

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

*Chika Wakiyama*

**AÇÃO DE ALGICIDAS SOBRE MICROALGAS DE EFEITO  
ANTIESTÉTICO EM EMBALAGENS DE ÁGUA ENGARRAFADA.**

RECIFE - PE

2004

**AÇÃO DE ALGICIDAS SOBRE MICROALGAS DE EFEITO  
ANTIESTÉTICO EM EMBALAGENS DE ÁGUA ENGARRAFADA.**

*Chika Wakiyama*

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Nutrição do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Edleide Freitas Pires

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Chamixaes Lopez

RECIFE - PE

2004

**Wakiyama, Chika**

**Ação de algicidas sobre microalgas de efeito antiestético em embalagens de água engarrafada. / Chika Wakiyama. – Recife : O Autor, 2004.**

**84 folhas : il., fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2004.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Microbiologia – Microalgas. 2. Microcystis robusta e stichosiphon – Algicidas – Utilizações de testes. 3. Águas engarrafadas – Embalagens plásticas - Sanitização. I. Título.**

**582.232  
589.46**

**CDU (2.ed.)  
CDD (21.ed.)**

**UFPE  
BC2004-501**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

**AÇÃO DE ALGICIDAS SOBRE MICROALGAS DE EFEITO  
ANTIESTÉTICO EM EMBALAGENS DE ÁGUA ENGARRAFADA.**

**Banca examinadora:**

Fáustico M. Stamford  
1º examinador /presidente

Luiz Carlos P. Albuquerque  
2º examinador

Edite Rubiro de Faria  
3º examinador

RECIFE – PE

2004

A Deus, pela constante presença em minha vida,  
a meus pais, pela educação e pelo apoio,  
a meu irmão, pelo estímulo e incentivo,  
a meu esposo, Francisco por todo amor, paciência, estímulo e,  
principalmente, por representar a companhia mais perfeita para os  
momentos mais importantes de minha vida,  
dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me permitir a oportunidade de trilhar novos caminhos e, a minha família, por me proporcionar as condições necessárias para vivenciar tais oportunidades.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade concedida para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

À professora Edleide Freitas Pires, pelo incentivo e influência em minha formação acadêmica. Com os ensinamentos que me possibilitaram crescer e aproveitar as oportunidades vividas.

À Cláudia Chamixaes Lopez, pela oportunidade concedida para ampliar meus conhecimentos e apoio na execução dessa pesquisa.

Às professoras Nonete Barbosa Guerra, Tânia Stamford, Telma Biscontini, Zelyta Faro e Alda Livera, pelos seus ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Aos amigos Laércio Borges e Vivaldo Araújo da Silva por me ensinarem às práticas microbiológicas e pelo seu compromisso e dedicação ao trabalho. Pela amizade construída e por possibilitarem a realização deste projeto.

A Moab Miguel da Silva pelo apoio concedido na realização do experimento.

A Karla Bismark Lopes e Maria Lúcia Diniz Araújo, pela contribuição na execução desse trabalho.

À Samara Alvachian, pelo apoio dado para a realização das análises estatísticas.

A Izabelle Paes de Brito, pelo incentivo e pela colaboração. A amiga Jenyffer Medeiros Campos.

Aos demais funcionários do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição – UFPE, pelo apoio concedido.

Às empresas Água mineral Serra Branca, Santa Joana e Santa Clara por possibilitarem a realização desse trabalho.

Ao Sr. Rogério Papini, da “Kalyclean” pelo apoio prestado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ILUSTRAÇÃO	
SUMÁRIO	
RESUMO	
ABSTRACT	
1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. A água e suas características	19
2.1.1. Características físicas	22
2.1.2. Características químicas	25
2.2 Algas	26
2.2.1. Algas verde-azuladas	28
2.3. Águas engarrafadas	29
2.4. Embalagem para águas	32
2.5. Formação de biofilmes	35
2.6. Sanitizantes químicos	42
3.0 OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos específicos	48
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Amostras	49
4.2. Local de execução da pesquisa	50



4.3. Métodos	50
4.3.1. Identificação de microalgas	50
4.3.2. Contagem de bactérias heterotróficas e avaliação da cor produzida por microalgas	52
4.3.3. Cultivo de microalgas	52
4.3.3.1 Inoculação	52
4.3.3.2 Preparação das amostras	53
4.3.4. Verificação da eficácia de algicidas	54
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1. Identificação das microalgas	58
6.2. Resultados da análise estatística da contagem de heterotróficos e coloração verde produzida por microalgas	62
6.3. Análise estatística da contagem de heterotróficos em águas com microalgas	64
6.4. Comportamento das microalgas após aplicação de algicidas	66
6.5 Análise estatística da aplicação dos algicidas	68
7.0 CONCLUSÕES	74
8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

## RESUMO

As águas captadas em profundidade podem apresentar desenvolvimento de microalgas, favorecendo a formação de biofilmes pelas más condições higiênicas e incidência de luz. Desta forma, procedimentos adequados de higienização que evitem a formação ou que removam os biofilmes contribuirão para a preservação da qualidade das águas engarrafadas. As amostras foram constituídas de embalagens de águas com sinais de alteração pelo desenvolvimento de microalgas, procedentes de duas empresas engarrafadoras do Agreste e Litoral de Pernambuco - Brasil. Foram utilizados dois diferentes tipos de embalagens: polipropileno de 20L e tereftalado de polietileno de 5L. Dois tipos de microalgas foram identificados: *Stichosiphon* (5L) e *Microcystis robusta* (20L). Avaliou-se a ação abrasiva de brita com detergente alcalino clorado associada a diferentes algicidas (ácido peracético e quaternário de amônia) em dois tempos de contato (5 e 15 min) sobre a inibição do crescimento das microalgas. Observou-se que nas amostras de 20L todos os tratamentos demonstraram eficácia. Nas amostras de 5L o uso da ação mecânica com detergente alcalino clorado seguido da sanitização química foi o que demonstrou melhores resultados, permitindo concluir que a associação de diferentes tratamentos (mecânico e químico) na limpeza dos recipientes possibilitou eliminar os biofilmes formados por microalgas em águas engarrafadas.

**Palavras-Chave** – água, algas, algicidas.

## ABSTRACT

The depth waters impound can show some micro seaweed development, favoring the biofilms formation by the favorable hygienic conditions and light incidence. Then, adequate hygienic procedures that avoid the formation or that remove the biofilms will contribute to the quality preservation of the bottled waters. The samples were formed of water packages with alteration by the development of the micro seaweeds that comes from two bottlers companies from the Agreste and Litoral of Pernambuco – Brazil. There were used two different kinds of 20 Liters propilen packages and tereftalado de polietileno de 5L. Two kinds of micro seaweeds were identified: *Stichosiphon* (5L) e *Microcystis robusta* (20L). There was evaluated the abrasive action of small stones with chlorine alkaline detergent associated to different algicides (ac. peracetic and ammonia quaternary) in two contact times (5 and 15 minutes) over the inhibition of the micro seaweeds growth. It was observed that in the 20L samples all the treatments showed some effectiveness. On the 5L samples the mechanic action use with the chlorine alkaline detergent followed by the chemic sanitization was that showed better results, allowing to conclude that the association of different treatments (mechanic and chemic) on the recipients cleanness permitted to eliminate the formed biofilms by seaweeds in bottled waters.

**Key words:** water, algae, algicides.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
ILUSTRAÇÃO 1. Embalagem de água (5L) com sinais de desenvolvimento de microalgas.	49
ILUSTRAÇÃO 2. Fluxograma da metodologia realizada	50
ILUSTRAÇÃO 3. Fluxograma para identificação das microalgas em recipientes de 20L.	51
ILUSTRAÇÃO 4. Fluxograma para identificação das microalgas em recipientes de 5L.	51
ILUSTRAÇÃO 5. Cultivo de microalgas em meio Bold (A= água em meio Bold, B= água sem meio Bold).	53
ILUSTRAÇÃO 6. Distribuição dos tratamentos utilizados nos dois grupos de 40 amostras (5L e 20L).	55
ILUSTRAÇÃO 7. Equipamento rotatório adaptado para garrações de 20L	56
ILUSTRAÇÃO 8. Equipamento rotatório adaptado para garrações de 5L.	56
ILUSTRAÇÃO 9. Célula da microalga <i>Stichosiphon</i> isolada de recipiente de água de tereftalato de polietileno (PET) 5L.	60
ILUSTRAÇÃO 10. Célula da microalga <i>Microcystis robusta</i> isolada de recipientes de água, de polipropileno (PP) 20L .	61

ILUSTRAÇÃO 11. Número de heterotróficos x nível de contaminação por microalgas em amostras de 5L.	65
ILUSTRAÇÃO 12. Número de heterotróficos x nível de contaminação por microalgas em amostras de 20L.	65
ILUSTRAÇÃO 13. Análise Multivariada de Correspondência Múltipla para o comportamento das microalgas ( <i>Stichosiphon</i> ) para amostras de 5L.	68
ILUSTRAÇÃO 14. Análise Multivariada de Correspondência Múltipla para o comportamento das microalgas ( <i>Microcystis robusta</i> ) para amostras de 20L.	71

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1. Alíquotas desprezadas e volumes utilizados para composição do meio Bold.	53
TABELA 2. Composição da solução estoque-1	54
TABELA 3. Composição da solução estoque-2	54
TABELA 4. Classificação taxonômica de microalgas em águas engarrafadas.	59
TABELA 5. Resultados da contagem de bactérias heterotróficas e coloração verde produzida por microalgas em amostras de 5L.	62
TABELA 6. Resultados da contagem de bactérias heterotróficas e coloração verde produzida por microalgas em amostras de 20L.	63
TABELA 7. Comportamento das microalgas ( <i>Stichosiphon</i> ) após aplicação de algicidas em amostras de 5L.	66
TABELA 8. Comportamento das microalgas ( <i>Microcystis robusta</i> ) após aplicação de algicidas em amostras de 20L.	67

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento natural, imprescindível à nutrição e à vida, por atuar como parte essencial nas reações metabólicas e por compor todos os tecidos do organismo humano. Dessa forma, a qualidade da água consumida por uma população refletirá na sua qualidade de vida e determinará a incidência de doenças, a exemplo da diarreia, uma causa de mortalidade infantil registrada no Brasil e em países em desenvolvimento (HUMBERG, 1992; MAHAN, 1998; PIMENTEL, 1999; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

A água de má qualidade constitui um veículo de contaminação, pois transporta microorganismos causadores de doenças infecciosas que podem levar à morte. Tal fato é bastante evidenciado nas populações de países subdesenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela água contaminada e, a cada ano, 15 milhões de crianças, na faixa etária entre 0 a 5 anos, morrem pela deficiência dos sistemas de abastecimentos de águas e esgotos (MACEDO, 2000; PIMENTEL, 1999; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

Diante de tal contexto, a água deve ser considerada com bastante destaque. Ademais, do total da água contida no planeta, somente 3% está disponível e destes, cerca de 75% se encontra sob a forma de calotas polares e apenas 0,3% de água doce do planeta é disponível e aproveitada (PIMENTEL, 1999; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998; TUNDISI, 2003).

As águas de origem subterrânea representam as mais puras existentes na natureza, no entanto, a preservação de sua qualidade exige atenção por parte dos

exploradores e autoridades sanitárias, uma vez que a exploração intensiva dos lençóis de águas e os procedimentos inadequados de utilização podem prejudicar a sua pureza original (PIMENTEL, 1999).

A água de qualidade satisfatória deve ser isenta de qualquer tipo de contaminação e possuir características organolépticas desejáveis ao consumidor. Por isso, a qualidade da água é uma questão tão importante quanto sua escassez (PIMENTEL, 1999).

Não obstante as impurezas de origem biológica que se encontram presentes na água, outras de distinta natureza, também podem acarretar problemas operacionais para as indústrias de alimentos por provocar a formação de depósitos, surgimento de incrustações em superfícies, corrosão em metais, espumas, lodo microbiológico, deterioração, entre outros (ANDRADE; MACEDO, 1996; MACEDO, 2000). De tal maneira, as algas se destacam por provocarem alterações e ocasionarem transtornos aos abastecimentos públicos e às águas envasadas.

A água engarrafada é classificada como a terceira bebida mais consumida, perdendo apenas para o refrigerante e para o leite. Representa a categoria que mais cresceu na década de 90, contabilizando, em volume, a quinta maior categoria de bebidas do Brasil. No período de 1992/97, o aumento de consumo per capita acumulado foi superior a 100%, contra apenas 16% dos refrigerantes. O volume de águas engarrafadas no mercado nacional cresceu 15% ao ano, nos últimos cinco anos, alcançando 2,5 bilhões de litros em 1998 com um crescimento superior a 20% em 1999 (GORINI, 2000). Diante de tão rápida evolução, com conseqüente necessidade do



aumento na produção, surgiram algumas dificuldades no segmento, dentre essas se destaca o surgimento de microalgas.

As microalgas representam um problema estético para as águas, de conseqüência econômica para as empresas engarrafadoras, pois os recipientes de natureza descartável, quando comprometidos, são rejeitadas acarretando também o desperdício do líquido. No caso dos garrafões de 20 litros retornáveis, contaminados por microalgas, os processos de lavagem tornam-se mais difíceis. A necessidade de eliminação das sujidades e da contaminação por bactérias, normalmente presentes na água, exige alternativas que possibilitem à destruição de microalgas de efeito antiestético.

