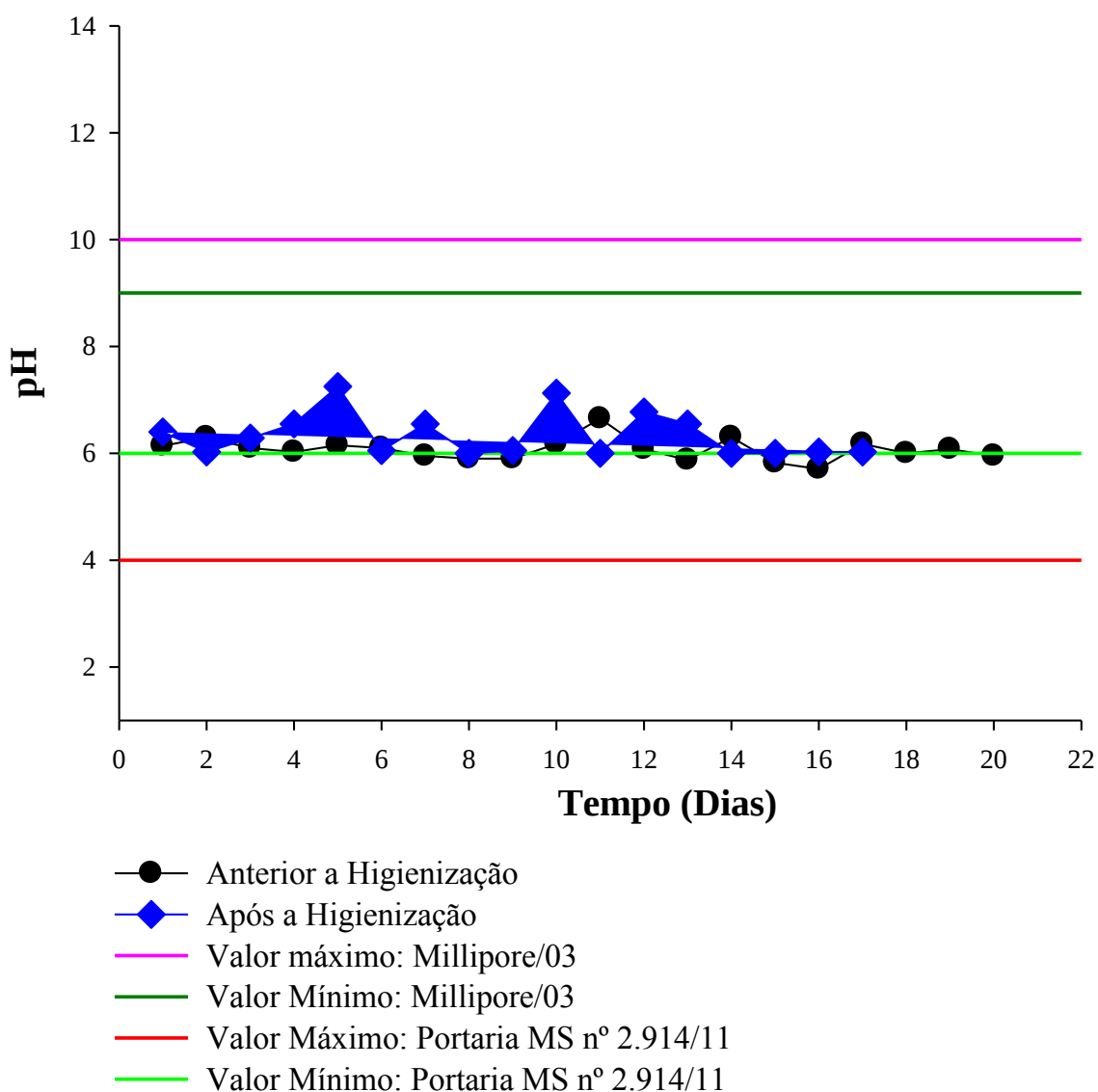


Figura 10- Monitoramento do pH da água potável.

A determinação do pH para a água de alimentação é importante pois, em um sistema de purificação de água em que se utiliza a tecnologia de membranas de osmose

reversa, o pH pode afetar a eliminação de sais, prevenir ou promover a deterioração das membranas.

O pH da água de alimentação pode afetar a rejeição de sais pelas membranas, uma vez que existe um pH ótimo em que ocorre a rejeição máxima. Uma maior taxa de rejeição de certos constituintes iônicos, como fluoretos e bicarbonatos, são eliminados com o aumento do pH (CASTANHEIRA,2010).

Para evitar a deterioração das membranas, o pH deve estar dentro de uma faixa. Em membranas de poliamida, o pH da água de alimentação deve estar na faixa de 4,0 a 10,0. A Millipore, fabricante do sistema de purificação de água em estudo, também recomenda esta faixa de pH. Fora desta faixa de valores, a velocidade de hidrólise aumenta rapidamente e pode desestruturar a membrana, permitindo a passagem de sais.

3.1.5. Sílica

A Figura 11 mostra os valores da concentração de sílica para água potável. Estes valores não apresentam grandes preocupações para a água que alimenta o sistema, uma vez que a sílica é particularmente prejudicial em sistemas de osmose reversa, pois forma precipitados difíceis de serem removidos.

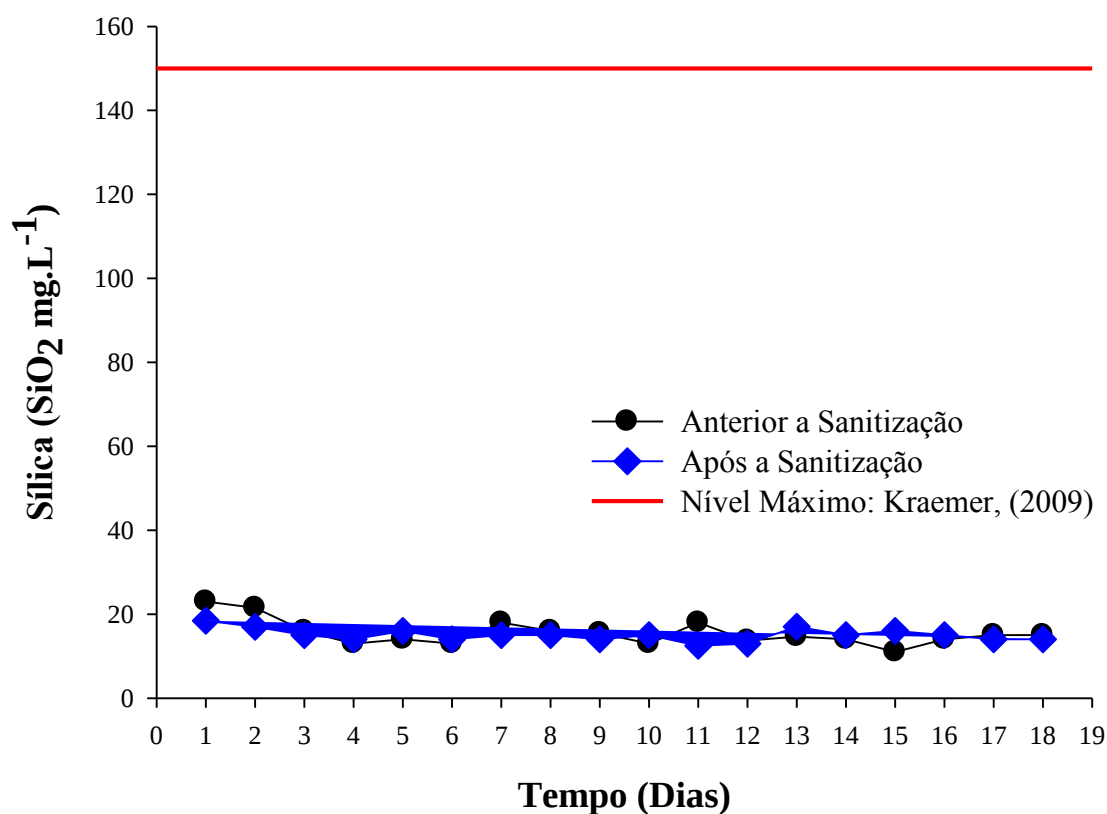


Figura 11- Monitoramento da concentração de sílica da água potável.

A solubilidade da sílica depende da temperatura e do pH. A 25 °C e pH 7,0, a solubilidade da sílica está em torno de 96 mg·L⁻¹. A concentração máxima admitida em sistema de osmose reversa é de 150 mg·L⁻¹, acima dessa concentração, pode ocorrer a precipitação da sílica, causando danos ao sistema (OLIVEIRA, 2007; KRAEMER, 2009).

O procedimento de higienização do reservatório não alterou a concentração de sílica, pois os valores não apresentaram diferença pela análise estatística descritiva.

3.1.6. Análises microbiológicas

A contagem de bactérias heterotróficas (Figura 12) manteve-se, no período analisado, abaixo de 500 UFC·mL⁻¹, limite estabelecido conforme Portaria MS nº 2.914 de dezembro de 2011.

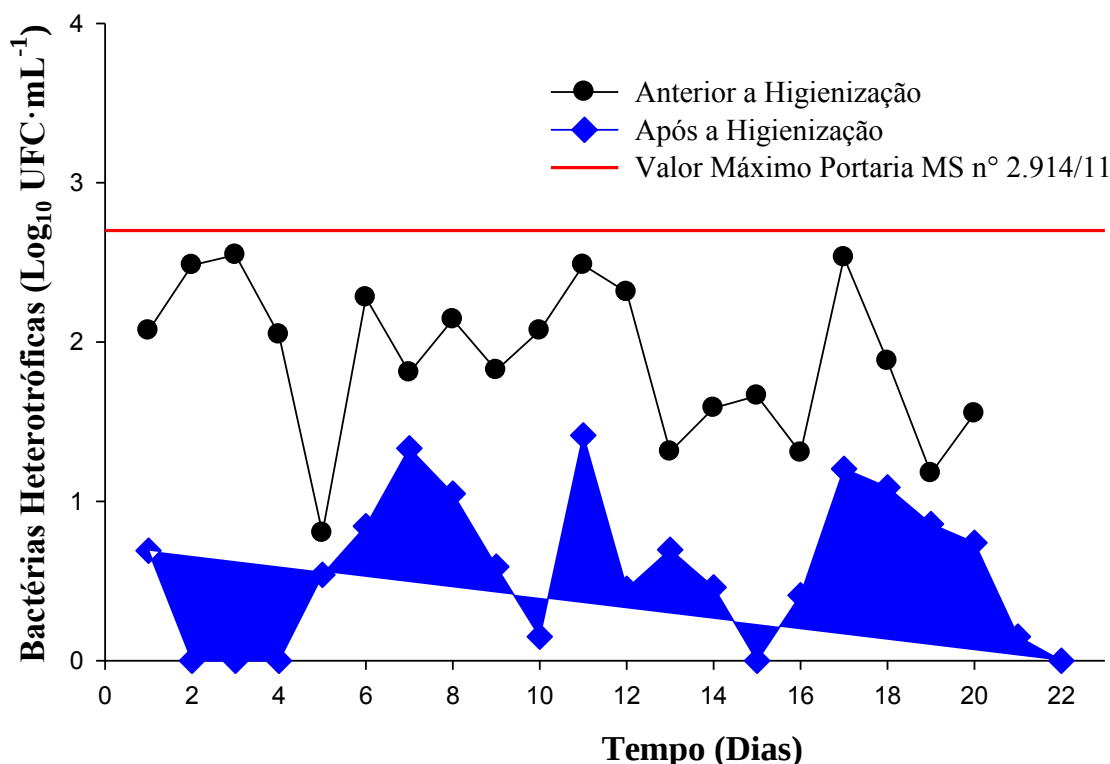


Figura 12 - Log₁₀ UFC·mL⁻¹ do número de bactérias heterotróficas determinado pela técnica *pour plate* da água potável que alimenta o sistema Elix 35[®]. Quando log =0, significa ausência em 1 mL.

Braga (2007) fez o monitoramento da qualidade da água potável da ETA-UFV e, no período analisado, estava dentro dos requisitos estabelecidos pela Portaria MS nº 518/2004 quanto aos padrões físicos (turbidez), químicos (cloro residual livre) e

microbiológicos. Este autor encontrou valores semelhantes ao deste trabalho ao avaliar o número de bactérias heterotróficas na água potável distribuída- um máximo de $2,54 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

O procedimento de higienização do reservatório foi eficaz, pois, de acordo com as análises microbiológicas, houve redução na contagem de bactérias heterotróficas, reafirmando a importância desse procedimento no controle de micro-organismos.

3.2. Análises físico-químicas e microbiológicas da água purificada obtida pelo sistema Elix 35[®]

A Tabela 7 e a Figura 13 mostram a qualidade da água purificada produzida pelo sistema Elix 35[®]. A água purificada foi analisada imediatamente após sua produção pelo sistema, sem seu armazenamento. Estes dados estão em conformidade com a qualidade da água descrita pelo fabricante do sistema de purificação e apresentados na Tabela 5.

Tabela 7 - Caracterização da água purificada produzida.

