

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA REAGENTE DOS LABORATÓRIOS DAS FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS AND SAME PHYSICAL CHEMISTRY OF THE REACTING WATER OF THE LABORATORIES OF THE FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA REAGENTE

Cynthia Cristina Pereira

Maria Regina de Andrade Pinheiro Tizzot

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo avaliar o grau de pureza da água reagentes dos laboratórios das Faculdades Integradas do Brasil, obtidas do sistema de purificação constituído de destilador, deionizador, osmose reversa e reservatório de água. As amostras foram submetidas à análises físico-químicas, avaliando o grau de condutividade e pH, análises microbiológicas de coliformes termotolerantes e totais, através de filtração à vácuo por membrana filtrante e comparando os resultados com os parâmetros de normalidade aceitáveis. As análises apresentaram valores de pH dentro da faixa recomendada e a condutividade acima dos limites toleráveis, havendo crescimento bacteriano em ambos os meios de cultura utilizados, caracterizando contaminação da água reagentes por Escherichia coli. Os resultados obtidos não estão de acordo com a legislação vigente, evidenciando a necessidade de um controle rigoroso na limpeza, manutenção e troca de filtros do sistema de purificação da água. Sugere-se a elaboração de POP's, para a normatização de procedimentos e periodicidade na limpeza e manutenção dos aparelhos e dispositivos de armazenagem, com realização periódica de análises da água. Desta forma pode-se manter um controle de qualidade da água reagentes dos laboratórios e assegurar a confiabilidade das pesquisas realizadas.

Descritores: água reagentes; análise da água; controle de qualidade.

ABSTRACT

This study aims to assess the purity of reagent water from the laboratories of Faculdades Integradas do Brasil, obtained from the purification system consisting of distiller, deionized, reverse osmosis and the water tank. Submit samples for physicochemical analysis, assessing the degree of conductivity and pH and microbiological analysis of fecal coliforms, vacuum filtration through membrane filter and comparing the results with the parameters of acceptable normality. With the analysis, we obtained a pH within recommended range and the conductivity above the tolerable limits, bacterial growth in both culture media, featuring reagent water contamination by Escherichia coli. The results are not in accordance with current legislation, highlighting the need for strict control on cleaning, maintenance and replacement of filters for water purification system. We suggest the development of POP's, periodic maintenance of equipment, daily changes of reservoir water and the analysis of both the purified water as the drinking. Thus, the laboratories of educational institution, will provide water quality, ensuring that research conducted in health laboratories do not suffer interference from it.

Descriptors: reagent water; water analysis; quality control.

INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade da água está relacionado à finalidade de sua utilização e às características apresentadas pela mesma, sendo por sua vez determinadas pelas substâncias nela presentes.⁽¹⁾

Para a avaliação destas características da água, são utilizados parâmetros de qualidade que são divididos em físicos (cor, turbidez, sabor, odor e temperatura), químicos (pH, alcalinidade, acidez, condutividade) e biológicos caracterizados por bactérias (coliformes totais e fecais).⁽²⁾

A água potável (da torneira) não é adequada para uso em laboratório, pois nela existem microorganismos variados, materiais orgânicos e inorgânicos dissolvidos/suspensos em quantidades variáveis, necessitando a passagem desta água por processos de purificação.⁽³⁾

A análise bacteriológica é realizada tanto para água que se destina ao consumo humano, quanto para água utilizada em laboratórios de análises clínicas. A água, como um reagente químico, deve ser caracterizada quanto a origem e componentes de acordo com sua utilização, para a obtenção de uma água de qualidade. É denominada “água reagente”, e conforme a indicação de uso, requer um maior ou menor grau de pureza^(4,5).