As técnicas seguras, utilizadas na captação e na estocagem de águas, constituem alternativas viáveis e eficazes que visam a preservação da sua pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica, entretanto, as águas captadas em profundidade podem apresentar o desenvolvimento de microalgas, favorecendo a formação de biofilmes pelas condições higiênicas insatisfatórias, e pela incidência de luz. Desta forma, pesquisas que venham contribuir com informações de procedimentos adequados de higienização e de desenvolvimento de formulações de agentes químicos (detergentes e sanitizantes), que evitem a formação ou que removam os biofilmes, são de contribuição para a preservação da qualidade das águas.

Considerando que a incidência de microalgas nas indústrias de engarrafamento é real, crescente e responsável por alterações de ordem estética, esta pesquisa pretende contribuir com a redução do problema nas indústrias engarrafadoras de águas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A importância e a necessidade da água são universais. Sua distribuição, de aparente inesgotabilidade, tem levado a humanidade a utilizá-la de forma indiscriminada, sem maiores preocupações quanto à sua conservação (LOMBARDI NETO, 1994).

Estudos apontam que cerca de 1,2 bilhões de pessoas não possuem acesso à água limpa. A Organização das Nações Unidas (ONU) e a *Global Water Partnership* (GWP) alertam que a escassez de água poderá atingir 3 bilhões de pessoas em 2025, envolvendo 52 países e que em 2050 dois terços da população mundial poderá sofrer com o problema de escassez de água. As mesmas instituições estimam ameaças de guerras por conflitos fronteiriços em disputa por rios, como os que ocorrem entre a Turquia e Síria, em disputa pelo Rio Eufrates. (LUZ, 2000; TEICH, 2002).

A dimensão da preocupação pela água é justificada pelo crescente número de reuniões ocorridas nos últimos 40 anos para esse mesmo fim: Conferência de *Mar Del Plata*, 1977; Conferência Mundial de Água Potável e Abastecimento de Nova Deli, 1990; Simpósio Internacional sobre Água e Meio Ambiente de Dublin, 1992; Conferência de Noordwijk, 1994; Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento no Rio de Janeiro, 1992; Conferência das Nações Unidas sobre Habitat em Istambul, 1996; Conferência Internacional sobre água e Desenvolvimento Sustentável em Paris, 1998 (PIMENTEL, 1999). Os principais problemas discutidos sobre a água são relativos à sua quantidade e qualidade, uma vez que a maioria dos rios encontra-se poluída, tornando-a indisponível e ameaçando a saúde das pessoas, animais e plantas. Junta-se a isso as grandes concentrações urbanas, o consumo per capita elevado e outras intervenções humanas que afetam, de forma

dramática, o ciclo natural dos recursos hídricos, contribuindo para o mau uso e/ou escassez (LOMBARDI NETO, 1994; LUZ, 2000). Em certas regiões do mundo, como oeste dos Estados Unidos, norte da China e boa parte da Índia, a água está sendo consumida em ritmo mais rápido do que se pode renovar. Estima-se que 30% das maiores bacias hidrográficas perderam mais da metade da cobertura vegetal original, gerando a redução da quantidade de água (TEICH, 2002).

Cerca de 1,4 bilhões de pessoas não possuem acesso à água limpa, dessa forma a água pode veicular doenças e apresentar impurezas inócuas, pouco desejáveis ou extremamente perigosas. Dentre as impurezas, pode-se destacar: a presença de vírus, bactérias, algas, parasitas, substâncias tóxicas e até elementos radioativos (RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998). Devido às doenças veiculadas pela água, mais de 10 milhões de pessoas morrem por ano com idade inferior aos 18 anos, e a cada oito segundos, estima-se que uma criança morre vitimada por disenteria, cólera ou outra enfermidade transmitida pela água (LUZ, 2000; MACEDO, 2000).

O Brasil concentra cerca de 16% da produção hídrica do mundo e cerca de 51% da produção Sul-Americana (FELIPPO, 2000; LUZ, 2000) não apresentando, por enquanto, escassez de água, mas sim deficiência de gerenciamento de seus recursos hídricos. Mesmo distribuído de forma desigual, o problema da escassez promovido pela deficiência de gerenciamento por parte das autoridades competentes encontra-se longe da situação crítica observada em outros países (LUZ, 2000). Todavia, tal situação gera crises de falta d'água pela constante atividade predatória (LUZ, 2000; REBOUÇAS, 1997). Fato já observado no Brasil em algumas cidades do Nordeste como Recife - PE, Campina Grande - PB e São Luiz – MA (LUZ, 2000).

A utilização dos recursos de maneira imprudente traz péssimas conseqüências. Assim, a conservação dos recursos naturais de caráter renovável não deve ser de responsabilidade de alguns especialistas e técnicos, mas de cada indivíduo, empresa ou organização trabalhando em conjunto na preservação dos recursos que formam a base da economia da Nação (LOMBARDI NETO, 1994). No Brasil, a conscientização está longe do ideal, o Estado perfura novos poços quando deveria planejar e descentralizar o abastecimento para a prevenção de carências desnecessárias. O Estado não mapeia seus recursos hídricos nem planeja a utilização da água de forma racional (ÁGUA, 1991).

As principais questões relacionadas à gestão dos recursos hídricos parecem ter sua origem no fato de ter havido desenvolvimento e na forma que se deu. Imputa-se ao desenvolvimento, a responsabilidade pelos dois flagelos que afligem a humanidade: o aquecimento do globo terrestre e a escassez de água. Esta última, decorrente da ação humana imprevidente, associada ao saneamento sanitário inadequado que se encontra relacionado ao subdesenvolvimento nas esferas educacional, cultural, ambiental e política. O atraso nessas dimensões, por sua vez, possibilita a ocorrência de crescimento econômico desordenado e comportamento predatório causador de erosão do solo, de contaminação e/ou assoreamento dos corpos d'água, de desperdícios, de poluição e de degradação ambiental, além de estar também relacionada ao subdesenvolvimento social como a subnutrição, a mortalidade infantil e a moléstias transmitidas pela água, agravada pela deficiência de redes de esgoto e água, de drenagem urbana e de coleta de lixo (MARTINS, 2001).

Para superar tais fatos, é necessário assumir um compromisso de sustentabilidade com o futuro de forma que o desenvolvimento satisfaça as necessidades do presente, sem comprometer a capacidade das gerações vindouras em satisfazer as suas próprias necessidades, através de leis rigorosas, de investimentos em

saneamento, pesquisa e recursos humanos, da fiscalização eficiente e da criação de uma real conscientização ecológica. É imprescindível a mudança da mentalidade, dos hábitos e dos costumes, além da comunicação para a conscientização, a mobilização e a organização das ações (MARTINS, 2001).

## 2.1 A água e suas características

A água pura, incolor, inodora, insípida e transparente, não se encontra na natureza em estado de absoluta pureza. O gás carbônico presente na atmosfera e no solo, pela decomposição da matéria orgânica, dissolve-se na água aumentando sua capacidade solvente e, dessa forma, a água presente na natureza pode adquirir impurezas em diversos estados e efeitos:

em suspensão: algas e protozoários (causam alteração de sabor, odor, cor e turbidez); areia e argila (causam turbidez); resíduos industriais e domésticos;

em estado coloidal: bactéria e vírus (que podem causar prejuízos às instalações); substâncias de origem vegetal (responsáveis por alterações na cor, acidez e sabor); sílica e argila (causadores de turbidez);

dissolvidas: substâncias de origem mineral, principalmente cálcio e magnésio, além de compostos orgânicos e gases, cujos efeitos dependerão da composição, da concentração e das reações químicas com outras substâncias (MACEDO, 2000; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

A qualidade da água é definida pela sua composição química, física e bacteriológica e suas características desejáveis dependem de sua utilização. A água para consumo humano deverá ser pura e saudável, isenta de matéria suspensa visível, com cor tolerada, sem gosto e sem odor, além da ausência de microorganismos capazes de

provocar enfermidades ou de substâncias com efeitos fisiológicos prejudiciais (FELIPPO, 2000; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

O comportamento bacteriológico da água se dá em função do conjunto de variáveis como concentração e características do agente desinfetante, tempo de contato, pH, turbidez, grau de contaminação inicial, entre outros, portanto, está intrinsecamente relacionado às características globais da água (WARTCHOW; FACCIN, 1997).

Pesquisadores têm demonstrado que o crescimento bacteriano no sistema de distribuição de água pode afetar seriamente as qualidades higiênicas e estéticas da água de beber durante o seu percurso até o consumidor. Acredita-se que os biofilmes (acúmulo de microorganismos em uma superfície) formados na superfície interior da tubulação são geralmente os responsáveis pela alteração da qualidade da água. Tal hipótese é sustentada pelo fato da biomassa superficial ser normalmente mais numerosa do que a fase aquosa (BOE-HANSEN et al., 2002). Além disso, acredita-se que a degradação da matéria orgânica presente em águas de saneamento público, pela presença de bactérias, permite o crescimento de microalgas (RZAMA, 1995).

O grau de confiabilidade na qualidade da água de saneamento público sempre foi uma incógnita e varia de acordo com o conhecimento da população a respeito do tipo de serviço prestado pelo órgão de saneamento. A sua qualidade é definida por um conjunto de parâmetros determinados através de análises físicas, químicas e biológicas. Os estudos que definem os critérios de qualidade da água devem fornecer subsídios para avaliar as alterações ambientais decorrentes das atividades humanas e propor medidas que reduzam os efeitos negativos causados por elas (BARBOSA et al., 1995; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998; WARTCHOW; FACCIN, 1997).

A Portaria nº518/2004 (BRASIL, 2004) exige como padrão microbiológico de água destinada ao consumo humano e de água tratada no sistema de distribuição, ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em 100mL de água e recomenda a análise de coliformes totais em sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês, onde se deve ter a ausência em 100mL em 95% das amostras examinadas. Em sistemas que analisam menos de 40 amostras mensais, a referida Portaria tolera apenas uma amostra com resultado positivo no mês e ausência em 100mL de coliformes totais para a água na saída do tratamento. Em complementação, recomenda a pesquisa de organismos patogênicos como o enterovírus, cistos de *Giardia spp* e oocistos de *Cryptosporidium sp*, para os quais recomenda ausência.

Considerações sobre algas não fazem parte desta Portaria, não sendo portanto obrigatório o seu controle como parâmetro da qualidade da água, embora sugira a pesquisa de outros contaminantes e de toxinas que representem risco à saúde, como de cianotoxinas, de cilindrospermopsina e de saxitoxinas. Tais toxinas são substâncias naturalmente produzidas por algas verde-azuladas, em fontes de água doce, que representam grande importância com efeitos adversos à saúde pública. Em cerca de 50 a 70% das ocorrências de florações destas algas há liberação de toxinas, causando severa morbidade e mortalidade nos seres vivos e perigo à saúde humana (AGUETE et al., 2003; CODD, 2000; FLEMING, et al., 2002; GARDNER, 2000; LAWTON; CORNISH; ROSITANO et al., 2001).

A Resolução nº 54/2000 (BRASIL, 2000) que estabelece os padrões para águas engarrafadas obtidas diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas (de origem subterrânea) determina ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, de *Enterococos*, de *Pseudomonas aeruginosa* e de clostrídeo sulfito

reduzidor ou *Clostridium perfringens* em 100mL de água, não tecendo considerações sobre algas.

Ambas as portarias, além de não exigirem padrões microbiológicos para a presença de algas, desconsideram o fato que a presença das toxinas pode ser decorrente da explosão no desenvolvimento das algas (DE FILIPPO, 2000).

### **2.1.1 As características físicas**

A análise das variáveis físicas nem sempre indica a qualidade real da água, por refletir apenas as condições momentâneas (BARBOSA et al., 1995).

#### **Cor**

A água denominada pura deve ter cor tolerada (15UH<sup>2</sup>)\* que resulta da incorporação de substâncias decorrentes dos processos de decomposição que ocorrem no ambiente, tais como: os ácidos húmicos ou taninos, originados da decomposição de vegetais, e a presença de ferro que em contato com a matéria orgânica presente na água reage e produz uma cor de elevada intensidade (MACEDO, 2000; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

\* Unidade Hazen mg Pt – CO/L



O pH da água também interfere na cor, sua remoção é mais fácil a pH baixo. De tal forma, a cor pode ser removida por coagulação química, sendo que em casos onde a cor se apresenta intensa, a remoção pode ser auxiliada por oxidação química com a utilização de permanganato de potássio, cloro, ozônio ou outro oxidante. O uso de cloro elementar para oxidar os compostos responsáveis pela cor da água deve ser evitado devido à presença da matéria orgânica, pois os compostos resultantes – clorofenóis e outros trihalometanos – são suspeitos de serem cancerígenos. O cloro, entretanto, pode ser utilizado em combinação com a amônia (amoniocloração) ou na forma de dióxido de cloro, os quais não produzem trihalometanos (RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

### **Turbidez**

As partículas em suspensão na água são responsáveis pela turbidez e sua presença provoca a dispersão e a absorção da luz, originando a aparência nebulosa, esteticamente indesejável e potencialmente perigosa. Sua causa é variada: presença de argila ou lodo, grande número de microorganismos, ou até bolhas de ar e microalgas (RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998). O aumento da turbidez reduz a zona eufótica, ou seja, reduz a zona de luz onde a fotossíntese ainda encontra possibilidade de ocorrer (MACEDO, 2000).

A Portaria n° 518/2004 (BRASIL, 2004) recomenda com vistas a assegurar a remoção de enterovírus, cistos de *Giardia spp* e oocistos de *Cryptosporidium spp* que a filtração rápida seja realizada com a meta de obtenção de efluente com valores de turbidez inferiores a 0.5 unidades de turbidez em 95% dos dados mensais.