Características	N ¹	Média ²	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
pH	8	7,7	$\pm 2,7$	9,1	6,8
Resistividade ($\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) *	8	10,16	$\pm 1,50$	12,9	8,2
Temperatura ($^{\circ} \text{C}$) *	8	26,0	$\pm 1,08$	28,6	25,4
Substâncias Oxidáveis	8	Ausente	-	-	-
Sílica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	8	$\leq 0,1$	-	-	-
Bactérias Heterotróficas ($\log_{10} \text{UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$)	8	1,78	$\pm 0,29$	2,18	1,39

N¹ número de amostras; ² média aritméticas; *valores obtidos no visor do equipamento

A água purificada produzida pelo sistema Elix atendeu aos padrões de qualidade das especificações, à norma ISO[®] 3696 (Grau 2), CLSI[®] (SRW) e às Farmacopeias Americana (USP), Européia e Brasileira.

A água purificada também apresentou ausência em 100 mL de micro-organismos patogênicos: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

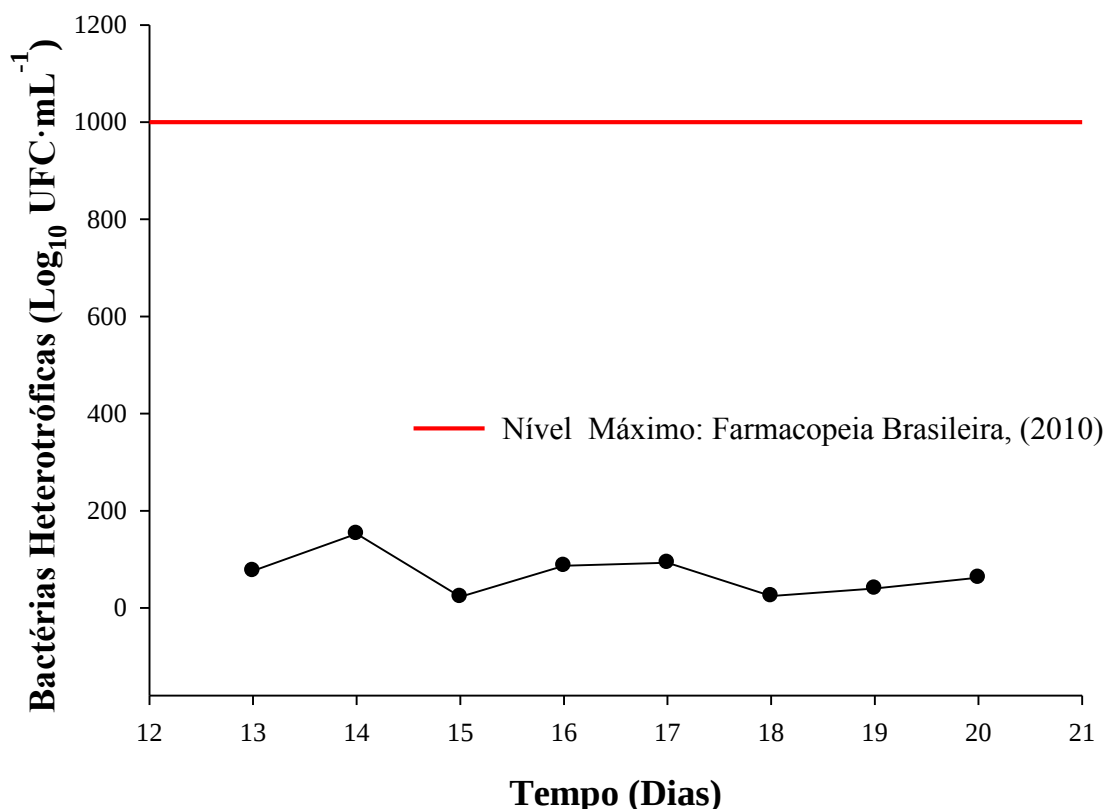


Figura 13 – Log₁₀ UFC·mL⁻¹ do número de bactérias heterotróficas determinado pela técnica de filtração por membrana da água purificada obtida pelo sistema Elix 35®

3.3. Análises físico-químicas e microbiológicas da água purificada distribuída

A Tabela 8 apresenta as análises da água purificada distribuída. Os resultados mostram que nos pontos de distribuição da água purificada os requisitos físico-químicos estão aceitáveis, não tendo ocorrido diferença significativa entre pontos.

As análises físico-químicas da água purificada são de grande importância para a comprovação de um produto com qualidade.

A qualidade da água purificada depende de uma série de fatores, tais como tipo de sistema de purificação, procedimentos de armazenamento e distribuição da água purificada produzida. Além disso, são necessárias avaliações constantes do sistema de purificação envolvendo procedimentos de monitoramento, manutenção, limpeza (SANTOS; CRUZ, 2008).

Segundo o CLSI (2006), em um sistema de purificação de água, todos os componentes devem ser incluídos em um plano de manutenção e calibração para periodicamente serem realizadas as troca de filtros, calibração e sanitização do sistema.

Tabela 8 - Caracterização da água purificada distribuída pelo sistema Elix 35[®].

Parâmetros	Ponto III					Ponto IV				Ponto V			
	N ¹	Média ²	DP	Máximo	Mínimo	Média ²	DP	Máximo	Mínimo	Média ²	DP	Máximo	Mínimo
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	18	1,66	$\pm 0,1$	1,95	1,36	1,64	$\pm 0,2$	1,95	1,26	1,61	$\pm 0,2$	2,04	1,24
pH	25	6,73	$\pm 0,5$	8,2	5,7	6,63	$\pm 0,6$	8,75	6,03	6,61	$\pm 0,6$	8,30	5,95
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	25,6	$\pm 2,0$	29,1	21,5	25,6	$\pm 1,9$	29,5	21,0	25,4	$\pm 2,0$	28,9	21,1
Substâncias Oxidáveis	25	Ausente	-	-	-	Ausente	-	-	-	Ausente	-	-	-
Sólidos Totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	7	2,1	$\pm 1,0$	3,6	0,75	1,9	$\pm 1,7$	4,3	0,3	3,4	$\pm 3,4$	10	0,4
Sílica (SiO_2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	25	$\leq 0,1$	-	-	-	$\leq 0,1$		-	-	$\leq 0,1$	-	-	-
Bactérias Heterotróficas ($\log_{10}$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$)	40	2,18	$\pm 0,6$	4,45	0,48	2,19	$\pm 0,6$	0,44	0,44	2,20	$\pm 0,6$	4,77	0,55

DP= Desvio Padrão; N¹ número de amostras; ² Média aritméticas

3.3.1. Condutividade

A Figura 14 mostra a variação de condutividade para os pontos de distribuição III, IV e V.

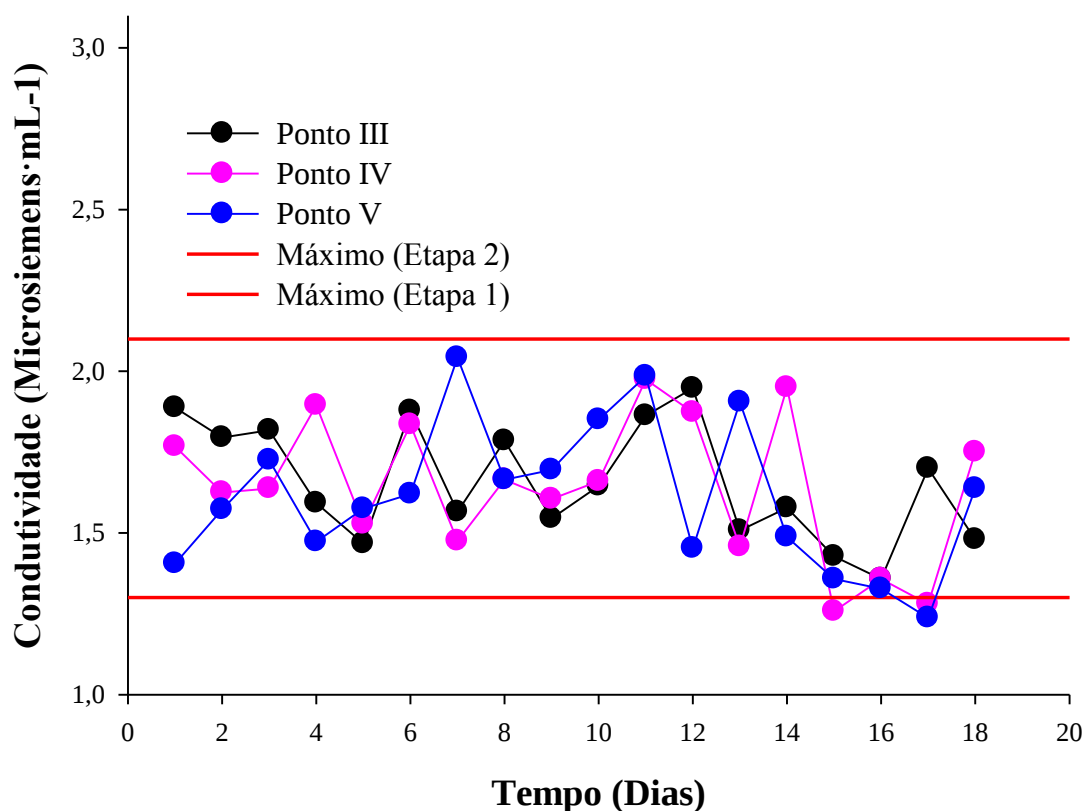


Figura 14 - Monitoramento da água purificada distribuída nos pontos III, IV e V em função da condutividade.

As moléculas de água dissociam-se em íons em função do pH e da temperatura, resultando em uma determinada condutividade. A condutividade e o pH da água são afetados pelo dióxido de carbono dissolvido na água (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A exposição da amostra à atmosfera altera a condutividade e o pH, em decorrência da perda ou ganho de gases dissolvidos. A absorção de CO₂ atmosférico pela água leva à uma formação de um tampão (Equações 11, 12 e 13).



A especificação da condutividade para água purificada, segundo as Farmacopeia Brasileira e Americana, deve ser inferior a $1,3 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, à temperatura de $25,0^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Etapa 1). Os resultados encontrados estiveram acima desse valor, porém, a água purificada obedece às exigências para o teste de condutividade. Isto se deve à metodologia utilizada para a medida da condutividade (Etapa 2).

O CLSI e a APHA (2005) recomendam a medida em linha diariamente, através de um eletrodo adaptado à tubulação, já que a contaminação atmosférica, causa leitura instável, principalmente quando a água purificada é do tipo I (CLSI, 2006).

3.3.2. pH

A Figura 15 apresenta o gráfico dos valores obtidos de pH da água purificada distribuída nos pontos III, IV e V. As médias calculadas e os desvios padrão foram $6,73 \pm 0,50$; $6,63 \pm 0,62$; $6,61 \pm 0,60$; para os pontos III, IV e V, respectivamente.

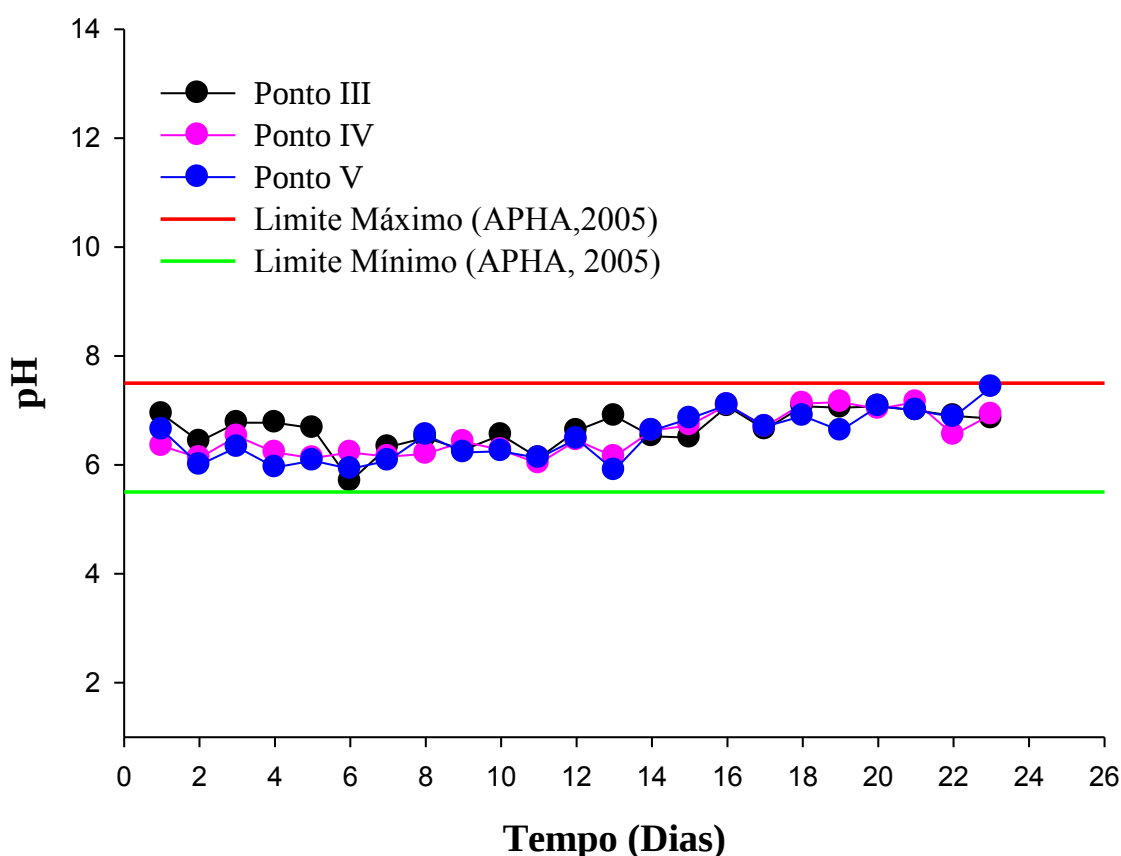


Figura 15- Monitoramento da água purificada distribuída nos pontos III, IV e V em função do pH.