Organizações profissionais chamadas de agências regulamentadoras (NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards* atual CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CAP - *College of American Pathologists*, a nível internacional podemos citar também a OMS – *Organização Mundial da Saúde*), estabelecem padrões de qualidade da água classificando-a em quatro tipos, as quais são selecionadas por profissionais de laboratórios clínicos de acordo com as necessidades diárias de seus ensaios.^(3,6,7)

A água reagente é classificada em:

- **Água Reagente Tipo I:** é a água com melhor qualidade, ideal para métodos analíticos os quais necessitam da mínima interferência e máxima precisão e exatidão em seus resultados. Ex: HPLC, espectrometria, entre outros. Para evitar contaminação, essa água deve ser utilizada assim que é produzida e não deve ser estocada, pois sua resistividade diminui com o tempo.^(6,7)
- **Água Reagente Tipo II:** é amplamente utilizada em laboratórios para procedimentos em que é tolerável a presença de microrganismos não patogênicos, possui baixa resistividade e é utilizada em procedimentos de imunologia e hematologia. Deve ser utilizada no mesmo dia da coleta.^(6,7)
- **Água Reagente Tipo III:** utilizada para lavagem de vidrarias em geral, produção de água de grau de pureza maior, preparação de culturas bacteriológicas, procedimentos qualitativos em urinálise, parasitologia e histologia.^(6,7)
- **Água para Aplicações Especiais:** utilizada em procedimentos que requerem a remoção de contaminantes específicos - remoção de pirogênicos para cultura de tecidos/células e remoção de traços de orgânicos para cromatografia líquida de alta resolução.⁽⁷⁾

PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DA ÁGUA GRAU REAGENTE

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA REAGENTE DOS LABORATÓRIOS DAS FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL

A tecnologia atual permite a utilização de vários processos de purificação de água, sejam isolados, combinados, dependendo da qualidade desejada para a água tratada. Os principais processos e os mais utilizados são:

- **Destilação:** é o processo mais antigo de purificação, onde a água passa por uma mudança de fases, em estado líquido é levada ao estado de vapor passando por uma coluna de evaporação e liberando a maior parte de seus contaminantes, após condensa novamente retornando ao estado líquido.^(3,6)

Este processo pode produzir água reagente do tipo I se for associado a outro sistema de purificação, pois não elimina gases e nem vestígios de sais inorgânicos.^(3,6)

- **Deionização:** este processo envolve a troca de íons para a obtenção de água reagente de alta resistividade, a água passa por colunas de polímeros insolúveis de resina onde retêm as impurezas presentes na forma ionizada trocando-as por íons H^+ e OH^- .^(3,5,8)

- **Osmose Reversa:** é o processo pelo qual a água sofre uma pressão e é forçada a passar por uma membrana semi-permeável a qual retêm mais de 97% de íons, substâncias orgânicas e inorgânicas e impurezas em suspensão.^(3,6)

Esse sistema pode produzir água reagente do tipo I se associada com outro sistema de tratamento, pois substâncias voláteis e algumas substâncias orgânicas de baixo peso molecular passam pela membrana.^(3,6)

- **Filtro de carvão ativado:** é um processo utilizado como pré-tratamento da água sendo necessário continuar o processo de purificação com o uso de outro equipamento para a obtenção da água reagente.^(3,8)

A filtração da água em leito de carvão ativado, remove apenas grandes quantidades de materiais orgânicos e cloro.^(3,8)

METODOLOGIA

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análises Toxicológicas e Ambientais – LATAM. Para a realização das mesmas foram coletadas amostras de água reagente de nove laboratórios situados nas

Faculdades Integradas do Brasil, os quais são: laboratório de Química, Bioquímica, Farmacotécnica, Fisiologia e Farmacologia, Farmacognosia e Fitoquímica, Enzimologia, Análises Clínicas e o laboratório Técnico de preparo. Essas coletas foram realizadas em frascos de 1000 ml estéreis e obtidas do sistema de purificação constituído de destilador, deionizador, osmose reversa e de reservatórios de água de PVC. Sendo as amostras dos destiladores obtidas de reservatório, pois os mesmos estavam conectados ao aparelho.

PROCEDIMENTO PARA REALIZAÇÃO DAS COLETAS

- a) Lavagem das mãos com água e sabão;
- b) Com uso de luvas, limpar a torneira com um pedaço de algodão embebido em álcool;
- c) abrir a torneira e deixar escorrer a água durante 1 minuto;
- d) coletar a amostra de água;
- e) encher o frasco com pelo menos $\frac{3}{4}$ de seu volume;
- f) tampar o frasco;

- g) Identificá-lo, anotando a hora, data e local da coleta;
- h) preencher a ficha de identificação da amostra de água;
- i) colocar o frasco da amostra na caixa de isopor com gelo;
- j) encaminhar a caixa para o laboratório.