## **Sabor e odor**

São sensações subjetivas causadas por impurezas dissolvidas, como os produtos originados pela decomposição orgânica, pela atividade biológica de microorganismo ou pelas fontes industriais contaminadas (MACEDO, 2000). Geralmente, as impurezas são de natureza orgânica como fenóis e clorofenóis, resíduos, gases, etc. Muitas substâncias orgânicas que levam à alteração de odor e sabor da água são atribuídas ao florescimento de algumas espécies de algas que produzem a geosmina e o MIB (2-methylisoborneol), fator decorrente da presença de actinomicetos na água. A presença de sólidos totais em grandes concentrações pode produzir gosto sem odor. Em alguns casos, quando existem alterações de sabor e odor na água, a aeração pode ser eficaz, todavia, em determinadas situações, será necessária a utilização de carvão ativado para adsorção dos compostos causadores do odor (DI BERNARDO, 1995; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998).

## **Temperatura**

A temperatura exerce influência sobre várias ações. Temperaturas elevadas promovem a aceleração das reações químicas, o aumento da solubilidade dos sais, a diminuição da solubilidade dos gases, levando a acentuação do sabor e do odor da água, e o crescimento microbiológico (MACEDO, 2000; PIRES, 2002; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998). De acordo com Macedo (2000) e Pires (2002) temperaturas mais baixas (inferiores a 30°C) são mais desejáveis, pois desfavorecem o desenvolvimento da maioria dos microorganismos (mesófilos e termófilos) e melhoram a palatabilidade da água.

### **2.1.2 As características químicas**

São determinadas segundo métodos adequados e padronizados. A alteração da composição química da água é influenciada pela poluição química em mananciais que ocorre com o despejo de resíduos domésticos, agrícolas ou industriais, de forma dissolvida ou particulada em lagos, represas e rios. Os esgotos domésticos são ricos em gorduras e detergentes, além de compostos orgânicos formados por nitrogênio e fósforo. O enriquecimento dos corpos d'água com N e P pode gerar o crescimento excessivo das algas ou plantas aquáticas, em um processo conhecido como eutrofização. Esta é tida como natural quando ocorre em ecossistemas aquáticos continentais, em águas costeiras marinhas e em águas subterrâneas; cultural quando provém do despejo de esgotos domésticos, indústrias e da descarga de fertilizantes aplicados na agricultura. (LUZ, 2000; MACEDO, 2000; RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1998; TUNDISI, 2003).

Os impactos resultantes da eutrofização geram o aumento dos custos para o seu tratamento, a perda do valor estético de lagos, represas e rios, além de impedir a navegação e a recreação, diminuindo o valor turístico e os investimentos nas bacias hidrográficas. Para certos tipos de indústrias, o custo do tratamento de águas eutrofizadas pode impedir a sua instalação. Neste contexto, a eutrofização é um fenômeno mundial que afeta rios, lagos, represas e tanques de abastecimento, na superfície em águas subterrâneas e também em águas costeiras e o seu desenvolvimento gera custos para o tratamento e produção de água potável adequada para o consumo humano (TUNDISI, 2003).

## O pH

Na maioria das águas subterrâneas, o pH é neutro ou levemente alcalino, entre os valores de 7 e 8, no entanto para águas consideradas leves, o pH pode ser mais baixo, entre 5 e 6. Alguns fatores podem contribuir para a modificação destes valores de pH que variam desde a presença de materiais primários do subsolo na água, até o processo de captação da água. Tal processo provoca a aeração, levando à dissolução do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera na água, que conseqüentemente provoca a liberação dos íons hidrogênio e a redução do pH (PIRES, 2002).

### 2.2 As algas

As algas cobrem 70% da superfície do planeta, e constituem os principais produtores primários de compostos orgânicos de carbono. Podem apresentar uma coloração bastante variável, encontrando-se algas verdes, amarelas, vermelhas, pardas, azuis, castanho-douradas etc. Em geral, as algas são autotróficas, ou seja, são capazes de sintetizar os metabólitos essenciais a partir de substâncias químicas simples e energia luminosa. Algumas algas como as das espécies de *Chlorella*, *Chlorogonium*, *Euglena* e *Navícula* possuem pigmentos fotossintetizantes e são capazes de crescer no escuro ou em ambiente pobre em gás carbônico, caso sejam fornecidas substâncias químicas de alto teor energético e facilmente metabolizáveis como os ácidos graxos, acetatos e carboidratos (BICUDO; BICUDO, 1970; TIFFANY, 1958).

Representam um grupo cosmopolita que ocorre na superfície de todos os tipos de solos e regiões permanentemente cobertas de gelo ou neve. No entanto, o seu maior centro de distribuição é o aquático. Os tipos presentes em água doce são muito diversificados e sua abundância dependerá de condições ecológicas adequadas. Certos

tipos possuem exigências ecológicas bem definidas, permitindo o reconhecimento de meios com características especiais, capazes de flutuar em um meio aquoso por possuírem algum mecanismo ativo ou alguma característica celular que a permite permanecer em suspensão (BICUDO; BICUDO, 1970; LOZOVEI; HOHMANN, 1977; ROUND, 1983; TIFFANY, 1958). Constituem um fator de indicação das condições ecológicas e sanitárias das águas. A sua presença na água também pode provocar alterações indesejáveis como modificação do sabor e do odor. Alguns tipos produzem odores aromáticos, de gerânio, de violetas, de melão, de pepino e de terra molhada, outros produzem odores pútridos, freqüentemente encontrados como resultado da presença de algas verde-azuladas ou verdes (DI BERNARDO, 1995; LOZOVEI; HOHMANN, 1977; PALMER, 1962).

As algas constituem um grupo heterogêneo de vegetais criptogâmicos, compreendendo 13 grandes divisões e diversos grupos menores não completamente estudados (ROUND, 1983). De acordo com Bicudo e Bicudo (1970), as algas se classificam em 12 classes – Chlorophyceae, Xanthophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae, Chrysoceae, Desmokyntae, Cyanophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Chloromonadophyceae.

As algas exigem temperaturas distintas para seu crescimento ideal: entre 18 - 30<sup>0</sup>C para as diatomáceas, 30 -35<sup>0</sup>C para as verdes e 35-40<sup>0</sup>C para as verde-azuladas, entretanto, algumas algas verde-azuladas são capazes de crescer a temperaturas superiores às apresentadas. Com relação ao pH, a maioria das algas cresce melhor em águas cujo pH se encontra neutro ou quase neutro, porém, sabe-se que um número

considerável de algas, especificamente as verde-azuladas, possui a capacidade de se desenvolver com relativa facilidade em água de pH elevado (PALMER, 1962).

### **2.2.1 Algas Verde - Azuladas**

As algas verde-azuladas, também conhecidas como cianobactérias ou cianofíceas, são microorganismos procarióticos autotróficos, capazes de ocorrer em qualquer manancial superficial, especialmente naqueles com elevados níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo), como por exemplo, em águas marinhas, salobras e continentais, incluindo água doce superficial destinada ao consumo humano (FLEMING et al., 2002). Tais algas são componentes naturais da comunidade biótica de ecossistemas lóticos e lênticos, sendo que algumas espécies desempenham relevante papel no ciclo do nitrogênio na água por serem fixadoras deste na sua forma elementar (CARVALHO; SILVESTRE; MOURA, 1999).

A presença de cianotoxinas, naturalmente produzidas pelas algas verde-azuladas, em fontes de água doce, tem importância para a saúde humana, com efeitos adversos à saúde pública (FLEMING et al., 2002; ROSITANO et al., 2001).

Alguns autores relatam que pelo menos três dos 50 gêneros conhecidos de cianobactérias são capazes de produzir toxinas e cerca de 50-70% das florações (“*blooms*”) liberam substâncias tóxicas (ROSITANO et al., 2001), levando a severa morbidade e mortalidade em animais domésticos através do consumo da água contaminada pelas toxinas presentes. Causam também impactos ambientais negativos como a mortalidade de organismos aquáticos pelo decréscimo de oxigênio contido na

água, prejuízo da vegetação aquática submergida pelo sombreamento causado pelas algas, diminuição da estabilidade do ecossistema, que interfere na dinâmica do ciclo alimentar deslocando espécies de fitoplâncton naturais e produção elevada de cianotoxinas. As razões para a floração da cianobactéria não estão completamente esclarecidas (FLEMING et al., 2002). A ocorrência da floração da cianobactéria e a possibilidade das mesmas produzirem cianotoxinas tem trazido grandes preocupações aos fornecedores de água de consumo humano (ROSITANO et al., 2001).

Pensando nisto, são testados alguns métodos de tratamento para a água potável tendo como alternativa a utilização do ozônio. Rositano et al. (2001) estudaram o efeito do ozônio na destruição de hepatotoxinas (microcistinas), saxitoxinas e anatoxina-a e concluíram que a remoção eficaz dessas toxinas dependerá de alguns fatores, como por exemplo, da dose de ozônio empregada e da qualidade da água.

A sanitização química em recipientes plásticos pode ser outra alternativa viável a fim de evitar o crescimento de microalgas de efeito antiestético. A inadequação ou a ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderá gerar uma contaminação do produto pós-processo e conseqüentemente uma redução da vida útil do produto, ou alterações que levem à rejeição do mesmo (PETRUS et al., 2001).

### **2.3 Águas engarrafadas**

As culturas das águas minerais data da era dos romanos, mais especificamente da região da Gália, onde se introduziu o comércio de águas minerais. No século XVII, na França, o comércio de águas minerais foi regulamentado por Henri IV. Apenas no

século XIX, surgiu a indústria de envasamento de água mineral, que em função da crença da cura pela água desencadeou as vendas de frascos com água. Mais tarde surgiu a atividade industrial com o desenvolvimento de máquinas de encher frascos, inicialmente em vidro (MACEDO, 2000). A produção brasileira de água engarrafada manteve-se estável até 1968, quando foi lançado no mercado o garrafão de vidro de 20 litros. O setor das embalagens de vidro mostrava-se em queda pela competição de outros materiais e pela dificuldade de modernização de tecnologia e de desenvolvimento de novos produtos. Em 1992 detinha a participação de 20% do volume comercializado, em 1997 este percentual caiu para 8%. Superados esses problemas o setor vidreiro começou a crescer, acompanhando novamente o mercado de embalagens no Brasil. Tal fato possibilitou a expansão do mercado deste produto, uma vez que a água engarrafada passou a ser consumida também em escritórios, bares e indústrias (GORINI, 2000; PALHARES, 1998; PIRES, 2000; SOUZA, 2002).

No fim dos anos 60, novo impulso é dado a esta atividade em função do surgimento das embalagens plásticas. Em 1997, entre os países da América Latina, o Brasil representou mais de 50% do consumo total de água envasada na região (GORINI, 2000; MACEDO, 2000).

O mercado de água aumentou em 98,5%, nos últimos 5 anos, em consequência de gostos mais sofisticados e, recentemente, da preocupação com a qualidade da água potável. Muitos países possuem uma legislação diferente sobre a qualidade microbiológica e química das águas minerais engarrafadas. A constante preocupação com a qualidade sanitária das águas engarrafadas tem crescido à medida que o seu consumo aumenta. Tal crescimento pode ser atribuído a alguns fatores como: agressão



ao meio ambiente, melhora no nível de renda da população (especialmente no período de 1994 e 1996), mudanças no estilo de vida dos consumidores, legalização de empresas que antes atuavam na informalidade, maior abrangência e incremento no mercado, principalmente pela participação dos supermercados – que representam a parcela de 47% do volume consumido (excluindo embalagens de 20L) e pela introdução de novas embalagens descartáveis (BRASIL PACK, 2002; GORINI, 2000; MORAIS, 1991; NISHIIHARA; ALABURDA; MAIO, 1998; PIRES, 2002).

Para que a água envasada não cause risco à saúde, devem ser levadas em consideração as condições relativas ao processo de envasamento (ambiente, instalações, equipamentos, processamento, pessoal técnico, estocagem e distribuição), sendo de fundamental importância a implantação de um sistema de controle em todas as etapas do processo industrial, englobando um conjunto de ações para avaliação de qualquer interferência que possa alterar a qualidade final da água. Tal sistema de controle também deve possibilitar a tomada de medidas preventivas e corretivas, caso ocorram problemas de contaminação em alguma etapa do processo (BRASIL, 2002)

A confiança e a preferência por águas engarrafadas são justificadas pela duvidosa qualidade da água fornecida pelos sistemas de saneamento público, que, na maioria das vezes, impossibilita a garantia de um produto com qualidade total e naturalmente ausente de compostos químicos, potencialmente tóxicos ou cancerígenos, como os cloretos orgânicos (PIRES, 2002). Outro fator que justifica e estimula o consumo de água engarrafada é a informação sobre propriedades terapêuticas divulgadas em todo o mundo, sobretudo no continente europeu (EIROA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1996; MORAIS, 1991). Como exemplo, cita-se o uso da água no

tratamento de doenças gastrointestinais, (SCALABRINO; BUZZELLI; RAGGI, 1998) em pacientes com dispepsia idiopática, (BORTOLOTTI et al., 1999) e na normalização da permeabilidade intestinal em pacientes com dermatite atópica (DUPUY et al., 1999). Dependendo do tipo de água consumida, admite-se que pode curar ou aliviar diversos males. A água ferruginosa, por exemplo, é indicada para os diferentes tipos de anemia, de parasitoses e de alergias. As águas bicarbonatadas agem no aparelho digestivo, estimulando a função gástrica, hepática e pancreática; a sulfurosa é indicada nos casos de reumatismo, doenças de pele e inflamações em geral; as ricas em cálcio fortalecem os ossos; as carbogasosas são diuréticas e digestivas; as que contêm potássio tonificam o sistema nervoso; as que contêm altos teores de magnésio favorecem a contração muscular e as que possuem sódio, facilitam o equilíbrio de água no organismo (GORINI, 2000).