A leitura do pH é um dos testes mais importantes e frequentemente utilizados na química da água (APHA, 2005). Contudo é difícil medir o pH de uma água purificada, devido à baixa força iônica da solução, pois a rápida absorção de dióxido de carbono afeta a leitura (ELGA, 2012). Segundo recomendações do CLSI (2006), a resistividade é mais sensível que o pH para medir contaminações de H^+ e OH^- da água.

A APHA (2005) recomenda que o controle da qualidade da água purificada utilizada no preparo de meios de culturas e testes microbiológicos seja determinado a cada utilização e a faixa de valores é de 5,5 e 7,5.

A água purificada produzida apresentou valor médio de pH de 7.7, com a distribuição da água houve redução de pH em relação à água purificada produzida (Tabela 7). Isto pode ser considerado porque a turbulência do fluido pode conduzir a uma redução dos valores de pH devido à absorção de dióxido de carbono, que dissocia para formar um ácido carbônico fraco (CHAVES, 2002).

Desta forma, para manter a alta qualidade da água durante seu armazenamento, o tanque de armazenamento deve estar equipado com filtro de respiro, que impede a penetração de possíveis contaminantes vindos do ambiente, tais como dióxido de carbono, partículas, micro-organismos e compostos orgânicos voláteis. No período analisado, este dispositivo não estava com sua reposição válida.

3.3.3. Sílica, sólidos totais e substâncias oxidáveis

Em relação à sílica, em todas as amostras analisadas, o conteúdo foi menor que $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, fato atribuído à qualidade da água de alimentação, que apresentava baixa concentração (média de $15,23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) desses sais, e também à eficiência da membrana de osmose reversa (remoção de 99,9 % de sílica).

Também devido às etapas de microfiltração pelo cartucho Progard TL[®] e à tecnologia de membrana de Osmose Reversa, a concentração de sólidos totais cumpre os requisitos especificados pela Farmacopeia Britânica de conter no máximo 0,001% (m/v).

As amostras analisadas apresentaram ausência para o teste de substâncias oxidáveis, atendendo às exigências da Farmacopeia Brasileira. Esses resultados podem ser associados à eficiência do sistema de purificação em fornecer a água com valores de carbono orgânico menores que $0,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Também pode estar associado ao fato de que este teste é considerado apenas qualitativo, fornecendo uma segurança relativa quanto à presença de COT, sem, portanto, quantificar este material, não sendo ideal a aplicação desta metodologia.

Apesar disso, e de acordo com Farmacopeia Brasileira (2010), o teste de medida do carbono orgânico total poderá ser substituído pelos testes de substâncias oxidáveis.

3.3.4. Análises microbiológicas

As contagens de bactérias heterotróficas na água coletadas nos pontos III, IV e V foram realizadas por dois métodos diferentes: a) pela técnica de membranas filtrantes de 0,45µm, depositadas em placas de Petri, acrescidas de 0,005% (m/v) de cloreto de trifênil tetrazólio no meio de cultura R2A e b) pela técnica de *pour plate* com R2A, sendo o indicador adicionado no momento da contagem.

A utilização do cloreto de trifênil tetrazólio promove a coloração das colônias para vermelho, facilitando a contagem. Porém, este composto poderia comprometer a viabilidade das células.

Verificou-se que a utilização do método de filtração por membrana não foi satisfatório, pois, além da possível interferência do cloreto de trifênil tetrazólio, o número de células estava muito elevado para utilização desta técnica, dificultando a enumeração. Deste modo, determinou-se a contagem pela técnica *pour plate*.

Pela técnica de *pour plate* (Figura 16), as contagens de bactérias heterotróficas da água purificada distribuída nos três pontos apresentaram aproximadamente o mesmo nível de contaminação bacteriana, não tendo ocorrido diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) (Figura 16).

Os resultados mostram que em grande parte dos dias o número de bactérias estavam acima do permitido ($2 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $100 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). Esse limite é uma especificação utilizada pelas Farmacopeias Americana (USP 30), Britânica (2009) e Brasileira (5ª Edição).

É importante notar que a detecção de bactérias é uma estimativa, uma vez que depende do cultivo direto das técnicas de plaqueamento. Assim, a enumeração das bactérias por meio de tais métodos pode subestimar significativamente a extensão do problema e dos níveis reais da presença de bactérias em vários ambientes (KULAKOV et al., 2002).

O CLSI (2006) também recomenda a técnica de microscopia de epifluorescência para determinar a concentração de micro-organismos em água purificada, entretanto, não há especificações para valores limites na contagem.

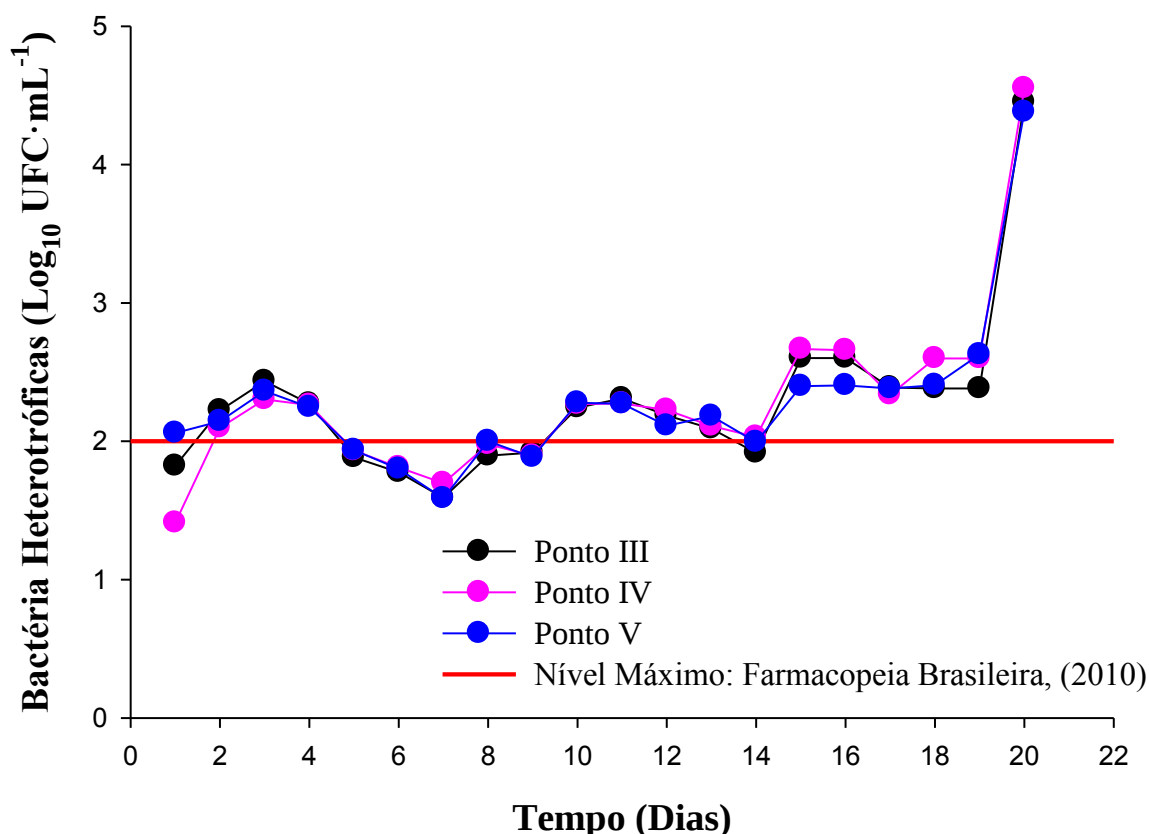


Figura 16 – Log₁₀ UFC·mL⁻¹ do número de bactérias heterotróficas da água purificada distribuída pelo sistema de purificação de água Elix 35[®].

O meio de cultura utilizado para as análises microbiológicas foi o R2A. Este meio de cultura permite obter melhores resultados, ou seja, recuperar um número maior de bactérias heterotróficas e por isso obter contagens expressivamente mais elevadas em amostras de água do que o meio tradicionalmente usado, o PCA (CHAVES, 2002; ALMODOVAR et al., 2009).

Mesmo em ensaios analíticos simples, a água purificada utilizada nos laboratórios com altos níveis de bactérias pode interferir em experimentos diretamente ou por meio de seus subprodutos como pirogênicos, fosfatase alcalina ou nucleases (ELGA, 2012).

A água purificada produzida pelo sistema apresentou nível microbiológico aceitável ($< 2 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, Tabela 7), porém, com o armazenamento houve um aumento da população bacteriana de aproximadamente 2 ciclos log, que pode estar relacionado com a presença de biofilmes e a multiplicação microbiana.

Florjanič e Kristl (2011), investigaram como o número de micro-organismos do biofilme influencia o número de células planctônicas na água purificada. Esses autores verificaram alta correlação positiva (r entre 0,99 e 0,84) entre o número de células

planctônicas da água purificada ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o número bactérias heterotróficas no biofilme ($\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$). Estes resultados sugerem que as bactérias do biofilme são continuamente desprendidas deste para o meio do líquido.

Por outro lado, Boe-Hansen et al. (2002) relatam que o número de bactérias planctônicas não se deve apenas às bactérias desprendidas do biofilme, mas também à multiplicação das bactérias no meio do líquido, que também deve ser considerado.

A água purificada apresenta quantidades mínimas de moléculas orgânicas e inorgânicas, ou seja, um ambiente escasso de nutrientes. Porém, é conhecido que muitos micro-organismos têm se adaptado a essas condições rigorosas de nutrientes e podem sobreviver e se multiplicar nestes ambientes adversos. Estes podem induzir respostas de adaptação a estresses ambientais por expressar genes específicos, resultando em alterações na fisiologia do organismo, incluindo alterações no metabolismo e alterações estruturais (YOUSEF; JUNEJA, 2003).

No período analisado, a água purificada distribuída era mantida em recirculação por período de 12 h, regime turbulento e velocidade média de $0,87 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Segundo Santos e Cruz (2008), a velocidade de fluxo do *loop* para manter a turbulência deve ser superior a 2,5ft/s, ou seja, $0,75 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

A possível presença de biofilmes nas superfícies do reservatório e dos tubos do *loop* de distribuição pode ter ocorrido devido ao tempo de estagnação da água purificada por 12 horas, o que pode favorecer uma adesão bacteriana. Como o tempo em que água purificada permaneceu parada no reservatório por período de 12 h foi de aproximadamente 28 meses, há uma grande possibilidade do desenvolvimento de biofilmes no sistema de distribuição.

Florjanič e Kristl (2011) afirmaram que a água purificada, mesmo em concentrações de carbono orgânico total inferiores a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ proporcionou formação de biofilmes. Quando a água não foi estocada, sendo distribuída continuamente sob o fluxo constante, o número de bactérias no biofilme no tanque de armazenamento foi 40 vezes menor.

O aumento de 2 ciclos log na água purificada distribuída, mencionado acima, pode ser devido à multiplicação das bactérias, mesmo o sistema de distribuição estando em operação de circulação de água em regime turbulento. Outros fatores importantes, como o pH (média 6,73) e a temperatura (média 25,6) (Tabela 8), são favoráveis à multiplicação das bactérias neste meio, mesmo em concentrações ínfimas de carbono e íons.

Este fato foi evidenciado por Chaves (2002), que verificou que a concentração de bactérias cultiváveis em R2A foi maior em regime turbulento do que em regime laminar, independentemente da concentração de nutrientes da água potável objeto de estudo.

3.4. Higienização do sistema de purificação de água

A limpeza do cartucho das membranas de osmose reversa é recomendada pelo fabricante sempre que a porcentagem de rejeição de íons diminui 3% ou o fluxo de água diminuir a 10% em condição de operação padrão (MILLIPORE, 2012). A porcentagem média de rejeição pela membrana analisada mensalmente no período de agosto 2012 a agosto 2013 foi de 96,85 % e o desvio, de $\pm 0,48$.

No sistema de purificação Elix 35[®], o fabricante recomenda o uso dos produtos RoClean A[®] ou RoClean B[®] para a limpeza do cartucho de osmose reversa.

O RoClean A é um produto de limpeza composto de princípios ativos ácidos. É normalmente utilizado quando a água de alimentação contém uma quantidade elevada de dureza e alcalinidade ($\geq 300 \text{ CaCO}_3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (MILLIPORE, 2012). Este produto não foi utilizado, pois, de acordo com as análises de dureza e alcalinidade da água de alimentação (potável), as concentrações de CaCO_3 estão em níveis que não apresentam riscos de incrustações na membrana (Tabela 6).