O tempo de coleta e a realização dos exames não devem exceder 24 horas.⁽²⁾

Todas as amostras foram coletadas no mesmo dia pela manhã, cerca de 700 ml de amostra por frasco, armazenadas em geladeira portátil sob refrigeração, para a realização do transporte até o local onde foram realizadas as análises físico-químicas (pH e condutividade) e microbiológicas (coliformes totais e termotolerantes).⁽²⁾

As análises microbiológicas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, através da filtração a vácuo de 100 ml da amostra utilizando-se o método da membrana filtrante de 47 mm e porosidade de 0,45 μ l. Estas membranas foram posteriormente colocada em placa de petri devidamente identificada e com meios específicos para as análises, conforme o Manual prático de análise da água (FUNASA). Cada amostra foi

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA REAGENTE DOS LABORATÓRIOS DAS FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL

submetida duas vezes a esse procedimento, sendo que após a filtração, os meios utilizados foram Ágar MFC, incubados à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, contendo lactose, um indicador de pH, o azul de anilina que confere a coloração azulada às colônias de bactérias de coliformes termotolerantes capazes de fermentar a lactose, e , Ágar M-Endo, incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, contendo lactose , sulfito de sódio e fucsina básica, que na presença de bactérias do grupo de coliformes totais , fermentam a lactose , formando como produto intermediário um aldeído, que complexa com o sulfito de sódio e a fucsina presentes no meio, conferindo às colônias de coliformes totais uma coloração rosa a vermelha-escura, com brilho verde-metálico superficial. Todas as amostras permaneceram em estufa por 72hs. Após esse período, na presença de crescimento bacteriano, realiza-se a identificação das mesmas e a contagem manual das colônias.^(2,9,12)

Com o restante da amostra, cerca de 500 ml, foram realizadas as análises de pH e condutividade da água reagente, sendo medidos pelo condutivímetro com capacidade potenciométrica da UnitechUSA Scientific Solutions®, o qual forneceu ambos os valores de cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As bactérias do grupo coliformes totais são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. São bacilos gram-negativas, não esporuladas, que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48hs a 35°C , estão associadas as fezes de animais de sangue quente e solo. Este grupo Inclui as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella sp.*^(11,12)

As bactérias do grupo coliformes termotolerantes, podem se desenvolver e fermentar a lactose, quando incubadas a temperatura de $43 - 46^{\circ}\text{C}$, pois são capazes de suportar temperaturas elevadas, ao contrário dos demais microorganismos. Neste grupo encontram-se a *Escherichia coli* e relatos de que a *Klebsiella sp.* tenha capacidade de fermentar a lactose a essa temperatura.⁽¹²⁾

A identificação dos microrganismos que cresceram nas placas, foi feita baseada nas características das colônias, no meio de cultura Agar MFC apareceram colônias

azuis e no Agar M-Endo colônias vermelhas com brilho verde metálico, caracterizando a presença de *Escherichia coli* em ambos os meios de cultura utilizados.

Os resultados obtidos das análises microbiológicas e contagem de colônias são demonstrados na tabela I.

TABELA I – Valores obtidos da realização da contagem de colônias das amostras de água reagentes da Unibrasil

LABORATÓRIO	APARELHO	AGAR M-ENDO Colif. Totais (UFC)*	AGAR MFC Coliformes Termotolerantes (UFC)*
QUÍMICA	Destilador (Reservatório)	241	10
BIOQUÍMICA	Destilador (Reservatório)	147	56
TÉC. PREPARO	Deionizador	190	< 1,0**
FARMACOTÉCNICA	Osmose reversa	219	193
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA	Deionizador	234	66
FARMACOGNOSIA E FITOQUÍMICA	Reservatório	118	< 1,0**
ENZIMOLOGIA	Deionizador	96	76
ENZIMOLOGIA	Reservatório	189	154
ANÁLISES CLÍNICAS	Reservatório	176	134

*UFC – Unidade Formadora de Colônia/ 100 ml

** > 1,0 = Ausência

De acordo com a tabela I, todas as amostras apresentaram crescimento de microorganismo em ambos os meios utilizados, que caracterizou contaminação por coliformes totais e termotolerantes da água reagente.