#### **2.4 Embalagem para águas**

Existem no mercado vários tipos de materiais para embalar águas, cada um apresentando vantagens e inconvenientes. A escolha definitiva resulta em um compromisso entre os imperativos econômicos, técnicos (como transporte e manuseio) e sanitários. Este último parâmetro deveria ser o mais importante (POPOFF, 1996; SOUZA, 2002), entretanto outro fator como a expectativa do consumidor pela forma de apresentação da embalagem determina, segundo Palhares (1998), o fator decisivo no processo de escolha e compra do produto.

A melhora da distribuição no mercado de águas envasadas repercutiu no aumento da oferta de embalagens plásticas. Estima-se que o consumo de plásticos no Brasil atingirá cerca de 4,3 milhões de toneladas em 2005. As embalagens de 1L e de

1,5 L apresentaram uma taxa média anual de crescimento de 134%, no período 1993/97, (contra a média geral da indústria de 20%). As embalagens plásticas de 300/500 mL cresceram a taxa média anual de 106% e as embalagens de 20L cresceram à taxa de 63% ao ano no mesmo período. As embalagens plásticas acima de 5L, também denominadas de institucional, representaram, em 1997, mais de 50% do volume consumido e cresceram à taxa média anual de 33%, no período 1993/97 (FORLIN; FARIA, 2002; GORINI, 2000).

Os materiais de embalagem, em contato com a água, não devem modificar suas propriedades microbiológicas, físico-químicas e organolépticas (POPOFF, 1996), tampouco permitir que elementos externos à água (tais como as contaminações) com ela interajam, que haja vazamentos ou que não apresentem uma boa imagem junto ao consumidor, uma vez que a embalagem exerce a função de ferramenta essencial para o *marketing* do produto (BRASIL, 1999; PIRES, 2000).

As indústrias buscam o desenvolvimento de novas matérias-primas, procurando melhores propriedades e características a um custo final equivalente ou inferior ao das embalagens já existentes no mercado. A embalagem é baseada em uma alta tecnologia na qual os parâmetros a serem considerados são inúmeros. O Brasil utiliza os mesmos tipos de embalagens que os países da Europa e dos Estados Unidos (MENDES; ANJOS, 1980). Vários tipos de materiais são utilizados para a confecção de embalagens de água: polietileno (PE), polipropileno (PP), policarbonato (PC), Policloreto de Vinila (PVC) e tereftalado de polietileno (PET). Estes materiais apresentam baixo custo, não formam ferrugens, possuem leveza, facilidade de manuseio e transporte, reciclabilidade e praticidade (MACEDO, 2000).

Com o constante crescimento do mercado de águas, surgiram novas mudanças com a substituição das tradicionais embalagens de vidro por PVC e PP e, mais recentemente, pelas embalagens de PET que tiveram seu destaque pelo conjunto de características apresentado: mais bonita, atraente, leve, transparente e resistente (ANJOS, 2004; RIBEIRO, 1995) e impermeável aos gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ), água e raios UV (KILLESTIJN, 1990).

Os engarrafadores de água enfrentam problema de qualidade, devido à alteração de sabor e aroma de algumas águas envasadas em PET. Isso ocorre devido à migração de acetaldeído da embalagem para o produto, formado principalmente durante a injeção das pré-formas, que se manifesta no produto após o envase, sobretudo na água sem gás, conferindo sabor adocicado de água de coco e/ou de frutas. Tais alterações dependem de alguns fatores, tais como: concentração, composição química da água, oxigênio dissolvido, temperatura e outros fatores intrínsecos à embalagem (ANJOS, 2004; POPOF, 1996).

Estudos demonstram que o material de embalagem adequado, quando isento de impurezas, não exerce influência sobre o comportamento da microbiota autóctone de águas oligominerais, aquelas que possuem um nível muito baixo de componentes químicos na sua composição. Dessa forma, as alterações drásticas do comportamento da microbiota, quando observadas em águas engarrafadas, são atribuídas à presença de impurezas nas embalagens que comprometem a qualidade do produto estocado (BISCHOFBERGER et al., 1990; EIROA; JUQUEIRA; SILVEIRA, 1997; PIRES, 2002; URMENETA; NAVARRETE; SANCHO, 2000) e que variações entre as contagens de bactérias encontraram-se associadas à qualidade higiênica do depósito no qual a água é estocada, fato este bastante observado em amostras engarrafadas,

sobretudo, em embalagens retornáveis (GONZALES; GUTIERREZ; GRANDE, 1987). Assim, as características do recipiente podem influir na sobrevivência das bactérias na água engarrafada. Foi constatado que o *Vibrio cholerae* sobreviveu 22 dias em recipientes plásticos e 27 dias em recipientes de metal (CAMPO; QUIROZ, 2004). Em outro estudo, realizado por Morais (1991) avaliou-se a influência de diferentes tipos de vasilhames na microbiota da água mineral engarrafada, sendo constatado que a água de emergência contém uma microbiota constituída por diversas populações bacterianas presentes em baixo número, no entanto, após alguns dias de engarrafamento, esse número aumentou para valores entre  $10^4$ - $10^5$  UFC/mL e o processo de multiplicação independe do processo utilizado no envase. As populações que constituem a microbiota da água engarrafada sofrem mudanças ao longo do tempo, de modo que os grupos que inicialmente formavam a maioria da microbiota desaparecem com o tempo e surgem outros grupos, antes minoritários (MORAIS, 1991).

## 2.5 Formação de biofilmes

'*Biofilme*' e '*biofouling*' são termos utilizados para descrever o acúmulo de organismos em uma superfície podendo originar, respectivamente, benefícios ou prejuízos ao ambiente onde se formam. Suas utilizações benéficas incluem: o tratamento de águas onde os compostos do biofilme microbiano aderido ao material filtrante removem as combinações orgânicas e inorgânicas presentes na água residual tornando a água reutilizável ou despejada em lagos. Na indústria de alimentos é utilizada na produção do ácido acético para a fabricação do vinagre (HOOD; ZOTTOLA, 1997; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Os biofilmes apresentam uma estrutura complexa nas quais as populações de bactérias são enclausuradas em uma matriz para formar agregados que se aderem uns

aos outros ou a uma superfície, podendo ocorrer em combinações isoladas ou associadas e apresentar células no seu interior, protegidas ao ataque de substâncias químicas. Estudiosos relatam ainda que a microbiota autóctone pode ser responsabilizada pela formação indesejável destes biofilmes (JONES et al., 1999; VIDELA; CHARACKLIS, 1992; WHITELEY; BROWN; MCLEAN, 1997; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Os microorganismos presentes nos biofilmes, em determinadas condições, se depositam, aderem, interagem com as superfícies e iniciam seu crescimento celular, multiplicando-se até originar uma massa celular agregada a nutrientes, resíduo e outros microorganismos (ANDRADE; MACEDO, 1996; WHITELEY; BROWN; MCLEAN, 1997; ZOTTOLA, 1994). Assim, no esforço de se manterem viáveis, os microorganismos procuram superfícies sólidas com nutrientes suficientes para o seu crescimento (ZOTTOLA, 1994).

A colonização microbiana de superfícies tem sido estudada há vários anos em vários ambientes. Os biofilmes verdadeiros incluem não somente bactérias aderentes, mas também a matriz de material extracelular produzido pelas bactérias (CHARACKLIS; MARSHALL, 1989; HOOD, ZOTTOLA, 1997). As microcolônias aderentes são comumente encontradas na natureza e em qualquer superfície em contato com a água como também em superfície sólidas, umedecidas com diferentes tipos de líquidos: água fresca, água do mar, leite, ou a outras superfícies que variam desde o dente humano ao intestino, ou até mesmo, a uma pedra submergida dentro de um ambiente com fluxo que se move rapidamente. Também são capazes de aderir, crescer e atacar diversos materiais, tais como: aço inoxidável, teflon, vidro, borracha, fórmica, polipropileno e ferro ou em alimentos como carcaça de bovinos, aves e peixes, além de frutas e vegetais. São compostos por diferentes tipos de microorganismos, de combinações químicas, biológicas, inorgânicas ou orgânicas, podendo ser

biologicamente ativos ou inativos. Dentre as partículas biológicas podem ser discriminadas: algas, outros organismos planctônicos, vírus, bactérias, bolores, leveduras ou esporos (ANDRADE; MACEDO, 1996; CAMPO; QUIROZ, 2004; CHARACKLIS; MARSHALL, 1989; EMTIAZI et al., 2004; LOMANDER et al., 2004; MOSTELLER; BISHOP, 1993; SOMMER; MARTIN-ROUAS; METTLER, 1999; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

No meio aquoso, o processo de adesão envolve 3 componentes: a superfície da célula microbiana, o substrato sólido da superfície e o líquido envolvente (CRIADO; SUÁREZ; FERREIRÓS; 1994). A matéria orgânica e inorgânica, presente no líquido, sedimenta sobre a superfície sólida, subseqüentemente, os microrganismos são atraídos e se aderem. No processo de adesão, as partículas livres, flutuantes no meio líquido, irão eventualmente sedimentar-se e entrar em contato com um substrato sólido. Após o que, as células microbianas iniciarão o crescimento e formarão o biofilme microbiano. Tal estrutura é unida por um biopolímero, sintetizado pelos microrganismos aderidos ao substrato que agem como uma “cola” na estrutura do biofilme, atraindo células e nutrientes, presentes no meio líquido (CHARACKLIS; MARSHALL, 1989; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

As espécies de microrganismos presentes nos biofilmes variam com relação ao local, tempo, quantidade de oxigênio presente na água, temperatura, pH, tipo de material do recipiente e nível de nutrientes. Uma propriedade particular dos contaminantes microbianos refere-se à capacidade de crescimento em baixos níveis de nutrientes (CAMPO; QUIROZ, 2004; VIDELA; CHARACKLIS, 1992).

Diferenças metabólicas podem ocorrer entre bactérias aderidas e livres, o que enfatiza a importância de estudos nos dois habitats (BOE-HANSEN et al., 2002). Dessa maneira, as bactérias aderidas às superfícies mostraram ser fisiologicamente diferentes das células planctônicas (WHITELEY; BROWN; MCLEAN, 1997 ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Alguns autores sugerem que as células associadas ao biofilme possuem vantagem no crescimento e sobrevivência em relação as células planctônicas (LOMANDER et al., 2004). Evidenciou-se que as bactérias da fase aquosa demonstraram ser mais susceptíveis à depleção de nutrientes, enquanto que as bactérias do biofilme não foram afetadas, reforçando a teoria de que as bactérias do biofilme são menos susceptíveis às modificações ambientais, comparadas às do tipo planctônicas ou em suspensão (BOE-HANSEN et al., 2002).

De acordo com Marshall (1992) e Costerton e Lappin-Scott (1989) citado por Zottola e Sasahara (1994), as diferenças relacionadas com o tipo de substratos sólidos utilizados na adesão e as condições ambientais encontradas refletem nas diferenças fisiológicas apresentadas. A formação do biofilme chega a um estado fixo quando as células se projetam no meio líquido, ocorrendo substituição das células velhas. Em sistemas correntes, a contínua provisão de nutriente assegura que as células fiquem metabolicamente ativas à camada externa durante o estado fixo. Em sistemas estáticos, tal fato não é observado, os biofilmes permanecem inativos até que sejam providos nutrientes para seu crescimento adicional.

O mecanismo pelo qual os biofilmes são formados não é perfeitamente definido. Várias teorias são propostas para a formação de biofilmes, mas todas parecem concordar que o evento inicial de formação é um processo de transferência que limita e controla a



formação de biofilme. Tal etapa inclui a deposição da matéria orgânica para condicionar filmes, célula, adsorção, crescimento das células, e taxa de fluxo que contribui para a disponibilidade do nutriente. Esforços em pesquisas concentradas em etapas isoladas podem ser infrutíferos, pois todos os passos estão relacionados (CHARACKLIS; MARSHAL, 1989; HOOD; ZOTTOLA, 1997; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Outros pesquisadores demonstraram que vários tipos de microorganismos são capazes de participar com maior ou menor intensidade nos processos de adesão para formação de biofilmes. Dentre os microrganismos alteradores destacam-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus spp* e *Bacillus cereus*. Em relação às bactérias patogênicas se incluem a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, várias delas incluídas como responsáveis por provocar doenças de origem alimentar. Nos biofilmes podem ocorrer a formação de toxinas de origem bacteriana que seriam veiculadas, após transferência, para alimentos (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Existem duas teorias, propostas por pesquisadores, para o processo de formação de biofilmes microbianos em superfícies sólidas. Uma sugere que o processo ocorra em duas etapas:

na primeira, tida como reversível, o microorganismo é fracamente aderido à superfície por atração eletrostática e força de Van der Waals. Neste estágio, a célula bacteriana pode ser facilmente removida. A segunda etapa, irreversível, depende do tempo de aderência e envolve adesão física da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida por microorganismos que irão envolver

as células também conhecidas como matriz de glicocálix. Estes polissacarídeos ajudam a aderir o nutriente e promover uma proteção física aos microorganismos aderentes, protegendo-as do ataque de sanitizantes e suprindo-as de nutrientes (ANDRADE; MACEDO, 1996; CHARACKLIS; MARSHALL, 1989; CRIADO; SUÁREZ; FERREIRÓS, 1994; HOOD; ZOTTOLA, 1997; LOMANDER et al., 2004; MOSTELLER; BISHOP, 1993; ZOTTOLA, 1994; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Segundo Costerton, Irvin e Cheng (1981) citado por Mosteller e Bishop (1993) até recentemente, o ataque de bactérias não despertaram muito interesse. Isto devido a falta de habilidade das células produzirem um glicocálix em cultura pura. Tal fato sugere que o glicocálix, aderido à célula, é natural no ambiente. Já em culturas puras de laboratório, onde as condições de stress são mínimas, não ocorre a formação do glicocálix. Frequentemente, as culturas puras de laboratórios são usadas para se testar a eficácia de sanitizantes, o que poderia conduzir a falsas suposições sobre a efetividade do sanitizante. As culturas de laboratório podem não representar os microorganismos encontrados naturalmente no ambiente, já que ele não possui o glicocálix quando em suspensão. As colônias cobertas por glicocálix podem ser mais resistentes a sanitizantes do que culturas em suspensão (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

A outra teoria que tenta explicar o processo de formação desses biofilmes propõe a existência de cinco etapas: transporte de nutrientes, matéria orgânica e inorgânica para superfícies sólidas; formação de uma camada contendo nutrientes orgânicos e inorgânicos; adesão dos microorganismos à superfície e início do crescimento celular; intensa atividade metabólica do biofilme e finalmente liberação do biofilme, podendo originar conseqüências indesejáveis à qualidade do alimento

(ANDRADE; MACEDO, 1996; ZOTTOLA, 1994). Alguns estudos demonstraram que quando o tempo de contato com as superfícies aumenta, aumentam também o número de células, o tamanho da microcolônia e o grau de ligação das células inertes, como também entre células (ZOTTOLA, 1994).