O RoClean B é um produto de limpeza formulado com ingredientes ativos alcalinos. É normalmente utilizado quando a água de alimentação contém uma quantidade elevada de lodo e outros materiais orgânicos (MILLIPORE, 2012). A água utilizada para alimentação do sistema é oriunda da ETA/UFV e apresenta baixos valores de turbidez (média de 0,14 uT).

A sanitização das membranas de osmose reversa foi realizada com tabletes de dihidrato de dicloroisocianurato de sódio (MILLIPORE, 2003).

A recomendação de sanitização pelo fabricante, referida no manual, é para ser realizada a cada 12 semanas, porém, a sanitização mensal é o ideal para prevenção da formação de biofilmes (MILLIPORE, 2012).

A higienização do reservatório de água potável e a sanitização das membranas de osmose reversa e as trocas dos filtros proporcionaram um aumento na eliminação de íons na membrana de osmose reversa (96,5 % para 98,4 %).

A sanitização do tanque de estocagem é recomendada para diminuir/eliminar os seguintes contaminantes: COT, pirogênios, bactérias, e biofilme. O fornecedor

recomenda realizar o procedimento de sanitização do reservatório no máximo a cada 180 dias, ou quando há resultados microbiológicos insatisfatórios.

A sanitização consiste em remover os contaminantes e materiais incrustados no interior dos equipamentos de purificação de água, devendo ser conduzida com frequência regular. O monitoramento microbiológico do sistema de purificação de água e a identificação dos micro-organismos resistentes são fatores importantes para a escolha dos agentes sanitizantes (DIAS, 2007).

Anteriormente ao procedimento de sanitização do tanque de estocagem, foi feito o teste de *swab* para verificar o nível de contaminação bacteriana nas superfícies de contato com a água purificada (Tabela 9).

Para evitar uma possível contaminação e não interromper a distribuição de água purificada após a sanitização, foi feito o *swab* somente na área do tanque.

Tabela 9 – Enumeração de bactérias heterotróficas ($\log_{10}$ UFC·cm⁻²) nas conexões (Ponto III, IV e V) e no tanque de estocagem.

Fonte	Log ₁₀ UFC·cm ⁻² *	Desvio Padrão
Conexão ¹ (Ponto III)	5,09	± 0,31 **
Conexão ¹ (Ponto IV)	5,30	± 0,22 **
Conexão ¹ (Ponto V)	4,80	± 0,11 **
Tanque de armazenamento ²	5,63	± 0,05 ***
Após sanitização do tanque ³	1,29	± 0,29 ***

¹ Especificação da conexão em polipropileno: Tecnoplástico marca Belfano. ² Material do tanque de armazenamento (polietileno). ³ Sanitização do tanque de armazenamento com solução de hipoclorito de sódio 500 mg·L⁻¹. *Contagens de bactérias heterotróficas em meio R2A. ** Média de duas repetições. *** Média de três repetições.

Houve diferença após o procedimento de sanitização na contagem de bactérias heterotróficas.

A vantagem da sanitização do tanque foi a redução da contagem de bactérias heterotróficas, tendo sido obtida uma diminuição de 4,34 ciclos log. A desvantagem deve-se principalmente à interrupção na operação do sistema de purificação, portanto do abastecimento de água purificada. Além disso, o procedimento é trabalhoso, por requerer diversos enxágues para remoção completa do sanitizante químico.

Uma solução de hipoclorito de sódio também foi utilizada por Dias (2007) na sanitização do tanque de estocagem, filtros de 0,05 µm e o *loop* de distribuição no sistema de purificação de uma indústria de artigos para a saúde. Porém, em uma concentração de 0,4 % com tempo de contato de 240 min.

Após o procedimento de sanitização, efetuou-se o monitoramento da qualidade microbiológica da água purificada distribuída (Figura 17). Verificou-se aumento gradativo nas contagens de bactérias heterotróficas, tal aumento pode ser explicado pela hipótese do sanitizante ter removido a camada superficial do biofilme formado, ocorrendo novamente crescimento do biofilme e desprendimento de suas células até um estado estacionário.

As bactérias presentes na água purificada podem proliferar e resultar na formação de biofilmes na superfície do reservatório de armazenamento. Esse biofilme é difícil de remover, mesmo com sanitização química e lavagem mecânica, constituindo uma fonte de recontaminação para a água armazenada.

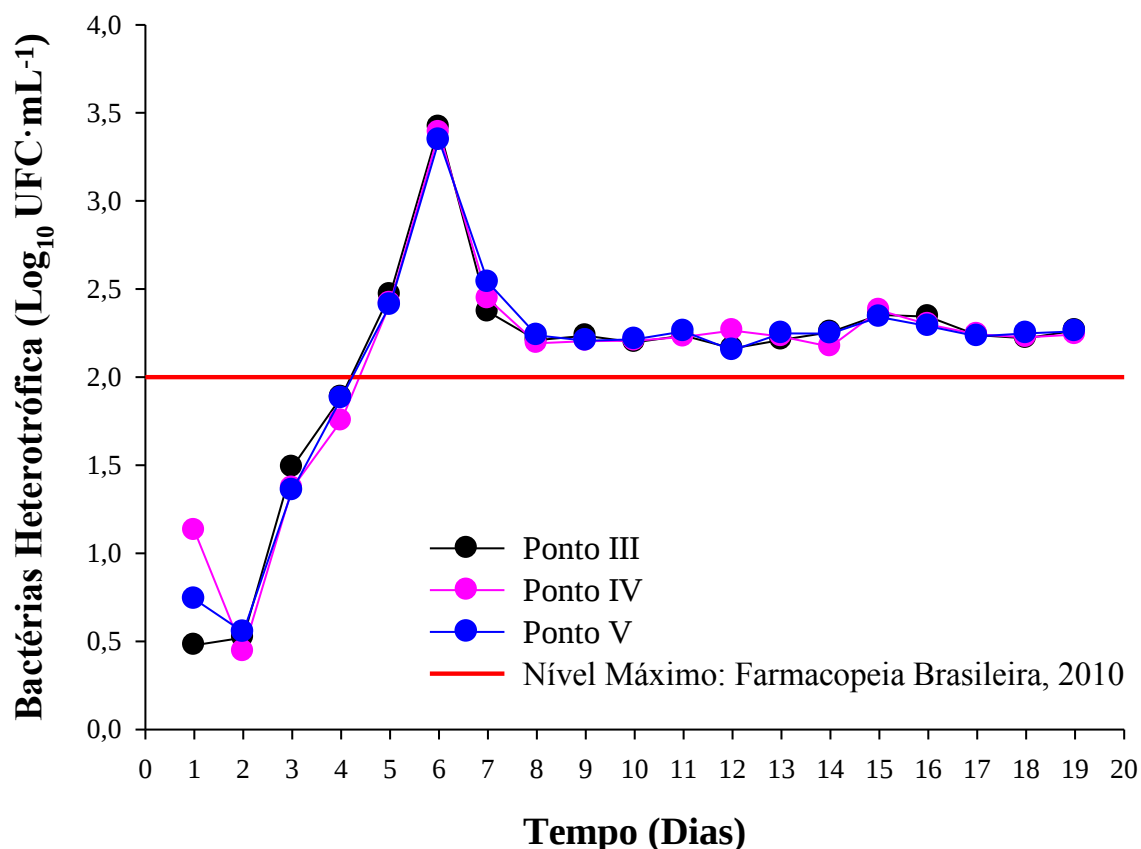


Figura 17 - Log₁₀ UFC·mL⁻¹ do número de bactérias heterotróficas da água purificada distribuída pelo sistema de purificação de água após a sanitização.

A sanitização periódica com agentes químicos pode representar um processo extremamente oneroso, além de trabalhoso, e causar interrupções na distribuição de água.

Deste modo, a sanitização com o emprego de luz ultravioleta apresenta a vantagem de não alterar quaisquer características físico-químicas da água.

Para prevenir a proliferação de bactérias e a formação de biofilmes no reservatório do sistema de purificação de água, há a opção do módulo de sanitização automática (ASM), que utiliza uma lâmpada UV a 254 nm, com iluminação pré-programada. A incidência da lâmpada por tempo de 10 min, segundo instruções do fabricante, reduz e mantém o nível de contaminação controlado (MILLIPORE, 2012).

Para manter a qualidade da água purificada nos tanques de armazenamento, principalmente com relação ao parâmetro microbiológico, devemos considerar que o material utilizado no *loop* de distribuição deve evitar a adesão e minimizar a formação de biofilmes, além disso, observar a importância de manter um filtro esterilizante hidrofóbico de ventilação, adequadamente posicionado, para evitar o colapsamento do tanque.

A temperatura de armazenamento e distribuição de água é outro fator importante que deve ser considerado, visto que a água circulando em *loop* a quente entre 65° e 80°C é considerada auto-saneante (FDA, 2009).

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A água potável que abastece o sistema de purificação de água apresenta boa qualidade, tanto para as especificações físico-químicas como microbiológicas, o que favorece a obtenção de uma água purificada de boa qualidade.

Entretanto, para assegurar a pureza e a qualidade contínua da água purificada e otimizar o processo, o sistema de purificação deve incluir a integração operacional dos equipamentos, que devem estar constantemente sanitizados, e sua eficiência precisa ser regularmente avaliada.

A eficiência dos sistemas de purificação de água depende da correta e frequente manutenção e reposição dos elementos filtrantes e acessórios do equipamento e da sanitização com produtos químicos específicos.

A água purificada produzida pelo sistema avaliado atende aos padrões de qualidade da Farmacopeia Brasileira (2010). A água distribuída apresenta uma qualidade físico-química excelente quanto às características de condutividade, sílica, carbono orgânico total, porém diminui sua qualidade em relação à qualidade microbiológica.

A higienização do reservatório de água potável é imprescindível, uma vez que os resultados deste procedimento mostraram redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de bactérias heterotróficas. Deste modo, recomenda-se realizar o procedimento no período mínimo a cada 6 meses.

Já a sanitização do reservatório de água purificada foi eficiente, porém os resultados microbiológicos mantiveram-se em níveis aceitáveis por curto período. Nesse sentido, uma opção para manter nível mínimo de bactérias heterotróficas na água purificada distribuída seria a utilização de uma lâmpada UV conectada ao reservatório.

Além disso, os usuários dos laboratórios de pesquisa devem ser orientados para a troca de água diariamente em seus reservatórios, uma vez que, com o tempo de estocagem, a qualidade físico-química e microbiológica é diminuída. É comum os usuários estocarem a água purificada em reservatórios de PVC por até 7 dias, sendo o recomendado 24 horas, no máximo.

Igualmente, o plano de manutenção deve incluir o monitoramento da água purificada distribuída por meio de análises físico-químicas e microbiológicas a serem realizadas mensalmente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T.C.; BUGNO, A. Eficiência do ágar R2A na contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.2, n. 68, p. 232-236. 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 2005.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standard Specification for Reagents Water**, Document D1193-91. 1991.

AMJAD, Z., Reverse Osmosis: Membrane technology, water chemistry & industrial applications, Van Nostrand-Reinold, New York, 1993.

BERESCHENKO, L.A.; HEILIG, G. H. J.; NEDERLOF, M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; STAMS, A. J. M.; EUVERINK, G. J. W. Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5297-5304, 2008.

BERESCHENKO, L.A.; STAMS, A. J. M.; EUVERINK, G. J. W.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2623–2632, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jan., 2012.

BRAGA, M.D. **Análise de perigos e pontos críticos de controle-APPCC: Estudo de caso no sistema de abastecimento de água da Universidade Federal de Viçosa**. 2007. 87 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2007.

BREDA, E. M. **Água grau Reagente para laboratório e outros fins especiais**. 2001. Disponível em: <<http://lqes.igmm.unicamp.br/canalcientifico>>. Acesso em 11 oct.2011.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London. 2009. Volume I & II Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances. Purified Water.

BOE-HANSEN, R.; ALBRECHTSEN, H. J.; ARVIN, E.; JORGENSEN, C. Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. **Water Research**, v. 36, n.18, p. 4477-4486. 2002.

CARTWRIGHT, P. E. The role of membrane technology in water purification applications. **Filtration & Separation**, July/August. p. 564-567. 1997.

CARTWRIGHT, P.E. Ultrapure water system design considerations. **Desalination**, v. 67, p. 171-184, 1987.

CASTANHEIRA, A.P.A. **Aplicación de membrana de nanofiltración para eliminar disruptores endocrinos en la potabilización del agua**, 2010. 471p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, Espanha.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. Approved guideline. Fourth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document C3-A4**, 2006.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2004.

DIAS, F. N. **Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual de óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GPD) com indicador de controle de processo**. 2007. 120 p. Dissertação. Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

ELGA, LabWater. **Pure Water Guide**. Disponível em: <<http://www.elgalabwater.com/cache/>>. Acesso em: 2 de janeiro 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5. ed. Brasília, 2010.

FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. High Purity Water Systems. **Inspection guides**. Nº 7/93. Inspections, Compliance, Enforcement, and Criminal Investigations.

FLORJANIČ, M.; KRISTL, J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 16–22. 2011.

ISHII, N. Optimal purification technology of ultrapure water for instrumental analysis. **Bunseki Kagaku**, v. 60, n. 2, p. 103-113. 2011.

ISO 3696. International Organization for Standardization: **Water for analytical laboratory use — Specification and test methods**, 1987.

KRAEMER, C.F. **Construção e pré-tratamento de uma planta piloto de osmose reversa e nanofiltração na indústria**. 2009. 169 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

KULAKOV, L.A; MCALISTER, M. B.; OGDEN, K. L.; LARKIN, M. J.; O'HANLON, J. F. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1548-1555, 2002.

MACÊDO, J.A.B. D. **Águas & Águas**. 3 ed. Revisada e atualizada. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2007

MADAENI, S.S.; SAMIEIRAD, S. Chemical cleaning of reverse osmosis membrane fouled by wastewater. **Desalination**, v. 257, p.80-86. 2010.

MALAEB, L.; AYOUB, G.M. Reverse osmosis technology for water treatment: State of the art review. **Desalination**, n. 267. p. 1-8. 2011.

MEDEIROS, H.S. **Vesícula de polidiacetileno para detecção de triclorometano em água potabilizada**. 2011. 53.f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2011.

MENDES, M. M.; FAGUNDES, C. C.; PORTO, C.C.; BENTO, L.C.; COSTA, T.G.R.; SANTOS, R.A; SUMITA, N. A importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47. n. 3. p. 217-223. 2011.

MILLIPORE Corporation. **Elix 35®. User Manual**. Frace. 2003.

MILLIPORE Corporation. Elix® 20/35/70/100. **Water Purification**, Lit. n. PB7469EN00, EMD Millipore, Billerica; MA, U.S.A. 2012.

NING, R.Y.; NETWING, J.P. Complete elimination of acid injection in reverse osmosis plants. **Desalination**, v. 143, p. 39-34. 2002.

OLIVEIRA, D.R. **Pré-tratamento do processo de osmose inversa utilizando microfiltração e investigação e técnicas de limpeza e recuperação de membranas**. 2007. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.2009.

RIDGWAY, H. F.; JUSTICE A. K. C.; OLSON, B. H. Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45. n.3, p. 1066-1084. 1983.

SANTOS, K.A.; CRUZ, E.A. Sistemas de geração e distribuição de água purificada na indústria farmacêutica. **Fármacos e Medicamentos**. n. 50.p- 34-41. Jan/Fev. 2008.

SILVA, C. H. P. M.; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.4, 243-253, 2006.

SOHRABI, M.R.; MADAENI, S.S.; KHOSRAVI, M.; GHAEDI, A.M. Chemical cleaning of reverse osmosis and nanofiltration membranes fouled by licorice aqueous solutions. **Desalination**, v. 267, p. 93-100. 2011.

PEÑA, J. et al. The vaterite saturation index can be used as a proxy of the S&DSI in sea water desalination by reverse osmosis process. **Desalination**. v. 254, p.75-79. 2010.

STEWART, B. M. The production of high- purity water in the clinical laboratory. CE Update Water III. **Lab Medicine**, v. 31, n. 11, p.605-11, 2000.

TAYLOR, J. S.; JACOBS, E.P., Reverse osmosis and nanofiltration. In: Joel Mallevialle et al. (eds), **Water Treatment Membrane Processes**, p. 9.1-9.70. McGraw Hill, New York, 1996.

UNITEK – Livraria técnica: artigos técnicos sobre purificação de água e filtração com membranas. Disponível em: <http:// <http://www.unitekdo brasil.com.br> >. Acesso em: 20 janeiro 2012.

YOUSEF, A. E.; VIJAY, K. J. **Microbial stress adaptation and food safety**, CRC Press. United States of America. 2003.

WHITEHEAD, P. Laboratory monitoring of total organic carbon in ultrapure water. Application Note. **American laboratory**, 2003.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE BACTERIANA E HIDROFOBICIDADE DOS ISOLADOS DO SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA

1. INTRODUÇÃO

Embora a água purificada contenha quantidades mínimas de moléculas orgânicas e inorgânicas geralmente expressas em $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, um grupo de micro-organismos conhecido como oligotróficos tem se adaptado a essas condições rigorosas (RIDGWAY, RIGBY, ARGO, 1984; McFETERS et al., 1993; KULAKOV et al., 2002).

É geralmente admitido que as bactérias predominantes em sistemas de purificação de água são bastonetes gram-negativos, principalmente dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e *Acinetobacter* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os sistemas de purificação de água também são susceptíveis à adesão e ao estabelecimento de biofilmes, portanto, podem ser fontes de micro-organismos viáveis na água purificada. Estudos mostraram que os sistemas de purificação de água podem apresentar formação de biofilme nas tubulações (PENNA; MARTINS; MAZZOLA, 2002)

Uma investigação da diversidade microbiana contaminante do sistema de purificação de água é necessária, podendo auxiliar na escolha dos pré-tratamentos mais adequados e de estratégias de higienização mais eficazes (BERESCHENKO et al., 2010). Entre as metodologias disponíveis para a identificação microbiana, a análise da sequência do gene RNA ribossômico 16S rDNA tem sido amplamente utilizada para identificar espécies de bactérias e realizar estudos taxonômicos (BAKER et al., 2003; CHAKRAVORTY et al., 2007; KIM et al., 2011).

A sequência do 16S rDNA é uma subunidade do gene que codifica o RNA ribossômico. Este gene contém sequências conservadas de DNA comuns a todas as bactérias e sequências únicas entre as diferentes espécies de bactérias, sendo utilizado para a identificação bacteriana, por meio da amplificação de sequências alvo, empregando *primers* universais (BAKER et al., 2003).

Além da diversidade microbiana, são importantes os conhecimentos relativos ao mecanismo de adesão bacteriana e formação de biofilmes nas superfícies. Nos biofilmes, as células bacterianas presentes aderem irreversivelmente às superfícies sólidas por meio de substâncias poliméricas extracelulares (HERZBERG; ELIMELECH, 2007; FLORJANIČ; KRISTL, 2011). A remoção de biofilmes em tubulações continua sendo um desafio em sistemas de purificação de água (KULAKOV et al., 2002).

O transporte e a adesão das células bacterianas em suspensão para uma interface sólido-líquido são o primeiro passo na formação de biofilme. O processo de adesão das bactérias a uma superfície é mediado por fatores físico-químicos e biológicos. A aproximação e adesão das bactéria à superfície ocorre inicialmente por meio de interações superfície-bactéria tais como atrações eletrostáticas e hidrofóbicas, que desempenham um papel importante, sendo a adesão mais favorável geralmente às superfícies hidrofóbicas (HERZBERG; ELIMELECH, 2007).

A hidrofobicidade das superfícies é um fator importante no estudo da adesão microbiana, uma vez que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies, em meio aquoso, o filme de água que separa tem que ser removido, e a hidrofobicidade das superfícies interatuantes contribui para a facilidade dessa remoção (ARAÚJO, 2010).

As interações dos micro-organismos com a interface do substrato no processo de adesão podem ser específicas ou não específicas. Interações específicas envolvem o reconhecimento de um determinado sítio, de uma molécula receptora que se encontra na interface do micro-organismos, enquanto a interação não específica é dirigida pelas propriedades físico-químicas das duas interfaces interatuantes: micro-organismos e superfície de adesão (ARAÚJO, 2010).

Vários fatores podem influenciar a adesão das bactérias às superfícies, como a hidrofobicidade das células e os apêndices celulares que contribuem para aumentar a adesão (PANG et al., 2005; HERZBERG; ELIMELECH, 2007). Outros fatores, tais como rugosidade da superfície, a velocidade de escoamento e as características da solução aquosa (pH, nível de nutrientes e força iônica), também são importantes na formação inicial do biofilme (BERNARDES, 2008).

Muitos progressos têm sido realizados na última década para elucidar os mecanismos moleculares da adesão bacteriana, a compreensão da estrutura e a composição dos biofilmes (FLORJANIČ E KRISTL, 2011).

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para descrever e, simultaneamente, prever a adesão bacteriana em superfícies. A adesão pode ser explicada pelas teorias DLVO, Termodinâmica da Adesão e pela Teoria DLVO Estendida, esta última uma

integração dos aspectos termodinâmicos com a teoria DLVO. Porém, nenhuma destas teorias considera os aspectos microbiológicos da adesão (ANDRADE, 2008).

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivos identificar isolados bacterianos da água do sistema de purificação pela técnica de biologia molecular e prever a termodinâmica de adesão em função da hidrofobicidade das superfícies dos micro-organismos e do polipropileno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento das bactérias da água potável e água purificada

As colônias desenvolvidas nas placas de Petri contendo R2A com diferentes tipos de morfologia e cor foram isoladas e repicadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Fluka Analytical®). As culturas puras das diferentes bactérias foram mantidas à temperatura de -18 °C em microtubos contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (80:20) e, após preparação adequada, submetidas aos testes de biologia molecular.

Foram selecionados 13 colônias e usada a técnica da coloração de Gram para todos os isolados.

2.2. Identificação genética dos isolados bacterianos

Os testes de biologia molecular dos isolados das bactérias da água potável e purificada foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH- DTA-UFV).

2.2.1. Extração de DNA das amostras

A extração de DNA de 13 isolados por diferença morfológica foi feita com o kit “*Wizard® Genomic DNA Purification*” (Promega, Estados Unidos).

Para a extração do DNA, os isolados bacterianos foram reativados em caldo BHI e incubados a 35 °C, durante 24 h. Foi retirado 1 mL das suspensões, que foi transferido a microtubos de 1,5 mL. Inicialmente, os tubos foram centrifugados a 12000 *g* por 2 min para obtenção de um *pellet* de cada amostra.

Os isolados das bactérias gram-positiva foram ressuspensos com 480 µL da solução de EDTA 50 mMol·L⁻¹ e adicionados 120 µL de solução de lisozima (10 mg·mL⁻¹) para permitir a degradação da parede celular e liberar o DNA. Após, as amostras foram incubadas a 37 °C por 60 min e, em seguida, centrifugadas a 12000 *g* por 2 min, e o sobrenadante, removido (PROMEGA, 2010).

Os *pellets* das bactérias gram-negativas e gram-positivas foram resuspensos com 600 µL da solução de lise e novamente submetidos ao vortex e incubados a 80 °C

por 5 min para a lise das células. Após, foram adicionados 3 µL da solução *RNase*[®] ao lisado de células. A solução foi submetida ao vortex e incubada a 37 ° C por 60 min.

Após a incubação, foram adicionados 200 µL da solução de precipitação de proteína para o lisado celular tratado com *RNase*[®] e homogeneizado ao vortex.

As amostras foram imersas em gelo durante 5 min e, em seguida, centrifugadas a 12000 *g* por 3 min. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido a microtubos de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão até a formação de fios filiformes de DNA com uma massa visível. Os tubos foram centrifugados novamente a 12000 *g* durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre um papel absorvente, e o *pellet* foi deixado secar ao ar por 10-15 min.

Para a resuspensão do DNA, foram adicionados 30 µL da solução de reidratação, incubados a 65 ° C, durante 60 min. O microtubo contendo o DNA foi armazenado a -18 ° C até o momento de sua quantificação.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop-100 (Thermo Scientific). Esse aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácidos nucleicos utilizando 1 µL e estima a quantidade de DNA na amostra em ng·µL⁻¹.

2.2.2. Amplificação parcial do gene 16S rDNA

Para determinação dos gêneros e espécies bactérias presentes na água purificada, foram realizadas análises de PCR convencional, utilizando um par de *primers* universal sintetizados pela empresa Sigma[®] (Sigma, Estados Unidos) (iniciador 27F 5-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3 e reverso 1378R 5-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3). Estes *primers* amplificam parcialmente o gene ribossomal bacteriano 16S em fragmentos com cerca de 1400 pb.

As reações de amplificação foram realizadas em microtubos apropriados de 0,2 mL aos quais foi adicionado um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA, 2,5 µL do reagente 10X *Buffer* (Sigma[®], Estados Unidos), 0,5 µL de dNTP a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega[®], Estados Unidos), 0,25 µL de *Taq Polymerase* na concentração de 5 unidades·µL (Sigma[®], Estados Unidos) 1,0 µL do primer iniciador e 1,0 µL do primer reverso e 18,75 µL de água ultrapurificada, esterilizada a 121 °C.

A reação de PCR foi realizada em termociclador marca Axygen maxygene (Estados Unidos). As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 3 min de

desnaturação a 94 ° C; 35 ciclos de amplificação a 94 ° C por 1 min; anelamento a 55 ° C por 1 min e extensão a 72 ° C por 2 min e 72 ° C por 10 min.

Para verificação da amplificação do rDNA, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) (Sigma®, Estados Unidos), em tampão TBE 0,5X contendo brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado por meio do sistema Canon®.

2.3. Sequenciamento do produto amplificado na PCR

Os produtos da PCR foram sequenciados bidirecionalmente com os *primers* de oligonucleotídeos universais 27 F e 1378 R genes pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) com o sequenciador modelo 3730XL, Applied BioSystems, USA.