Podemos verificar a ausência de crescimento bacteriano em duas amostras presentes no Agar MFC, dos laboratórios técnico de preparo e nos laboratórios de Farmacognosia e Fitoquímica, nos quais a água é de procedência do deionizador, sendo armazenadas em reservatórios de PVC que sempre estão sendo manipulados, portanto higienizados com uma maior frequência, sugerindo uma provável contaminação da água no local do reservatório.

A osmose reversa presente no laboratório de farmacotécnica apresentou o pior índice de contaminação fecal (*E. coli*), provavelmente devido saturação na sua capacidade de filtração, sugerindo a necessidade de troca da membrana.

A tabela II mostra os valores de pH e condutividade apresentados nas amostras.

TABELA II – Valores de pH e condutividade obtidos das amostras de água reagente da Unibrasil

LABORATÓRIO	APARELHO	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)*
QUÍMICA	Destilador	5,8	6,5
	(Reservatório)		
BIOQUÍMICA	Destilador	6,6	3,1
	(Reservatório)		
TÉC. PREPARO	Deionizador	6,4	2,6
FARMACOTÉCNICA	Osmose reversa	6,7	2,8

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA	Deionizador	6,7	1,9
FARMACOGNOSIA E FITOQUÍMICA	Reservatório	7,1	3,0
ENZIMOLOGIA	Deionizador	6,1	5,0
ENZIMOLOGIA	Reservatório	6,5	3,3
ANÁLISES CLÍNICAS	Reservatório	6,9	1,4

* $\mu\text{S}/\text{cm}$ = microsiemens / cm

Os valores de pH encontrados estão dentro da faixa de qualificação especificada pela Portaria 518 de 25 de março de 2004 – ANVISA, na qual recomenda-se que o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5, com uma tolerância para pH na faixa de pH de 5,5 a 8,5, tornando a amostra do laboratório de química aceitável.

Para a condutividade, o valor depende da temperatura e pH, sendo que a referência é dada na temperatura de 25°C.⁽⁶⁾

A condutividade é a expressão numérica da capacidade de uma água conduzir a corrente elétrica, dependendo da concentração iônica indicando a quantidade de sais existentes na água, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Altos valores podem indicar características corrosivas da água.⁽¹¹⁾

Para outros valores de temperatura, a norma inclui uma tabela com valores que não devem ser excedidos (ver Figura 1). Esses valores são menores que 1,3 mS/cm para temperaturas inferiores a 25 °C e maiores que 1,3 mS/cm para temperaturas superiores à de referência.⁽¹⁰⁾

As figuras a seguir mostram como devem ser esses valores dentro de suas faixas de pH e temperatura.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA REAGENTE DOS
LABORATÓRIOS DAS FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL

Figura 1.
USP 24, Estágio 1:
Condutividades requeridas em diferentes temperaturas¹

Temperatura (°C)	Temperatura (°F)	Condutividade requerida (µS/cm ²)
0	32	0.6
5	41	0.8
10	50	0.9
15	59	1.0
20	68	1.1
25	77	1.3
30	86	1.4
35	95	1.5
40	104	1.7
45	113	1.8
50	122	1.9
55	131	2.1
60	140	2.2
65	149	2.4
70	158	2.5
75	167	2.7
80	176	2.7
85	185	2.7
90	194	2.7
95	203	2.9
100	212	3.1

1. Somente para medições sem compensação de temperatura
2. µS/cm = microSiemens por centímetro = micromhos por centímetro (µmho/cm) = recíproco de megohm-cm
FONTE: Pure Water Handbook, Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota, EE.UU., Appendix D, pp. 112-115.

Figura 2.
USP 24, Estágio 3:
Requerimentos de pH e Condutividade¹

pH	µS/cm ²
5.0	4.7
5.1	4.1
5.2	3.6
5.3	3.3
5.4	3.0
5.5	2.8
5.6	2.6
5.7	2.5
5.8	2.4
5.9	2.4
6.0	2.4
6.1	2.4
6.2	2.4
6.3	2.3
6.4	2.3
6.5	2.2
6.6	2.1
6.7	2.7
6.8	3.1
6.9	3.8
7.0	4.6

1. Somente para medições sem compensação de temperatura
2. µS/cm = microSiemens por centímetro = micromhos por centímetro (µmho/cm) = recíproco de megohm-cm
FONTE: Pure Water Handbook, Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota, EE.UU., Appendix D, pp. 112-115.