Outros fatores também podem influenciar a adesão microbiana às superfícies, tais como: as características do microrganismo, do material aderente, do meio de cultura, da idade da cultura e da concentração do microrganismo. Sabe-se, por exemplo, que as bactérias gram-negativas tem maior facilidade de adesão. Em relação ao material aderente, são importantes os tipos, forma iônica e o tamanho da partícula. No que se refere ao meio, influenciam nesse processo o pH, a concentração de sais inorgânicos, os compostos orgânicos, agitação e tempo de contato (ANDRADE; MACEDO, 1996; CHARACKLIS; MARSHALL, 1989; SOMMER; MARTIN-ROUAS; METTLER, 1999).

Embora a maioria dos trabalhos sobre biofilmes represente grande simulação laboratorial, há evidências de que os biofilmes se formem em condições de processamento. Nesse aspecto, os procedimentos de higienização corretos das superfícies que entram em contato com alimentos apresentam papel relevante. A sanitização química em recipientes plásticos pode ser uma alternativa viável a fim de evitar o crescimento de microalgas de efeito antiestético. Durante a higienização, os agentes mecânicos e químicos detergentes têm a função de remover resíduos orgânicos e minerais das superfícies, enquanto os sanitizantes físicos ou químicos eliminam patógenos e reduzem o número de alteradores das superfícies em níveis aceitáveis (ANDRADE; MACEDO, 1996; LOMANDER et al., 2004).

Os microorganismos aderidos apresentam uma resistência maior à ação dos sanitizantes. No ambiente de processamento de alimentos, os biofilmes não são inativados pelo uso de métodos comuns de limpeza e sanitização. Além do que, muitos autores sugerem que a idade do biofilme afeta a resistência dos microorganismos aos sanitizantes. Como também concluíram que a efetividade da limpeza na remoção do biofilme depende do tipo do microorganismo, da população inicial e do tempo de limpeza (ANDRADE; MACEDO, 1996; ZOTTOLA, 1994).

## **2.6 Sanitizantes químicos**

Na maioria dos casos, os sanitizantes de uso rotineiro na indústria de alimentos, tais como compostos a base de cloro, iodo, quaternário de amônia, peróxido de hidrogênio, clorhexidina, ácido peracético, dentre outros são aprovados pelos testes laboratoriais nas condições recomendadas pelos fabricantes (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Em geral, compostos como o quaternário de amônia ácido, o dióxido de cloro e o ácido peracético foram os sanitizantes mais efetivos em células agregadas. Os menos efetivos foram o iodo, compostos a base de quaternário de amônia neutro e o cloro (ZOTTOLA, 1994). Este último possui alta reatividade oxidativa que destrói a atividade de proteínas celulares, induz reações de descarboxilação de modo irreversível, tem um forte poder desinfetante, porém dos biocidas, os de cloro são menos eficazes em biofilmes do que em células suspensas (BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; LOMANDER et al., 2004). Tal fato é dado devido as células do biofilme serem

protegidas pelo glicocálix da ação do biocida onde sua eliminação só ocorrerá em altas concentrações (BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994).

Os biofilmes microbianos minimizam a eficiência do processo de cloração de água (ANDRADE; MACEDO, 1996). Caravelli et al. (2003) observaram que o cloro pode reagir rapidamente com a amônia presente nas culturas em temperatura e pH controlados e que, em apenas um minuto, as cloraminas formadas correspondiam a 95% do total de cloro adicionado no experimento (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

A utilização de um método físico, associado com a aplicação de ozônio, apresenta-se como um recurso que pode ser utilizado nos procedimentos de limpeza, normalmente empregados nos recipientes retornáveis, uma vez que, de forma isolada, não garante a remoção de biofilmes porventura já existentes (PIRES, 2002). A inadequação ou a ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderá gerar uma contaminação do produto pós-processo e uma conseqüente redução da vida útil do produto (PETRUS et al., 2001), ou mesmo a alterações que levem à rejeição do mesmo. Fujikawa et al. (1997) observaram a olho nu a presença de fungos em 292 amostras de águas engarrafadas e constataram que algumas amostras apresentaram tal alteração, mesmo após terem sido utilizados procedimentos de esterilização por métodos de filtração, ultravioleta ou ozonização. Tal fato, segundo Fujikawa et al. (1997) pode ser atribuído aos seguintes fatores: a) esterilização não efetiva utilizada na fabricação do produto; b) falhas em outras etapas do processamento; c) presença de tais microorganismos aderidos ao próprio recipiente utilizado para o envase; d) contaminação externa. Ademais, as práticas de higiene pessoal incorreta podem contribuir para a contaminação da água engarrafada (GRANT, 1998).

A sujeira encontrada em sistemas de processamento de alimentos é composta de matéria inorgânica e orgânica tais como: proteínas, gorduras ou carboidratos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Diante de tais fatos recomenda-se o emprego de detergentes para a remoção da matéria orgânica, enquanto os sanitizantes são indicados, após o tratamento com detergente, para eliminar células vegetativas e alguns esporos, dependendo do tipo e concentração do sanitizante utilizado (ZOTTOLA, 1994).

Os detergentes ou os agentes de limpeza são compostos de várias formulações químicas que molham e penetram na sujeira promovendo sua remoção. Os álcalis saponificam óleos e gorduras; outros agentes solubilizam as proteínas; os compostos quelantes se ligam e removem minerais; os ácidos removem minerais depositados; os enxagüantes, os agentes de floculação e os agentes dispersantes previnem a redeposição da sujeira e os surfactantes agem como agentes molhantes. A escolha do sanitizante a ser usado depende de vários fatores e varia com a sua aplicação. Sanitizantes são muito efetivos quando substâncias orgânicas são removidas da superfície a ser tratada (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Dessa forma, para o controle e prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme microbiano, presente numa superfície com resíduos oriundos de alimentos, impede uma efetiva penetração do sanitizante para eliminar os microorganismos, pois, o sanitizante reage inicialmente com resíduos de proteínas, gordura, carboidratos e minerais, restando ao final, pouca atividade sanitizante para agir sobre os microorganismos. (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Sabe-se que, quando o biofilme é tratado corretamente com detergente, antes do uso de sanitizantes, os microorganismos geralmente são eliminados. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem, nem inativam os microorganismos aderidos (ANDRADE; MACEDO, 1996). De acordo com Lomander et al. (2004) caso a matriz do biofilme não seja completamente removida, durante a sanitização, os patógenos podem aderir à superfície dando início à formação de um novo biofilme, mesmo se os patógenos anteriores forem eliminados.

A substância química, resultante de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante, mostrou-se eficaz para processos de esterilização de garrafas plásticas, em função de sua rápida ação em baixa concentração. Tal substância citada apresentou eficácia em células vegetativas, esporos bacterianos, bolores, leveduras e vírus (ANDRADE; MACEDO, 1996; PETRUS et al., 2001). O referido composto possui baixa estabilidade de manuseio. As concentrações recomendadas para uso deste produto são: concentração de 300-700 mg/L; pH entre 2-4; temperatura, de no máximo, 30<sup>0</sup>C; e tempo de contato de 10-15 minutos e diluição de 0,05-0,1% para a indústria de alimentos (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

Outros tipos de substâncias utilizadas são o peróxido de hidrogênio e o álcool. O peróxido de hidrogênio age com a decomposição em água e oxigênio altamente reativo, de forma a eliminar o microorganismo pelo seu efeito fortemente oxidativo (PETRUS et al., 2001). Tal composto tem sido aplicado para a esterilização de embalagens de produtos assepticamente embalados e para a sanitização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos (ANDRADE; MACEDO, 2000). Alguns pesquisadores

associam a utilização de temperaturas elevadas, de até 95<sup>0</sup>C, na sanitização de embalagens ou no tratamento com peróxido seguido de ar quente a 125<sup>0</sup>C. O ar quente dissipa o peróxido na superfície, e contribui para que o mesmo não ultrapasse o limite residual de 0,1 mg/L (ANDRADE; MACEDO, 1996).

De acordo com Cordis (1983) citado por Zottola e Sasahara (1994), as substâncias à base de iodo possuem alguma capacidade penetrante, pois são normalmente uma combinação de iodo elementar com os agentes molhantes e tampão a um pH baixo, mas não possui o efeito de detergência completo. Já os compostos a base de quaternário de amônia podem apresentar muitas configurações e normalmente se apresentam em combinação com um agente molhante, dessa forma possuem alguma habilidade penetrante. Os sanitizantes ácidos são compostos de vários ingredientes diferentes, como ácido (usado para baixar o pH), surfactantes aniônicos (que possuem agente antimicrobiano ativo), surfactantes não iônicos (com a capacidade redutora de espuma), que podem comprometer o poder de detergência.

Portanto, se a sujeira não for retirada, o sanitizante perde sua eficácia para as bactérias enclausuradas ou que estão em contato com a sujeira. Os microorganismos aderidos à superfície podem se tornar um perigo em potencial e contaminar o produto. A sanitização das superfícies em contato com o produto é um método indicado para prevenir a contaminação. Infelizmente, há fortes evidências que as práticas de sanitização atuais são menos efetivas para microorganismos fixos comparados aos microorganismos de vida livre. Dessa maneira, os procedimentos de sanitização devem ser aplicados diariamente nas indústrias e objetivar sempre a produção de um alimento seguro com nível aceitável de qualidade, pois, se algum procedimento não for eficaz,



poderá ocorrer a perda do produto (HOOD; ZOTTOLA, 1995; MOSTELLER; BISHOP, 1993; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Verifica-se que existem vários tipos de microorganismos capazes de originar o biofilme. Apesar da extensa literatura referente à presença de biofilmes na indústria de processamento de alimentos e de microalgas em águas, observa-se uma escassez de estudos no que tange a problemática de microalgas que comprometem a estética da água engarrafada, como também de estudos que sugiram alternativas práticas para a eliminação destas microalgas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação de diferentes algicidas sobre a inibição do crescimento de microalgas em águas engarrafadas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Identificar os tipos de microalgas presentes em águas engarrafadas em Pernambuco.

Estabelecer tipos, concentrações e tempo de contato de algicidas para a eliminação de microalgas presentes em águas engarrafadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

As amostras foram constituídas de embalagens com águas que apresentaram sinais de alteração pelo desenvolvimento de microalgas, procedentes de duas empresas engarrafadoras localizadas em áreas geográficas distintas: Agreste e Litoral de Pernambuco. Foram utilizados 2 diferentes tipos de embalagens: polipropileno (PP) de 20L e tereftalado de polietileno (PET) de 5L.

O universo da amostra foi constituído por 40 unidades de cada tipo de recipiente, totalizando 80 embalagens.



Ilustração 1. Embalagem de água (5L) com sinais de desenvolvimento de microalgas.

## 4.2 Local da realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Experimentação em Análise de Alimentos (LEAAL), do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

## 4.3 Métodos

A metodologia realizada pelo experimento foi composta das seguintes etapas:

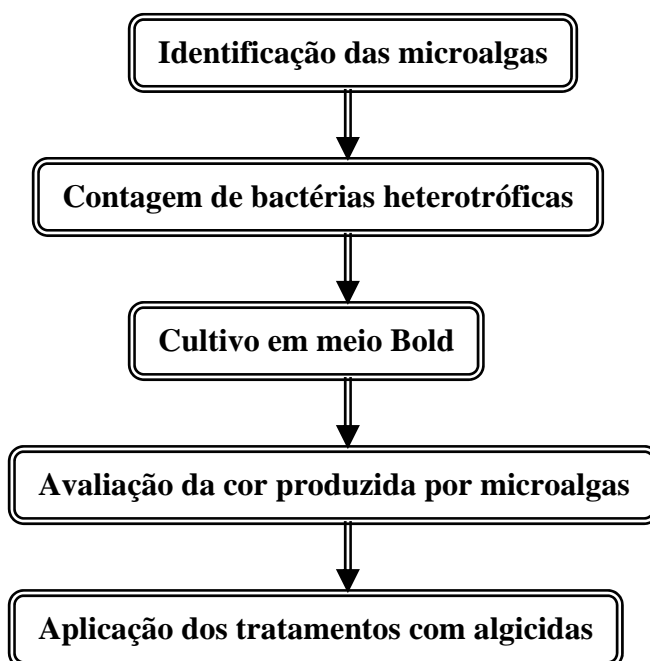


Ilustração 2. Fluxograma da metodologia realizada.