As sequências bidirecionais obtidas foram comparadas à sua fita complementar, gerando uma fita consenso gerada pelo programa *DNA Baser software* 3.5.4 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). As sequências obtidas de cada isolado foram submetidas à análise comparativa ao banco de dados depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

A tradução da sequência de DNA para aminoácidos dos diferentes isolados foi realizada utilizando o algoritmo BLASTN, o qual traduz uma sequência de nucleotídeos para aminoácidos e os compara com as sequencias depositadas no banco de dados do NCBI.

2.4. Determinação da energia livre de Gibbs e hidrofobicidade das superfícies

2.4.1. Medida do ângulo de contato para a superfície

Amostras do mesmo material do *loop* de distribuição (placas de polipropileno, marca Belfano, modelo *tubelli* DE 32) foram submetidas à determinação dos ângulos de contato. Anteriormente foram convenientemente lavadas e desengorduradas com detergente líquido, enxaguadas com água destilada, imersas em álcool etílico 96 % (v/v) por 1 hora para remoção de gordura, enxaguadas novamente e, posteriormente, secas em estufa a 55 °C.

Os ângulos de contato foram determinados pelo método da gota séssil, utilizando-se o equipamento Goniômetro marca Krüss®, modelo Easy Drop (Hamburg).

Todas as medidas foram efetuadas à temperatura ambiente (25 °C), com a utilização de três líquidos de diferente polaridade: água (tipo I), formamida e α -bromonaftaleno.

2.4.2. Medida do ângulo de contato para micro-organismos

Foi utilizada a metodologia descrita por Busscher et al. (1984), para medir o ângulo de contato sobre a superfície bacteriana pelo método da gota séssil, usando o equipamento Goniômetro (marca Krüss®, modelo Easy Drop, Hamburg), acoplado com analisador de imagem.

As diferentes espécies de bactérias identificadas da água foram ativadas em 30 mL de caldo BHI (Fluka analytical®), durante 20 a 24 h, a fim de se obter uma suspensão da cultura ativa com aproximadamente 10^7 UFC·mL⁻¹.

Após, as culturas ativas foram centrifugadas a 12.000 *g* durante 10 min a 4 °C (Centrífuga marca Eppendorf, modelo *Centrifuge* 5804R). Os *pellets* foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol·L⁻¹ e, após cada lavagem, procedeu-se a uma nova centrifugação. Finalmente, as células foram ressuspensas em PBS 0,1 mol·L⁻¹ e filtradas a vácuo em um sistema de filtração composto de uma membrana de éster de celulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro (Millipore®).

Após a filtração e para que não ocorresse desidratação das células, as membranas foram depositadas em placas de Petri contendo 1% (m/v) de ágar (Difco®) e 10% (m/v) de glicerol 87% (Merck®), previamente preparadas.

As membranas com a camada de células foram cortadas cuidadosamente e depositadas em lâminas de vidro. Deste modo, a membrana ficava bem aderida à lâmina como uma superfície plana e lisa para facilitar a leitura dos ângulos de contato com água, formamida e α -bromonaftaleno.

2.4.3. Cálculos para a determinação da energia livre de interação hidrofóbica (ΔG^{TOT}) e energia livre de Gibbs de adesão entre as superfícies ($\Delta G_{\text{adesão}}$)

A energia livre de interação hidrofóbica ΔG^{TOT} (mJ·m⁻²) das superfícies das bactérias e polipropileno foram calculadas utilizando os componentes da tensão interfacial das superfícies interatuantes (Equação 1).

$$\gamma_l^{TOT} (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+} + 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} \quad (1)$$

Em que:

γ_l é a tensão interfacial total do líquido;

γ_l^{LW} é a tensão interfacial das forças de interações de Lifshitz-van der Waals;

γ_l^+ é a tensão interfacial do componente aceitador de elétrons do componente ácido-base;

γ_l^- é a tensão interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base;

Sendo s e l superfície e líquido, respectivamente.

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial é necessário obter-se o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes. Os valores das componentes polares e apolares dos líquidos utilizados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Valores das componentes da tensão interfacial dos líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão superficial (mJ·m ⁻²)			
	γ_l^{TOT}	γ_l^{LW}	γ_l^+	γ_l^-
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
α -bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Fonte: VAN DER MEI et al. (1998).

Com os valores dos ângulos de contato obtidos com formamida (θ_F), água (θ_W) e α - bromonaftaleno (θ_B) e aplicando-se a equação 1 e a partir do uso das informações contidas na Tabela 1 obteve-se as seguintes equações:

$$5,049 \times \sqrt{\gamma_s^+} + 5,049 \times \sqrt{\gamma_s^-} = 36,4 \times (1 + \cos \theta_A) - 15,55 \times (1 + \cos \theta_B) \quad (2)$$

$$6,293 \times \sqrt{\gamma_s^+} + 1,510 \times \sqrt{\gamma_s^-} = 29 \times (1 + \cos \theta_F) - 20,806 \times (1 + \cos \theta_B) \quad (3)$$

Com a resolução em simultâneo destas três últimas equações, obtiveram-se as três componentes da tensão superficial, γ_s^+ , γ_s^- , que permitem calcular a tensão interfacial de uma superfície (s), γ_s^{TOT} .

$$\gamma_s^{LW} = 11.1(1 + \cos \theta_B)^2 \quad (4)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \quad (5)$$

$$\gamma_s^{TOT} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (6)$$

Em que:

γ_s^{TOT} é a tensão interfacial total da superfície;

γ_s^{LW} é a tensão interfacial das forças de Lifshitz-van der Waals;

γ_s^{AB} é a componente polar da interação ácido-base de lewis;

γ_s^+ é a tensão interfacial do componente aceptor de elétrons da componente ácido-base;

γ_s^- é a tensão interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base;

θ_B é o ângulo de contato formado com o α - bromonaftaleno.

O cálculo para obtenção da energia livre de interação hidrofóbica ΔG_{SAS}^{TOT} entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) é obtida pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interação, ΔG_{SAS}^{LW} e ΔG_{SAS}^{AB} , respectivamente (Van Oss, 1994).

$$\Delta G_{SAS}^{TOT} = \Delta G_{SAS}^{LW} + \Delta G_{SAS}^{AB} \quad (7)$$

$$\Delta G_{SAS}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_w^{LW}} \quad (8)$$

$$\Delta G_{SAS}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_s^-}\right) \quad (9)$$

Os cálculos para a determinação da energia livre de adesão foram realizados conforme equações descritas no trabalho realizado por Van Oss et al. (1994).

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (10)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad (11)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+ \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \gamma_s^+}\right) \quad (12)$$

Em que:

γ_{bs} é a tenso interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão;

γ_{bl} é a tensão interfacial entre as superfícies bactérias/líquido;

γ_{sl} é a tensão interfacial entre as superfícies de adesão/líquido.

Pela aplicação das equações 5, 11, 12 e 13 obtém-se o valor da energia livre de adesão $\Delta G_{adesão}$, que pode ser apresentada da seguinte forma.

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (13)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (14)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (15)$$

A energia livre de adesão entre a superfície de polipropileno e as bactérias isoladas e identificadas da água, foram determinadas para avaliar a influência destas na termodinâmica de adesão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento das bactérias da água potável e água purificada

Com o objetivo de identificar as várias espécies bacterianas presentes na água potável (Figura 1), purificada e água purificada distribuída, foram selecionadas 13 colônias com diferentes aspectos (Tabela 2).

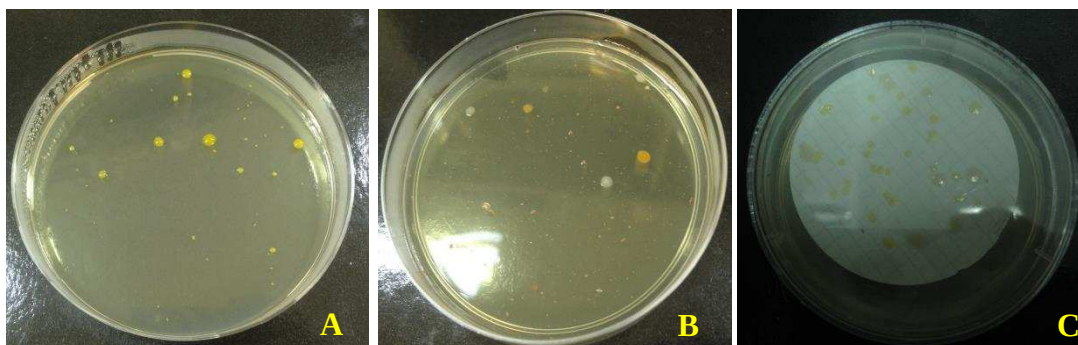


Figura 1 - Placas com diferentes tipos de colônias crescidas em meio de cultura R2A. Colônias provenientes da água potável (A); Colônias provenientes da água purificada distribuída (B); Colônias proveniente da água purificada sem estocagem (C).

Aos isolados da água (Tabela 2) foi efetuado a coloração de Gram (Figura 2).

Tabela 2 – Isolados da água potável e purificada

Localização dos pontos de amostragem	Isolados
Água potável (Ponto I)	A; B; C; D
Água purificada (Ponto II)	E; F; G
Água purificada distribuída (Ponto III)	H; I; J
Água purificada distribuída (Ponto IV)	L; M
Água purificada distribuída (Ponto V)	N

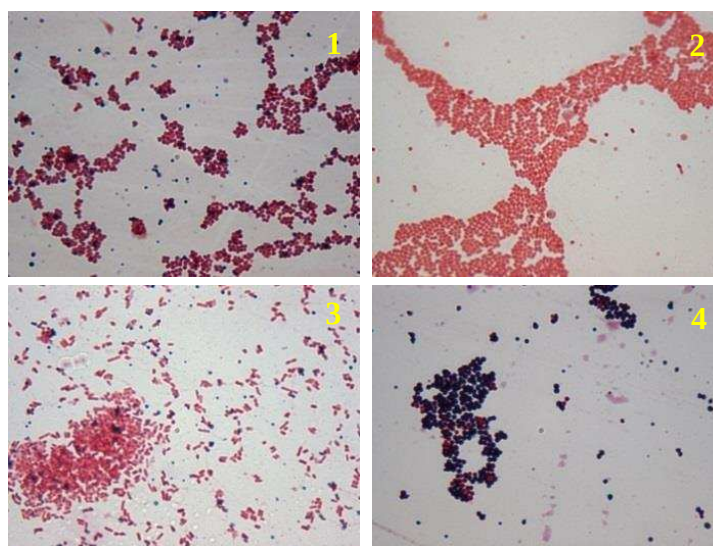


Figura 2 - Coloração de Gram. Bactérias isoladas da água potável (1, 2 e 3). Bactéria isolada da água purificada ponto de amostragem III (4).

3.2. Análise das sequências de 16S rDNA

Os 13 isolados foram submetidos à análise de biologia molecular, utilizando *primer* universal. Somente em uma amostra não foi possível a amplificação nas condições realizadas na PCR, as outras amostras apresentaram o mesmo tamanho no fragmento de rDNA amplificado, que pode ser observado por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) (Figura 3).

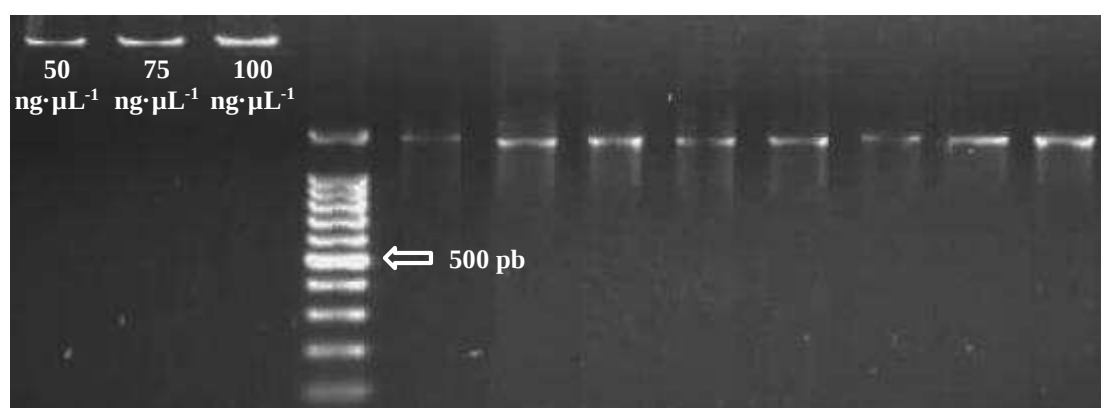


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) do produto de PCR amplificado para identificação genética dos isolados. Linha 1-3 Marcador de DNA lambda. Linha 4 marcador de 100 pb.