O que podemos observar, é que de acordo com os valores de pH obtidos das amostras, a condutividade está na maioria das mesmas com valores superiores aos níveis aceitável.

Pôde-se observar durante a realização das coletas, que os laboratórios não apresentavam controle interno de temperatura, o que é um possível interferente da medida de condutividade da água reagente, sendo também provável a ocorrência de filtros sobrecarregados, necessitando de troca e/ou realização da limpeza dos aparelhos.

Durante a realização da pesquisa foi observada a falta de dados como data da última limpeza tanto dos vasilhames de reservatórios quanto das fontes de origem (aparelhos), trocas de filtros ou membranas, controles de temperaturas e pH . Não se tem informações sobre alguns procedimentos padrões para a água potável fornecida aos laboratórios, como periodicidade na realização de limpeza da caixa d'água, apontando inconformidades para a obtenção de uma água reagente de boa qualidade.

É importante ressaltar que não foram avaliados todos os parâmetros físico-químicos necessários para o estabelecimento da qualidade da água reagente de um laboratório, e as amostras não foram realizadas em triplicata, devido o material necessário para a realização das análises não chegarem em tempo hábil, sendo necessária a realização da parceria anteriormente mencionada.

CONCLUSÃO

Com a realização desse estudo, pôde-se verificar as falhas que apontam para uma baixa qualidade da água dos laboratórios da instituição, que se encontra abaixo dos padrões de qualidade necessários para a sua utilização como um reagente químico em análises. A água reagente deve apresentar um grau de pureza conforme a sua necessidade de uso, sendo um reagente indispensável em qualquer procedimento realizado em um laboratório, podendo ocasionar interferências, perda de acurácia e contaminações em trabalhos acadêmicos e formulações farmacêuticas realizadas nos mesmos.

Foi observado a necessidade do estabelecimento apresentar POP's (Procedimento Operacional Padrão) referentes a realização e obtenção da Qualidade da água reagente para cada tipo de laboratório, conforme mencionado anteriormente.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasil. Portaria N° 518 de 25 de março de 2004.
2. Manual prático de análise de água. 2ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006. Disponível em: [http:// www.funasa.gov.br/Web%20Funasa/pub/pdf/Mnl% 20 analise 20agua.pdf](http://www.funasa.gov.br/Web%20Funasa/pub/pdf/Mnl%20analise%20agua.pdf)
3. Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). Água Reagente no Laboratório Clínico. Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Disponível em: http://www.pncq.org.br/participantes/atualizacao_baixo_001.asp. Acessado em: 19/10/2009.
4. BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E., TIETZ. Fundamentos de Química Clínica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
5. LOPES, H.J.J Garantia de Controle da Qualidade no Laboratório Clínico. Relatório técnico da Gold Analisa Diagnóstica LTDA. Belo Horizonte, MG: 2003. Disponível em: [http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Garantia e ControladaQualidade no Laboratorio Clinico.pdf](http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Garantia_e_ControledaQualidade_no_Laboratorio_Clinico.pdf). Acessado em: 18/10/2009.
6. SILVA, C.H.P.M. LINS, A.P., DA 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. [periódico na internet]. RBAC, v.38(4), p. 243-253, 2006. Disponível em: http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_04/rbac_38_04_08.pdf
7. BREDA, E.M. Água Grau Reagente para Laboratório e outros fins especiais. setembro/2001. 29 f. versão internet. Disponível em: <http://www.apostilaz.com.br/educacionais/Agua-grau-reagente-para-laboratorios.html>. Acessado em: 18/10/2009.

8. HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais. 20ª ed. Barueri, SP: Manole, 2008.
9. PELCZAR, M. J. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia. Conceitos e Aplicações. 2ª ed.vol II, São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.
10. GRELA, J.J.A osmose reversa de dupla passagem e o mercado farmacêutico. [periódico na internet]. 2004. ed. 08. Disponível em: <http://www.Meiofiltrante.com.br/materias.asp?action=detalhe&id=90>
11. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Variáveis de qualidade das águas.(SP).CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2001.
Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#Condutividade>
12. Protocolos de Microbiologia Ambiental. Análise microbiológica da água. Escola superior agrária de Coimbra (ESAC). 2010. Disponível em: <http://www.Esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/protocolo%203.pdf>
13. Pure Water Handbook, Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota, EE.UU., Appendix D, pp. 112-115.