### 4.3.1 Identificação de microalgas

Os recipientes visivelmente contaminados por microalgas foram esvaziados, desprezando-se a água. A microalga foi removida para identificação a fresco em microscópio binocular com objetiva 100x1000, utilizando lâmina e lamínula. Os procedimentos para a remoção das microalgas variaram de acordo com o tipo de recipiente da seguinte forma:

- Para recipientes de 20L, polipropileno:

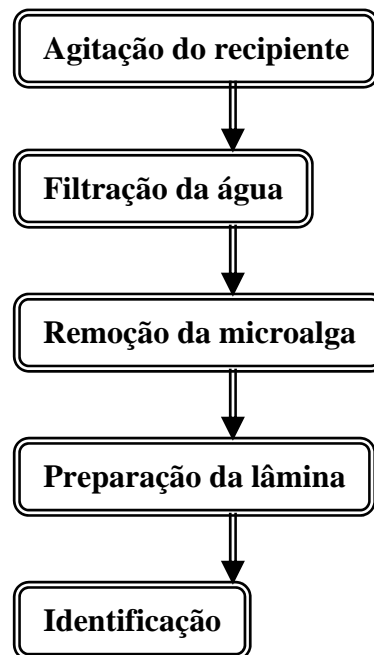


Ilustração 3. Fluxograma para identificação das microalgas em recipientes de 20L.

- Para recipientes de 5L, tereftalado de polietileno:

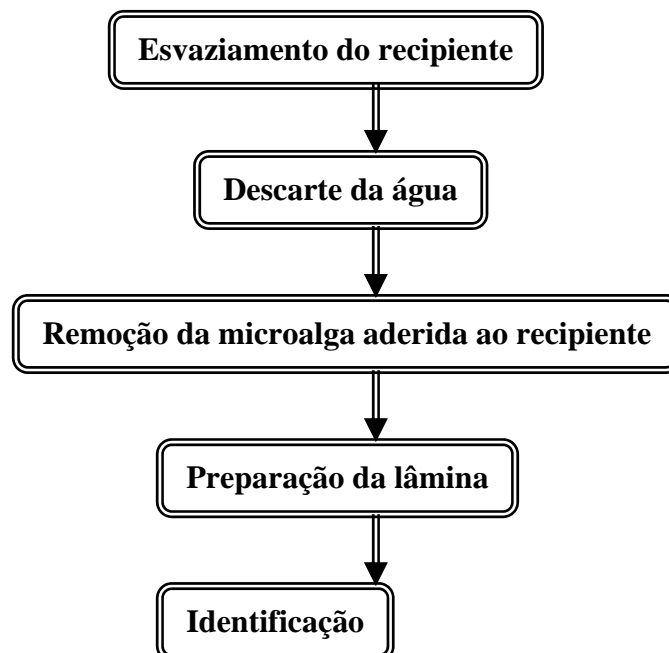


Ilustração 4. Fluxograma para identificação das microalgas em recipientes de 5L.

Após a preparação das lâminas, as microalgas foram identificadas quanto as suas características morfológicas utilizando-se as chaves taxonômicas preconizadas por Bicudo e Bicudo (1970), Joly (1963), Smith (1950) e textos especializados para identificação até seu gênero (DESIKACHARY 1959, NECCHI e SANT'ANNA 1986 e SMITH 1950).

#### **4.3.2 Contagem de bactérias heterotróficas e avaliação da cor produzida por microalgas.**

Após a identificação das microalgas, realizou-se a análise da contagem de bactérias heterotróficas de acordo com a metodologia sugerida pela AOAC n° 990.12 (AOAC, 2002), utilizando placas Petrifilm AC-3M, para contagem de aeróbios. Os resultados obtidos na contagem de bactérias heterotróficas foram correlacionados com os da avaliação de cor produzida pelas microalgas.

#### **4.3.3 Cultivo de microalgas**

Os recipientes, visivelmente contaminados por microalgas, foram cultivados meio Bold e após o crescimento, os recipientes foram submetidos a uma avaliação visual (ABNT, 2001), classificando-os como: (0) não visualizado crescimento a olho nu (1) verde claro, (2) verde uniforme e (3) verde intenso uniforme.

##### **4.3.3.1 Inoculação**

A água e o meio Bold foram misturados e mantidos em repouso, em temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), até a visualização do ápice do crescimento algal, que ocorreu em média com 40 dias.

#### 4.3.3.2 Preparação das amostras

As microalgas contidas nos vasilhames foram cultivadas em meio Bold (TOMPKINS et al., 1995) como demonstrada na ilustração 5.



Ilustração 5. Cultivo de microalgas em meio Bold (A= água em meio Bold, B= água sem meio Bold).

Esta etapa possibilitou a recuperação da microalga que se encontrava possivelmente injuriada.

De cada recipiente foi desprezada uma porção correspondente a 320mL de água no recipiente de 5L e 1250mL no recipiente de 20L. Ao restante da água foi adicionada quantidades das soluções, estoque-1 e 2, suficientes para formular o meio Bold como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Alíquotas desprezadas e volumes utilizados para composição do meio Bold.

Grupo	Nº de amostras	Alíquota desprezada	Solução estoque-1	Solução estoque-2
5L	40	320mL	50mL	5mL
20L	40	1250mL	195mL	19,5mL

O meio Bold foi composto 2 soluções estoques com os seguintes reagentes:

6 soluções estoque 1, sendo que cada uma contendo um dos seguintes sais:

Tabela 2. Composição da solução estoque –1

Soluções Estoque 1	Quantidade P/1L
1-) NaNO <sub>3</sub>	25g
2-) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,88g
3-) Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5g
4-) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5g
5-) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5g
6-) NaCl	2,5g

Tabela 3. Composição da solução estoque-2

Soluções Estoque 2	Quantidade P/1L
1-) EDTA e KOH	50g e 31g
2-) FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O acidificado em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,98g e 1mLH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluir em 999mL de água destilada
3-) H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	11,42g
4-) <i>Em água acidificada adicionar:</i>	1mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluir em 999mL de água destilada +
ZnSO <sub>4</sub>	8,82g
MoO <sub>3</sub>	0,71g
CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49g
MnCl <sub>2</sub>	1,44g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57g

#### 4.3.4 Verificação da eficácia de algicidas

Após o período de armazenamento (40dias) foram aplicados diferentes tratamentos para higienização dos recipientes, os quais avaliaram a ação abrasiva de brita com diferentes soluções algicidas em concentrações recomendadas pelos fabricantes: Quaternário de Amônia (1% e 2%); Ácido Peracético (0,05% e 0,15%) e Detergente Alcalino Clorado (5%).



Conforme demonstradas na ilustração 6, as 40 amostras foram distribuídas em seis tratamentos distintos. Com cada algicida foram aplicados cinco tratamentos. Em paralelo foi utilizado um grupo controle onde foi utilizado um tratamento mecânico apenas com brita e água.

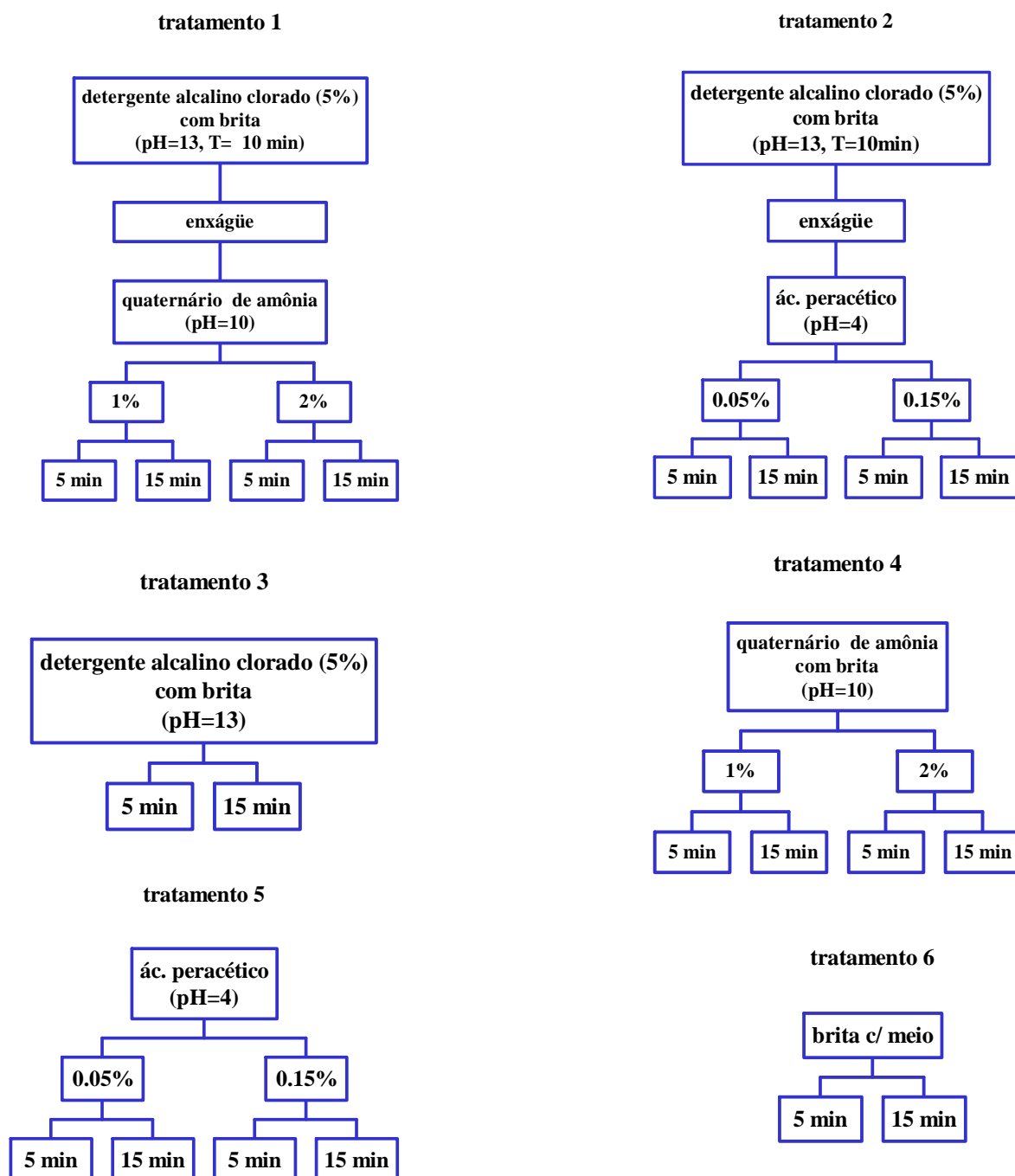


Ilustração 6. Distribuição dos tratamentos utilizados nos dois grupos de 40 amostras (5L e 20L).

Os recipientes foram colocados em um equipamento rotatório adaptado de um moinho de bola por dois tempos distintos (5min e 15min) de acordo com as ilustrações 7 e 8.



Ilustração 7. Equipamento rotatório adaptado para garrações de 20L.



Ilustração 8. Equipamento rotatório adaptado para garrações de 5L.

Em seguida os garrações foram esvaziados e submetidos a enxágües sucessivos em água potável corrente. Para a verificação da completa eliminação do

algicida, foi realizado o teste de pH na água do último enxágüe. Considerou-se satisfatório o enxágüe cujo pH correspondia ao pH da água utilizada no enxágüe ( $\text{pH}=6.0 \pm 0.5$ ).

Após os tratamentos, os recipientes foram preenchidos com o meio Bold e novamente mantidos em repouso, em temperatura ambiente, sob iluminação natural, protegida da incidência da luz direta por 40 dias, quando foram inspecionados quanto ao desenvolvimento das microalgas. Consideraram-se eficazes os tratamentos com algicidas cujos recipientes, por eles tratados, não apresentaram alteração com crescimento de microalgas.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamentos estatísticos através do Software Statistica 6.0, módulo “Multivariate Exploratory Techniques” para “Correspondence Analysis and Cluster” (STATSOFT, 2002).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como observou Moraes (1991), existem poucos estudos sobre a microbiologia de águas engarrafadas apesar da sua importância econômica e de saúde pública. A grande dificuldade do experimento referiu-se a escassez de estudos sobre microalgas em águas engarrafadas, de origem subterrânea. A maioria dos estudos relacionada as algas é referente a águas superficiais tidas pela sua maior prevalência.

### **6.1 Identificação das microalgas**

No estudo, evidenciou-se o início do desenvolvimento das microalgas em meio Bold a partir do quarto dia de inoculação.