As sequências obtidas com os dois *primers* (*forward* e *reverse*) resultaram em dois arquivos de cada fragmento, de forma que foi necessário montar a sequência consenso,

sendo analisadas pelo programa *DNA Baser*. Após, as sequências foram alinhadas com as sequências genéticas obtidas no banco de dados (homologia > 99%) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Identificação das espécies bacterianas com base na análise do gene 16S rDNA*

Localização dos pontos de amostragem	Espécie mais próxima em busca BLAST do GenBank	Código	Similaridade (%)
Água potável (Ponto I)	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 102790.1	98
	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	NR 036798.1	94
	<i>Escherichia fergusonii</i>	NR 074902.1	99
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Dissolvens</i>	NR 044978.1	99
Água purificada (Ponto II)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NR 042387.1	100
	<i>Staphylococcus warneri</i>	NR 102499.1	99
	<i>Staphylococcus warneri</i>	NR 102499.1	99
Água purificada distribuída (Ponto III)	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 102790.1	99
Água purificada distribuída (Ponto IV)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Dissolvens</i>	NR 044978.1	100
Água purificada distribuída (Ponto V)	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 102790.1	99

* Espécies bacterianas isoladas por crescimento em meios R2A e identificados com base em sequências de genes de 16S rDNA.

Neste estudo, foram identificadas 6 diferentes espécies de bactérias presente na água do sistema de purificação de água. Algumas espécies encontradas em pontos de amostragem diferentes apresentaram a mesma identificação, podendo-se deduzir que sejam de uma mesma estirpe, pois o número de identificação no banco de dados é o mesmo.

As bactérias gram-negativas são os contaminantes mais frequentemente citados, seguidas de algumas bactérias gram-positivas. Porém, neste estudo, a prevalência maior foi de bactérias gram-positivas, visto que, das 12 amostras analisadas, 8 eram gram-positivas.

De acordo com Tabela 3, pode-se verificar que algumas bactérias encontradas na água potável não são encontradas na água purificada, o que pode sugerir que o sistema de

purificação retém estas bactérias ao longo das etapas. Da mesma forma, algumas bactérias foram identificadas na água purificada, mas não encontravam na água potável. Uma hipótese deste evento pode estar relacionado à introdução destas espécies no sistema de purificação com uma possível formação de biofilmes em compartimentos como filtros e membranas.

A espécie de *Enterococcus faecium* foi encontrada na água potável e na água purificada distribuída, sugerindo que esta espécie tenha passado por todos os estágios no sistema de purificação. *Enterococcus faecium* apresenta como cocos gram-positivos, arranjados aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbios facultativos, que se desenvolvem em temperatura de 35 °C, sendo que a maioria das cepas tem capacidade de multiplicação entre 10°C e 45 °C. Também podem ser cultivados na presença de altas concentrações de cloreto de sódio.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são residentes naturais da microbiota do trato gastrointestinal em seres humanos e animais, e muitas espécies são encontradas em alimentos, plantas, água e solos, provavelmente como resultado da difusão a partir de fontes naturais e tolerância a condições ambientais adversas, sendo consideradas as bactérias mais comuns encontradas no meio ambiente (ADCOCK; SAINT 2001; OGIER; SERROR, 2008).

Os enterococos são a terceira causa mais comum de infecções hospitalares, apresentando resistência à vários antibióticos, e têm sido extensivamente avaliados por vários autores quanto à resistência antimicrobiana e à presença de genes de virulência (JUNCO et al., 2001; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; TALEBI et al., 2008; DIARRA et al., 2010; MORRIS et al., 2011.)

Outra bactéria gram-positiva encontrada foi a espécie *Staphylococcus warneri*, amplamente distribuídas no meio ambiente. Apresentam como cocos, sendo comumente encontrados na microbiota da pele humana. Produz ácido, é catalase positiva e oxidase negativa.

A espécie de *Staphylococcus warneri* foi identificada na água potável por Olofsson et al., (2003) e também em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos (SILVA, 2006).

A espécie *Aneurinibacillus aneurinilyticus* encontrada na água potável, é um bacilo gram-positivo, formador de esporos, pouco citada na literatura.

A espécie *Escherichia fergusonii* é um membro da família das *Enterobacteriaceae* e foi a segunda espécie do gênero *Escherichia* a ser reconhecida (INGLE et al., 2011). Apresenta as seguintes características: gram-negativa, bastonetes, móvel com flagelos

peritricos, aeróbio e anaeróbio facultativo, oxidase negativo e a única das espécies a produzir ácido e gás a partir de d-adonitol (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005). Ocorre naturalmente no trato intestinal de animais de sangue quente e tem sido aceita como um patógeno oportunista (RAYAMAJHI et al., 2011), também tem como habitat o intestino de pássaros (INGLE et al., 2011; MAHEUX et al., 2011). Esta espécie também foi isolada em água de superfície e na distribuição de água potável (RICE et al., 1991; BERNASCONI et al., 2007).

Em estudos realizados por Ingle et al. (2011), a espécie de *E. fergusonii* pode formar biofilme. Esse autores constaram que esse micro-organismo formou biofilme com maior número de células aderidas a 24° C em comparação a 37° C e em meio mínimo de glicose em comparação com outras espécies de *Escherichia*.

A espécie *Enterobacter cloacae* é um bastonete gram-negativo, que tem se tornado cada vez mais importante como um patógeno oportunista em ambientes hospitalares, sendo responsável por diversas infecções (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003). Devido à sua natureza ubíqua, esta espécie foi isolada em sistemas de abastecimento de água potável (HERSON et al., 1987; CAMPER et al., 1991; OLOFSSON et al., 2003).

Os níveis de nutrientes presentes na água potável são geralmente baixos, com concentrações de carbono orgânico variando de 0,05 mg·L⁻¹ a 12,2 mg·L⁻¹ e frações de carbono orgânico assimilável de 3 µg·L⁻¹ a 500 µg·L⁻¹. No entanto, estas concentrações de material orgânico na água potável suportam o crescimento de várias bactérias heterotróficas (CAMPER et al., 1991). Segundo Herson et al. (1987), a espécie *Enterobacter cloacae* é capaz de multiplicar em concentrações mínimas de nutrientes, além de sobreviver à cloração.

A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* apresenta as seguintes características: aeróbia estrita, coco-bacilar, imóvel, oxidase negativa e catalase positiva (LACROIX; CABELLI 1982). O gênero *Acinetobacter* já foi isolado em solo, água do mar, água doce, esgotos, alimentos contaminados e na mucosa e superfícies externas de animais e seres humanos. Também é frequentemente isolado em filtros de carvão ativado e areia, em biofilmes e pontos de distribuição de água (PERCIVAL et al., 2004).

A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* é considerada com um patógeno oportunista capaz de causar várias infecções (BIFULCO et al., 1989). O gênero *Acinetobacter* apresenta cápsula, fimbrias e produz polissacarídeo, que são fatores de virulência (TOWENR, 2002; PERCIVAL et al., 2004). Segundo Rosenberg et al.(1988),

estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus* aderem a superfícies hidrofóbicas, tais como hidrocarbonetos, poliestireno e nas células epiteliais humanas.

As taxas de morte pela desinfecção de *Acinetobacter* spp. são similares às de outras bactérias heterotróficas, quando expostos a compostos clorados. Entretanto, alguns estudos têm indicado que este gênero pode desenvolver maior resistência ao cloro, cloraminas e dióxido de cloro, quando cultivado sob condições que favoreçam o desenvolvimento de biofilmes (PERCIVAL et al., 2004).

A afirmação acima pode ser confirmada no trabalho realizado por Simões et al. (2010), que verificaram o impacto da diversidade microbiana em biofilmes em seis espécies de bactérias isoladas de água potável sobre sua resistência à desinfecção com hipoclorito de sódio. Entre estas espécies, os biofilmes de *Acinetobacter calcoaceticus* foram susceptíveis à desinfecção e alcançaram a inativação total, no entanto, sua presença em biofilmes com multiespécies aumentou sua resistência à desinfecção (SIMÕES et al., 2010).

A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* também mostrou capacidade de se agregar à maioria das bactérias estudadas, e sua presença em uma comunidade multiespécies representou uma vantagem na colonização. Este mecanismo de adesão é altamente específico e transmite vantagens aos micro-organismos, incluindo a transferência de sinais químicos, a troca de informações genéticas, proteção contra condições ambientais adversas e de cooperação metabólica entre espécies diferentes, bem como diferenciação celular em alguns populações (SIMÕES et al., 2008).

Vários membros da família *Enterobacteriaceae* frequentemente produzem exopolissacarídeos (WANG et al., 2013). No entanto, as bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* e *Bacillus* têm tendência a formar biofilmes mais do que outros (YOUSEF; JUNEJA 2003).

Assim, estirpes das espécies *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter calcoaceticus* por produzir grandes quantidades de exopolissacarídeos, são muito estudadas (BRYAN, et al. 1986; ROSENBERG et al., 1988; WANG et al., 2013; SARAFZADEH et al., 2013).

3.3. Energia livre de interação hidrofóbica (ΔG^{TOT})

A Tabela 4 apresenta os valores de energia livre de interação hidrofóbica das células de diferentes espécies presentes na água potável e purificada e da superfície de polipropileno do *loop* de distribuição.

Pela análise de energia livre de interação hidrofóbica, verifica-se que todas as espécies de bactérias apresentaram um valor de $\Delta G^{TOT} > 0$, sendo, neste caso, consideradas hidrofílicas. Também a superfície de polipropileno é considerada hidrofílica devido ao valor de $\Delta G^{TOT} > 0$.

Valores semelhantes de energia livre de interação hidrofóbica foram encontrados por Van Der Mei e Busscher (1998) para estirpes de *A. calcoaceticus*, consideradas hidrofílicas.

Tabela 4 - Valores da variação de energia livre apolar (ΔG_{SAS}^{LW}) e polar (ΔG_{SAS}^{AB}) da energia livre de interação hidrofóbica (ΔG_{SAS}^{TOT}) das bactérias isoladas e da superfície.

Superfície de Adesão	Energia livre de interação ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)		
	ΔG_{SAS}^{LW}	ΔG_{SAS}^{AB}	ΔG_{SAS}^{TOT}
Polipropileno	-3,61	16,76	13,11
<i>A. aneurinilyticus</i>	-0,32	36,87	36,51
<i>Escherichia fergusonii</i>	0,00	21,22	21,25
<i>Enterobacter cloacae</i>	-1,19	29,77	28,57
<i>Enterococcus faecium</i>	-1,27	28,45	27,18
<i>Staphylococcus warneri</i>	-2,98	7,03	4,05
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-0,16	26,06	25,90

Embora a hidrofobicidade da superfície celular seja um fator bastante importante na adesão de microrganismos a superfície, a dinâmica biológica também deve ser observada. Segundo Andrade (2008), o potencial de uma bactéria em reagir às diferenciações complexas responde sempre com adaptações fisiológicas e deve ser considerada na formação do biofilme.

3.3.1. Energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$)

Os valores de $\Delta G_{adesão}$ permitem fazer uma avaliação termodinâmica do fenômeno de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{adesão} < 0$ e, ao contrário, desfavorável quando $\Delta G_{adesão} > 0$ (ARAÚJO, 2010).

Observou-se que a adesão entre o polipropileno e as bactérias isoladas não foi termodinamicamente favorável (Tabela 5). Porém, a adesão entre superfícies hidrofílicas podem ocorrer.

Tabela 5 - Valores da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre as células bacterianas isoladas (b) e a superfície do “Loop de distribuição” (polipropileno) (s) em meio aquoso (l).

Superfície de Adesão	Energia livre total de interação ($\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$)
	$\Delta G_{adesão}$
Polipropileno_ <i>A. aneurinilyticus</i>	28,20
Polipropileno_ <i>Escherichia fergusonii</i>	23,21
Polipropileno_ <i>Enterobacter cloacae</i>	23,73
Polipropileno_ <i>Enterococcus faecium</i>	22,72
Polipropileno_ <i>Staphylococcus warneri</i>	19,00
Polipropileno_ <i>A. calcoaceticus</i>	24,40

Neste trabalho, foi estudado apenas um fator termodinâmico que influencia o processo de adesão. A aplicação desta teoria neste caso é desfavorável, porém não se pode afirmar que não seja provável a adesão e a formação de biofilmes das espécies identificadas à superfície, uma vez que a teoria da termodinâmica não considera os aspectos microbiológicos da adesão.

Estruturas extracelulares como pili, fímbria e exopolissacarídeos podem servir de ligação entre a célula e o substrato de adesão, anulando a repulsão eletrostática (BERNARDES, 2008). Muitas das espécies de bactérias identificadas apresentam estes anexos celulares, que podem, desta forma, mediar o processo de adesão, como exemplo, o gênero *Acinetobacter*, que apresenta cápsula de polissacarídeo e fimbrias (TOWENR, 2002; PERCIVAL et al., 2004). Além disso, outros fatores importantes na formação do biofilme como o pH, temperatura são adequados neste sistema de purificação de água.

Entretanto, os resultados de predição termodinâmica foram compatíveis com as contagens de bactérias heterotróficas da superfície de polipropileno (*loop* de distribuição), que atingiram valores de aproximadamente $5 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, indicando que não se caracteriza como biofilmes e a superfície pode ser utilizada na distribuição de água purificada. Caso a termodinâmica fosse favorável à adesão das bactérias à superfície, esta contagem apresentaria um valor superior com a provável presença de biofilmes.