De acordo com os estudos brasileiros realizados por Machado; Lopez (1998) e Lopez (1991) ocorrem diferentes tipos de microalgas formadoras de biofilmes em águas superficiais, tais estudos identificaram 46 e 43 espécies de microalgas distintas, respectivamente. Para águas subterrâneas, Branco (1986) refere que tais águas quase não possuem microorganismos e que a ausência de luz impossibilita a presença de microalgas ou outros seres fotosintetizantes. Estudos mais recentes demonstraram que as águas profundas, apesar da pouca quantidade de nutrientes não estão isentas de microorganismos, ou seja, apresentam uma população microbiana própria que não decorre, aparentemente, da contaminação com águas superficiais. No experimento realizado, observou-se que as algas em forma de cistos podem estar presentes em águas de origem profunda, porém seu desenvolvimento é evidenciado quando ocorre o

contato com nutrientes e luz, provocando a alteração de cor e turbidez da água (MORAIS, 1991; PIRES, 2002).

Na tabela 4, estão demonstradas as classificações das microalgas identificadas em embalagens de 5L e 20L, respectivamente:

Tabela 4. Classificação taxonômica de microalgas em águas engarrafadas

Chave taxonômica	Amostra (5L)	Amostra (20L)
DIVISÃO	CYANOPHYTA Smith	CYANOPHYTA Smith
CLASSE	CYANOPHYCEAE Sachs	CYANOPHYCEAE Sachs
ORDEM	CHAMAESIPHONALES Wettstein	CHROOCOCCALES Wettstein
FAMÍLIA	DERMOCARPACEAE Geitler	CHROOCOCCACEAE Nägeli
GÊNERO	<i>Stichosiphon</i>	<i>Microcystis</i> Kützing
ESPÉCIE	-	<i>Microcystis robusta</i> Chark Nygaard

Diante dos resultados, verifica-se que a microalga encontrada na amostra de 5L (*Stichosiphon*), pertencente ao grupo de microalgas verde-azuladas, pouco estudadas e portanto com informações escassas na literatura. Entretanto é conhecido que tal gênero habita águas doces, são solitárias, com endósporo e epífitas – apresentando-se aderida por meio de um “pé” ou apressório mucilaginoso (DESIKACHARY, 1959; NECCHI; SANT’ANNA, 1986; SMITH, 1955). Tais microalgas não estão incluídas entre aquelas que causam complicações à saúde pública.

Nas ilustrações 9 e 10, pode-se visualizar as microalgas identificadas no experimento em embalagens de 5L e 20L.

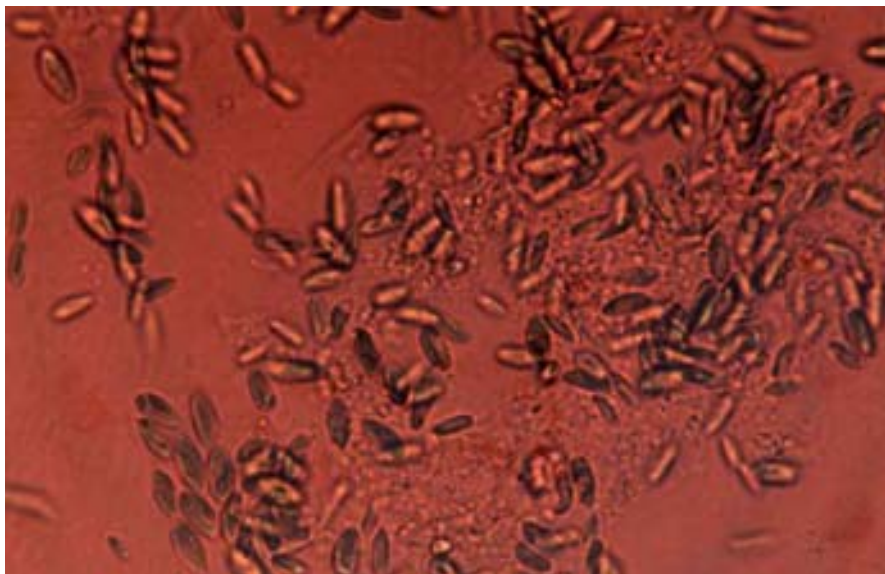


Ilustração 9. Célula da microalga *Stichosiphon* isolada de recipiente de água de tereftalato de polietileno (PET) 5L.

A microalga identificada nas embalagens de 20L (*Microcystis robusta*) é semelhante àquela encontrada nas amostras de 5L no que se refere à divisão e a classe taxonômica. As diferenças entre elas foram constatadas a partir do estreitamento da chave taxonômica. Para estas amostras foi necessário realizar a sua identificação até a espécie, uma vez que neste gênero estão incluídas espécies capazes de produzir compostos tóxicos (BRANCO, 1986; MOLICA, 2004). Segundo Chorus, Bartram (1999) e Halegraeff et al. (1995) citado por Schmitt, Proença (2000) entre aproximadamente 5000 espécies de microalgas conhecidas, cerca de 300 formam florações e 40 delas são potencialmente tóxicas capazes de provocar a morte humana e de peixes por sufocação ou envenenamento. Embora existam muitos estudos sobre a ecologia e distribuição do fitoplâncton, pouco se sabe sobre a toxicidade de microrganismos isolados a partir de amostras de água engarrafada no Brasil.

A microalga, identificada na amostra de 20L, é verde azulada, de forma arredondada ou alongada, colonial, planctônica encontrada em águas paradas (BICUDO; BICUDO, 1970; DESYKASHARY,1959). Sobre a *Microcystis robusta*, a literatura não refere toxicidade e/ou risco para a saúde pública não estando incluída entre as espécies tóxicas referidas na literatura.

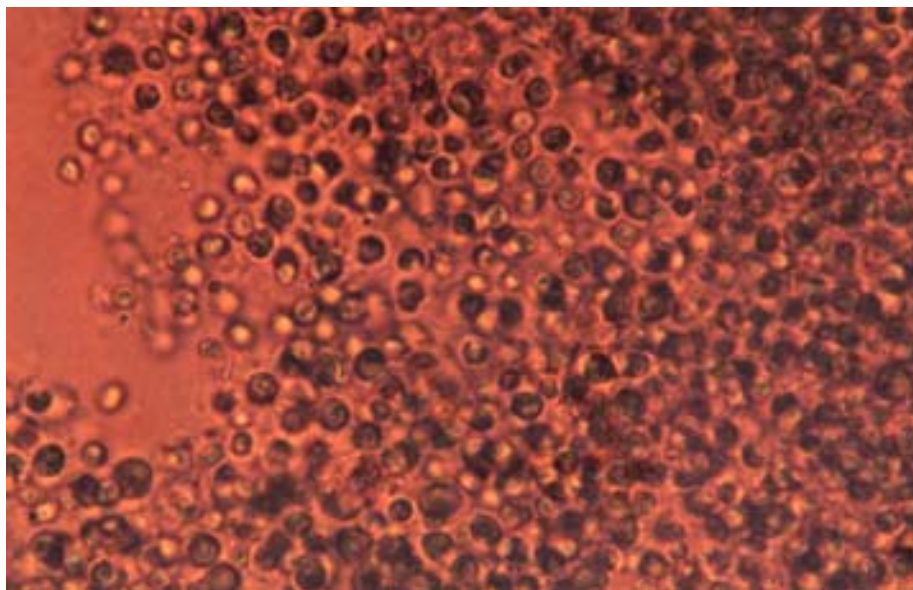


Ilustração 10. Célula da microalga *Microcystis robusta* isolada de recipiente de água, de polipropileno (PP) 20L.

## 6.2 Resultados da análise da contagem de bactérias heterotróficas e coloração verde produzida por microalgas

Nas tabelas 5 e 6, observam-se os resultados obtidos da análise de contagem de bactérias heterotróficas da água engarrafada antes do cultivo em meio Bold e a classificação visual do nível de contaminação por microalgas.

Tabela 5. Resultados da contagem de bactérias heterotróficas e coloração verde produzida por microalgas em amostras de 5L.

Amostra (5L)	Nº de heterotróficos (UFC/mL)	Nível de contaminação por microalgas*
01	1,3 X 10 <sup>2</sup>	3
02	< 1,0	3
03	1,4 X 10	3
04	1,5 X 10	3
05	3,2 X 10	2
06	2	2
07	2,8 X 10	2
08	3,4 X 10	2
09	3	3
10	1,9 X 10 <sup>2</sup>	2
11	0	1
12	2	3
13	3	3
14	2,1 X 10 <sup>2</sup>	3
15	1,6 X 10	2
16	1	1
17	1,2 X 10	1
18	< 1,0	3
19	7	3
20	5,4 X 10	2
21	1	2
22	7,6 X 10 <sup>2</sup>	1
23	3 X 10	1
24	7,7 X 10	1
25	5,8 X 10 <sup>2</sup>	2
26	1,5 X 10	1
27	10 <sup>2</sup>	1
28	1	2
29	2,1 X 10	1
30	2	1
31	1,4 X 10	1
32	5	1
33	2,9 X 10	2
34	0	1

\*(0) Não visualizado crescimento a olho nu, (1) Verde claro, (2) Verde uniforme e (3) Verde intenso uniforme.



Tabela 6. Resultados da contagem de bactérias heterotróficas e coloração verde produzida por microalgas em amostras de 20L.

Amostra (20L)	nº de heterotróficos (UFC/mL)	nível de contaminação por microalgas*
35	$> 2,5 \times 10^2$	2
36	$> 2,5 \times 10^2$	2
37	$> 2,5 \times 10^2$	0
38	$> 2,5 \times 10^2$	1
39	$> 2,5 \times 10^2$	2
40	$> 2,5 \times 10^2$	0
41	$> 2,5 \times 10^3$	2
42	$1,0 \times 10^3$	2
43	$3 \times 10^2$	1
44	$2,5 \times 10^2$	2
45	$9,5 \times 10^2$	1
46	$1,3 \times 10^3$	2
47	$7,5 \times 10^2$	2
48	$6,9 \times 10^2$	1
49	$1,0 \times 10^3$	0
50	$5,8 \times 10^2$	0
51	$3,2 \times 10^2$	1
52	$2,6 \times 10^2$	0
53	$5,7 \times 10^2$	2
54	$2,1 \times 10^2$	1
55	$3 \times 10^2$	0
56	$1,6 \times 10^2$	1
57	$2,8 \times 10^2$	1
58	$1,3 \times 10^2$	2
59	$1,0 \times 10^3$	2
60	$43 \times 10^2$	2
61	$7 \times 10^2$	2
62	$5,2 \times 10^3$	1
63	$1,7 \times 10^3$	3
64	$2,5 \times 10^2$	3
65	$1,58 \times 10^2$	3
66	$2,5 \times 10^2$	3
67	$2,5 \times 10^2$	2
68	$1,3 \times 10^3$	3
69	$1,2 \times 10^2$	3

\*(0) Não visualizado crescimento a olho nu, (1) Verde claro, (2) Verde uniforme e (3) Verde intenso uniforme.

Observa-se que a maioria das microalgas visualizadas nas amostras de 5L encontraram-se na classificação 1. Enquanto que, nas amostras de 20L, encontraram-se na classificação 2.

Verifica-se que os dados absolutos obtidos da contagem de bactérias heterotróficas encontradas são bem diversificados por unidade de amostra,

possibilitando destacar que cada amostra possui um comportamento particular de desenvolvimento.

A origem das bactérias presentes no aquífero continua incerta; no entanto não se parece possível que sejam bactérias provenientes da superfície para o aquífero, uma vez que os tipos coloniais predominantes na superfície são diferentes dos encontrados no subsolo. Nas águas engarrafadas, apresentadas em sistema fechado de volume pequeno, as condições para o crescimento microbiano mudam drasticamente, uma vez que os microorganismos presentes interagem metabólica e fisiologicamente entre si, podendo conseqüentemente sobreviver, proliferar ou morrer (MORAIS, 1991).

Assim, pode-se evidenciar que no experimento os dados da contagem de bactérias heterotróficas se apresentam discrepantes inviabilizando o cálculo de média, o que reforça o comportamento particular de cada amostra.

### **6.3 Análise estatística da contagem de heterotróficos em águas com microalgas**

O engarrafamento pode ser responsável pela contaminação das águas engarrafadas por bactérias alóctones à sua flora autóctone, podendo essas bactérias ter origem no recipiente, no ambiente ou serem introduzidas durante o processo de envase (MORAIS, 1991).

Nas ilustrações 11 e 12, verificou-se não haver correlação entre o número de heterotróficos autóctones e a intensidade de cor verde produzida nos recipientes, permitindo inferir que a concentração de heterotróficos não interferiu no desenvolvimento das microalgas.

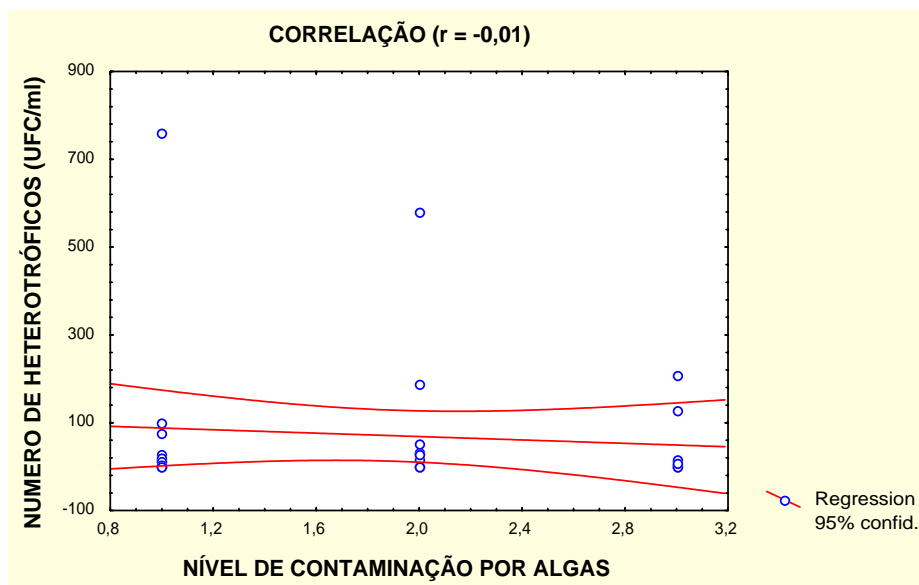


Ilustração 11. Número de heterotróficos x nível de contaminação por microalgas em amostras de 5L.