Embora esses resultados sejam coerentes, é importante verificar que esses valores de contagens para uma superfície que entra em contato com a água purificada podem influenciar sua qualidade microbiológica.

A presença destas bactérias em biofilmes no sistema de distribuição somente é desfavorável pelo estudo termodinâmico, e uma possibilidade para representar uma maior realidade das condições da superfície avaliada seria fazer um condicionamento da superfície para verificar se há diferença.

4. CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, foram identificadas pela técnica de biologia molecular PCR e sequenciamento do gene 16S rDNA seis espécies das bactérias presentes nas amostras de água potável, água purificada, permitindo conhecimentos sobre os micro-organismos presentes no sistema de purificação. A importância desta investigação da diversidade microbiana poderá auxiliar em estratégias de higienização mais eficazes no sistema de purificação de água.

Apenas pelo estudo da previsão teórica da termodinâmica de adesão das bactérias à superfície do *loop* de distribuição, para qualquer das espécies isoladas da água, a adesão não foi termodinamicamente favorável. Tanto a superfície como todas as bactérias identificadas foram consideradas hidrofílicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADCOCK, P.W.; SAINT, C. P. Development of glucosidase agar for the Confirmation of water-borne *Enterococcus*. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4243-4246. 2001.
- ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes**. São Paulo: Varela, 2008.
- ARAÚJO, E. A. **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese**. 2010. 96.f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2010.
- BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p.541–555. 2003.
- BERESCHENKO, L.A.; STAMS, A. J. M.; EUVERINK, G. J. W.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2623–2632, 2010.
- BERESCHENKO, L.A.; HEILIG, G. H. J.; NEDERLOF, M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; STAMS, A. J. M.; EUVERINK, G. J. W. Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification Plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5297–5304, 2008.
- BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2008.
- BERNASCONI, C.; VOLPONI, G.; PICOZZI, C.; FOSCHINO, R. Use of the tna operon as a new molecular target for *Escherichia coli* detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.19. p. 6321–6325. 2007.
- BIFULCO, J.M.; SHIREY, J. J, BISSONNETTE, G. K. Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.9. p. 2214-2219. 1989.
- BRYAN, B. A; LINHARDT, R. J.; DANIELS, L. Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6. p. 1304-1308. 1986.
- BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A. H.; VAR DER MEI, H.C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H.P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 980–983, 1984.

CAMPER, A. K.; McFETERS, G. A.; CHARACKLIS, W.G; JONES, W. L. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8. p. 2233–2239. 1991.

CHAKRAVORTY, S. HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, V.69 p. 330-339. 2007.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2004.

DIARRA, M. S.; REMPEL, H.; CHAMPAGNE, J.; MASSON, L.; PRITCHARD, J.; TOPP, E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.24. p. 8033-8043. 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5. ed. Brasília, 2010.

FLORJANIČ, M.; KRISTL, J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 16–22. 2011.

HERSON, D. S.; MCGONIGLE, B.; PAYER, M. A.; BAKER, K. B. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.5. p. 1178–1180. 1987.

HERZBERG, M.; ELIMELECH, M. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**, n. 295, p. 11–20. 2007.

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5306–5318. 2003.

INGLE, D. J.; CLERMONT, O.; SKURNIK, D.; DENAMUR, E.; WALK, S.T.; GORDON, D. M. Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2695–2700. 2011.

JUNCO, M.T.T.; MARTÍN, M.G.; TOLEDO, M.L.P.; GÓMEZ, P. L.; BARRASA, J. L.B. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, p. 363-368. 2001.

KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 81–87. 2011.

LACROIX, S. J.; CABELLI, V. J. Membrane filter method for enumeration of *Acinetobacter calcoaceticus* from environmental waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 90-96. 1982.

LIN, Y-H; CHANG, B. C.H.; CHIANG, P.W.; TANG, S-L. Questionable 16S ribosomal RNA gene annotations are frequent in completed microbial genomes. **Gene**, v. 416, p. 44–47. 2008.

KULAKOV, L.A; McALISTER, M.B.; OGDEN, K.L.; LARKIN, M.J.; O'HANLON, F. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1548–1555, 2002.

McFETERS, G. A. BROADAWAY, S. C.; PYLE, B. H.; EGOZY, Y. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.5, p. 1410-1415. 1993.

MORRIS, D. GALVIN, S.; BOYLE, F.; HICKEY, P.; MULLIGAN, P.; CORMICAND, M. *Enterococcus faecium* of the *vanA* genotype in rural drinking water, effluent, and the aqueous environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.2. p. 596-598. 2012.

OGIER, J-C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126. p. 291-301. 2008.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42. p. 2242-2250. 2008.

OLOFSSON, A.C. N-Acetyl-L-Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8. p. 4814–4822. 2003.

PANG, C. M.; HONG, P.; GUO, H.; LIU, W-T. Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n.19, p. 7541-7550. 2005.

PENNA, T.C.V.; MARTINS, A.M.S; MAZZOLA, P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. **BioMedCentral Public Health**, 2:13, p.1-11.2002.

PERCIVAL, S.; CHALMERS R.; EMBREY, M. Paul Hunter, Jane Sellwood and Peter Wyn-Jones. **Microbiology of Waterborne Diseases**, David Elsevier, p. 2004.

PROMEGA CORPORATION. **Technical manual. Wizard® Genomic DNA Purification Kit**. USA, Revised 12/10, p.1-20.2010.

RAYAMAJHI, N.; CHA, S.B.; SHIN, S.W.; JUNG, B.Y.; LIM, S-K.; YOO, H. S. Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other *Enterobacteriaceae* isolates from South Korean farm animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9. p. 3163–3166. 2011.

RICE, E.W.; ALLEN, M. J; BRENNER, D. J.; C. STEPHEN, E. Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2. p. 592-593. 1991.

RIDGWAY, H. F.; RIGBY, M. G.; ARGO, G. Adhesion of a *Mycobacterium* sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 61–67, 1984.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, E. Z. Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2. p. 317-322. 1988.

SARAFZADEHA, P.; HEZAVEA, A.Z.; RAVANBAKHSHA, M.; NIAZIB, A.; AYATOLLAHIA, S. *Enterobacter cloacae* as biosurfactant producing bacterium: Differentiating its effects on interfacial tension and wettability alteration Mechanisms for oil recovery during MEOR process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 105, p. 223-229. 2013.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE N. A. Genus I. *Escherichia*. p. 607-624. In. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Eds.Springer. 2nd ed. 2005.

SILVA, C. H. P. M.; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.4, 243-253, 2006.

SIMÕES, L.C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19. p. 6673–6679. 2010.

SIMÕES, L.C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4. p. 259–1263. 2008.

TALEBI, M. POURSHAFIE, M. R.; KATOULI, M.; MÖLLBY, R. Molecular structure and transferability of Tn1546-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.5. p. 1350-1356. 2008.

TOWNER, K. J. **Molecular Medical Microbiology**, v.2, 2002.

VAN OSS, C.J. **Interfacial forces in aqueous media**. New York:Marcel Dekker, Inc., 1994. P.440.

VAN DER MEI, BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity base on contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 11, p-213-221. 1998.

WANG, F.; YANG, H.; WANG, Y. Structure characterization of a fucose-containing exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 503-509. 2013.

YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. **Microbial stress adaptation and food safety**, CRC Press. United States of America. 2003.

3. CONCLUSÃO GERAL

A água que alimenta o sistema de purificação instalado no Laboratório de Qualidade e Segurança de Alimentos apresenta qualidade requerida pelo fabricante Millipore (pH, temperatura, condutividade, Índice de saturação de Langelier, dureza, e cloro) e também atende a Portaria MS nº 2.914/2011, para os parâmetros alcalinidade, turbidez e contagem de bactérias heterotróficas. A higienização do reservatório de água potável e purificada foi efetiva na redução significativa de bactérias heterotróficas ($p > 0,05$).

O sistema de purificação de água produz uma água com requisitos de qualidade físico-química e microbiológica dentro dos critérios estabelecidos e verificados por meio do monitoramento realizado. Porém, com o armazenamento, a água purificada distribuída apresenta níveis microbiológicos acima do permitido, pois excederam o máximo de $2 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que pode comprometer alguns resultados analíticos dos laboratórios de pesquisa.

A utilização das técnicas de biologia molecular permitiu a identificação de seis espécies de bactérias presentes nas amostras de água do sistema de purificação. A hidrofobicidade das superfícies das bactérias e da superfície do *loop* de distribuição de água são hidrofílicas e termodinamicamente desfavorável à adesão.

Os resultados de predição termodinâmica foram compatíveis com as contagens de bactérias heterotróficas da superfície de polipropileno (*loop* de distribuição), que atingiram valores aproximados de $5 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, indicando que não se caracterizam como biofilmes. Embora esses resultados sejam coerentes, é importante verificar que esses valores de contagens para uma superfície que entra em contato com a água purificada pode influenciar sua qualidade microbiológica.

4. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao longo da execução deste trabalho, ficaram patentes a necessidade e o interesse da realização de novos estudos que podem contribuir para compreensão e melhoria do sistema de purificação. Em seguida, são apresentados sugestões de trabalhos futuros.

Realizar a enumeração de bactérias heterotróficas da água purificada por meio da técnica de microscopia de epifluorescência com coloração DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Realizar a extração de DNA diretamente das amostras de biofilmes recolhidas, utilizando métodos de cultivo-independentes e efetuar a reação de PCR e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e analisar as sequências das bibliotecas de clones construídos por PCR do gene de 16S rRNA.

Estudar as interações entre espécies no processo de formação de biofilmes, utilizando técnicas microscópicas.

Estudar os efeitos de vários sanitizantes sobre os biofilmes formados, incluindo a utilização de lâmpada UV a 254 nm.

Avaliar o potencial de crescimento dos biofilmes com as espécies identificadas após a sanitização.

ANEXO A- Procedimento de higienização do reservatório de água purificada

- 1) Encher o reservatório com água purificada.
- 2) Colocar todos os equipamentos na posição STANDBY e fechar a válvula de saída de água para o Milli-Q (quando for o caso), localizada na parte inferior do reservatório;
- 3) Adicionar a solução sanitizante previamente preparada no reservatório cheio através da abertura superior;
 - * Sugere-se a troca esporádica do sanitizante em sistema de rodízio, para prevenir seleção de micro-organismos.
 - * O dreno e o respiro do reservatório devem permanecer conectados;
- 4) Deixar o reservatório em repouso pelo tempo determinado de acordo com o sanitizante utilizado.
- 5) Utilizar um pano ou esponja bem limpo e macio para passar nas superfícies não alcançadas pela coluna d'água (parte superior, tampa, etc.);
 - * Recomenda-se deixar o pano/esponja mergulhado, durante o repouso, na solução para minimizar possível atrito;
- 6) Desconectar as mangueiras dos equipamentos e conectar outras mangueiras nas demais saídas, posicionar todas sobre o dreno (pia) para descarte do sanitizante;
- 7) Drenar parte da solução por cada uma das saídas;
 - * Recomenda-se abrir e fechar as válvulas de saída algumas vezes para melhor contato do sanitizante;
- 8) Esgotar completamente a água do reservatório;
- 9) Encher o reservatório novamente com água purificada; e drenar completamente;
- 10) Repetir o passo anterior até o pH¹ da água do reservatório ficar próximo do neutro (aproximadamente pH 7).

* Verificou-se o CRL

ANEXO B - Procedimento de higienização do reservatório de água potável

O reservatório de água potável é higienizado, semestralmente, ou quando a água potável for reprovada pelo controle de qualidade, seguindo os seguintes procedimentos:

- 1) Comunicar aos usuários do prédio sobre a higienização do reservatório;
- 2) O funcionário dirige-se ao reservatório e retira a tampa da caixa. O registro que controla a entrada de água proveniente da distribuição pela estação de tratamento e fechada ou a bóia é amarrada para cessar o fluxo de água para a caixa.
- 3) O orifício do cano de distribuição de água para o interior do prédio é tampado com um pano limpo para evitar a entrada de sujeira nas tubulações;
- 4) Caso existam sólidos flutuantes, são removidos com uma peneira e acondicionados em um saco de lixo.
- 5) O nível de água no reservatório deve atingir a um palmo do fundo;
- 6) Caso existam materiais sólidos no fundo do reservatório são retirados com o auxílio de uma pá e acondicionados em um saco de lixo.
- 7) Remover o material sedimentado;
- 8) Com um pano limpo previamente imerso em água passar em todas as superfícies internas do reservatório;
- 9) Enxaguar abundantemente;
- 10) O registro de alimentação do reservatório é aberto ou a bóia é desamarrada para encher;
- 11) Com o reservatório cheio sanitizar, adicionando 1 L de hipoclorito de sódio (água sanitária com 2 % de CRT) para cada 1.000 L de água.
- 12) Aguarda-se por 2 h para a completa ação do hipoclorito.
- 13) Após as 2 horas, o registro de alimentação é fechado ou a boia amarrada, as torneiras são abertas para o esvaziamento completo.
- 14) Com o reservatório vazio, as torneiras são fechadas, a tampa é recolocada e a boia é desamarrada ou o registro é aberto para que a água seja armazenada.