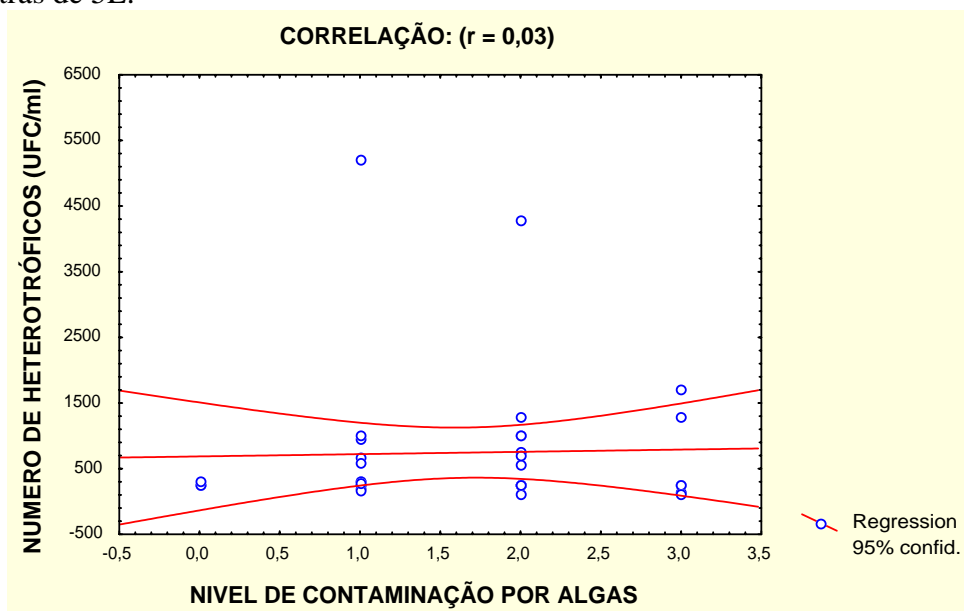


Ilustração 12. Número de heterotróficos x nível de contaminação por microalgas em amostras de 20L.

O processo de envase de águas subterrâneas envolve uma seqüência de operações que devem ser rigorosamente controladas a fim de manter as características naturais da água (MORAIS, 1991). No Brasil observa-se a escassez de estudos sobre a microbiota de águas engarrafadas. A maior parte da literatura encontrada refere-se as águas subterrâneas de origem européia, sendo evidenciado que cada água possui uma característica própria, podendo apresentar um comportamento variado. Assim, o

estímulo aos estudos brasileiros seria de grande contribuição para o conhecimento mais detalhado sobre a microbiota presente nas águas de origem subterrânea engarrafadas no Brasil.

#### 6.4 Comportamento das microalgas após aplicação de algicidas

Na tabela 7 e 8, estão apresentados os resultados do desenvolvimento das microalgas nos recipientes submetidos a diferentes tratamentos.

Tabela 7. Comportamento das microalgas (*Stichosiphon*) após aplicação de algicidas em amostras de 5L.

Tratamentos	Nº de recipientes tratados	Nº de amostras com crescimento
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 1% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 1% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 2% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 2% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.05% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.05% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.15% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.15% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita (5min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita (15min)	2	0
Q. Amônia 1% com brita (5min)	2	0
Q. Amônia 1% com brita (15min)	2	1
Q. Amônia 2% com brita (5min)	2	0
Q. Amônia 2% com brita (15min)	2	0
Ác.Peracético 0.05% com brita (5 min)	2	1
Ác.Peracético 0.05% com brita (15 min)	2	1
Ác.Peracético 0.15% com brita (5 min)	2	1
Ác.Peracético 0.15% com brita (15 min)	2	1
Brita com meio bold (5 min)	2	2
Brita com meio bold (15 min)	2	2
Total de amostras	40	

Observa-se na tabela 7 que o ácido peracético não foi eficaz para o controle do desenvolvimento de microalgas, o que pode ser justificado, segundo Macedo (2000), por sua baixa estabilidade. Apresentando-se como um ácido fraco, enquanto que os outros produtos são bases fortes. O tratamento do recipiente com o quaternário de amônia apesar de ter apresentado crescimento em apenas uma das amostras estudada

pode ser considerado eficaz, pois em concentração semelhante e menor tempo de contato (5min) não foi observado o crescimento de tais microalgas.

Este comportamento pode ser atribuído à interferência de outros fatores, tais como características inerentes à própria microalga e ao desenho do recipiente que por si só desfavorece a remoção completa do biofilme. A Norma nº14222/1998 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 1998) recomenda que o desenho do recipiente evite a presença de saliências na superfície interna que possam dificultar a higienização, remoção de contaminantes ou favorecer a incrustação das sujidades.

Verifica-se ainda que o tratamento que utilizou exclusivamente a ação mecânica foi insuficiente para atingir na matriz do glicocálix, desta forma impossibilitando a remoção completa do biofilme formado pelas microalgas.

Tabela 8. Comportamento das microalgas (*Microcystis robusta*) após aplicação de algicidas em amostras de 20L.

Tratamentos	Nº de recipientes tratados	Nº de amostras com crescimento
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 1% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 1% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 2% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Q. Amônia 2% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.05% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.05% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.15% (5 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita + Ác.Peracético 0.15% (15 min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita (5min)	2	0
Detergente A. Clorado a 5% com brita (15min)	2	0
Q. Amônia 1% com brita (15min)	2	0
Q. Amônia 2% com brita (5min)	2	0
Q. Amônia 2% com brita (15min)	2	0
Ác.Peracético 0.05% com brita (5 min)	2	0
Ác.Peracético 0.05% com brita (15 min)	2	0
Ác.Peracético 0.15% com brita (5 min)	2	0
Ác.Peracético 0.15% com brita (15 min)	2	0
Brita com meio bold (5 min)	2	2
Brita com meio bold (15 min)	2	2
Total de amostras	40	

Na tabela 8 observa-se que o comportamento da microalga *Microcystis robusta* frente aos tratamentos químicos utilizados, reforça as citações de Lomander et al. (2004) e Boe-Hansen (2002) quando afirmam que os microorganismos que não estão associados ao biofilme são mais susceptíveis. De acordo com Boe-hansen (2002), as diferenças metabólicas ocorrem entre os microorganismos que vivem aderidos e livres na água, o que torna relevante os estudos nos dois habitats. No presente estudo, a resposta de cada microalga registrada nos dois habitats é também diferenciada; já que se observou uma maior ação do sanitizante nas formas de hábito planctônico (*Microcystis robusta*), demonstrando que ocorreu menor resistência ao tratamento químico na espécie planctônica do que na espécie formadora de biofilme (*Stichosiphon*).

### 6.5 Análise estatística da aplicação dos algicidas

Nas ilustrações 13 e 14, podem ser observados os comportamentos das microalgas estudadas através dos diversos tratamentos químicos e mecânicos.

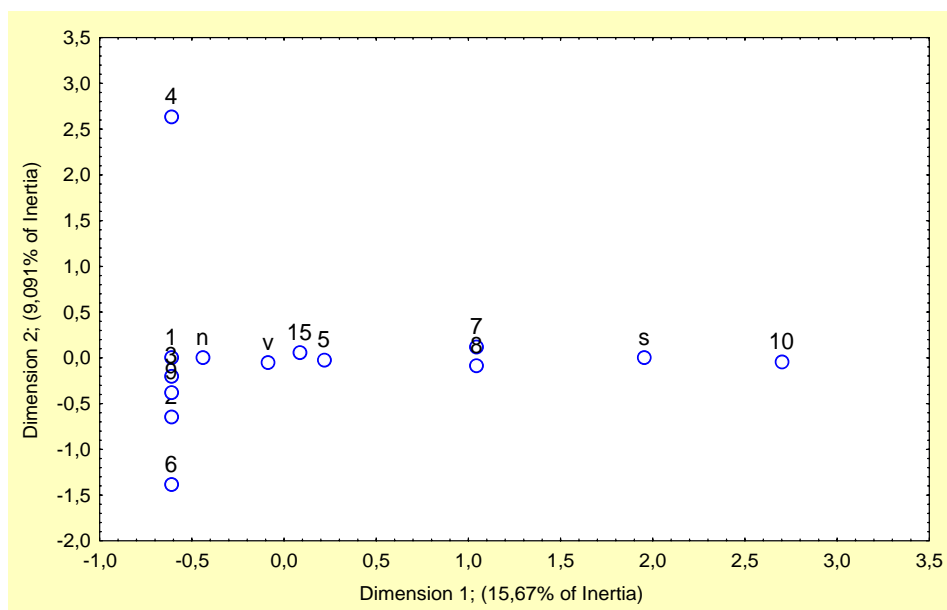


Ilustração 13. Análise multivariada de correspondência múltipla para o comportamento em microalgas (*Stichosiphon*) para amostras de 5L.

Variáveis: (1) Detergente alcalino clorado 5% com brita + Quat. Amônia 1%,  
(2) Detergente alc. Clorado 5% com brita + Quat. Amônia 2%,  
(3) Detergente alc. Clorado 5% com brita + Ác. Perac. 0.05%,  
(4) Detergente alc. Clorado 5% com brita + Ác. Perac. 0.15%,  
(5) Quat. Amônia 1% com brita,  
(6) Quat. Amônia 2% com brita,  
(7) Ác. Perac. 0.05% com brita,  
(8) Ác. Perac. 0.15% com brita,  
(9) Detergente alc. Clorado 5% com brita  
(10) Brita com água,  
(v) tempo de 5min, (15) tempo de 15min, (s) crescimento de microalgas e (n) não crescimento de microalgas.

Os biofilmes são formados, de acordo com Zottola e Sasahara (1994), por um ataque de células aderidas de modo irreversível, e segundo Hood e Zotolla (1997), um fator que justifica a aderência do biofilme à superfície é o ambiente com baixas condições de nutrientes que provoca mudanças nas características das células que se associam em busca de nutrientes o que reflete na aproximação das mesmas e fixação às superfícies.

Maior atenção deve ser dada a estas formas pois são de mais fácil ocorrência nas águas de melhor qualidade ou com baixos níveis de contaminação e nutrientes, como é o caso das águas estudadas. A máxima adesão das células ocorre em substratos altamente carregados, como o vidro. Em substratos menos carregados como no poliestireno (termoplástico) a adesão é menor (DEXTER, 1975 apud ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Nas culturas microbianas, a hidrofobicidade depende do tipo do substrato e do meio de cultura usado para os microorganismos, logo a escolha do plástico para acondicionamento das águas engarrafadas em detrimento do vidro, utilizado no passado, já foi um passo importante para diminuir a adesão destas microalgas. Dada a observação de que a condição encontrada da água engarrafada é naturalmente propícia à formação de biofilme microbiano.

Kjelleberg; Hermansson (1984) afirmam que os baixos níveis de nutrientes induzem ao aumento da hidrofobicidade na superfície da célula, propiciando maior

número de adesões irreversíveis. Esta afirmativa é válida para o sistema em questão: recipientes fechados, sem qualquer sistema de circulação e com baixa concentração de nutrientes. Para sistemas com fluxo ou abertos, vários autores como Wolffaardt; Cloete (1992), Sasahara; Zottola (1993) observaram um comportamento diferente na formação do biofilme.

No experimento realizado devido ao enclausuramento da água e o aparecimento apenas de uma espécie de *Stigosiphon* e o não aparecimento de outra espécie com mesma densidade co-existindo, é muito provável que a limitação de nutrientes cause a “inanição” de outras espécies nas águas estudadas, sendo porém, um fator estimulante à formação dos biofilmes de *Stigosiphon* nestas embalagens, por esta espécie ser capaz de se adaptar a esta condição.

A aplicação de uma análise multivariada de correspondência múltipla para identificar possíveis associações significativas (PIGGOTT, 1986) possibilitou corroborar com a afirmativa de Andrade e Macedo (1996), Hood e Zottola (1997), Mosteller e Bishop (1993), Morais (1991) e Zotolla (1994) quando referem que as superfícies podem abrigar os microorganismos firmemente aderidos, dificultando assim, a sua remoção.

Andrade e Macedo (1996) sugerem que para o controle e prevenção de biofilmes microbianos é necessária a remoção de resíduos. Diante de tal afirmativa, pode-se observar, na ilustração 13, que a utilização do detergente alcalino clorado associado ao emprego da ação mecânica abrasiva da brita, antes da aplicação do agente químico sanitizante, representou a alternativa mais eficaz. Dessa forma, dentre os



tratamentos utilizados o que demonstrou melhores resultados foi o que associou o uso da ação mecânica com detergente alcalino clorado seguido da sanitização química com quaternário de amônia e ácido peracético. Tal resultado deve-se a capacidade do detergente solubilizar a matéria orgânica aderida ao biofilme e a sua ação ser potencializada pelo poder mecânico provocado pela brita na quebra da camada superficial do biofilme que favorecerá a ação sanitizante. Pois, de acordo com Lomander et al. (2004), se a matriz do biofilme não for completamente removida, durante a sanitização química, as células remanescentes podem aderir novamente à superfície e favorecer o início da formação de um novo biofilme.

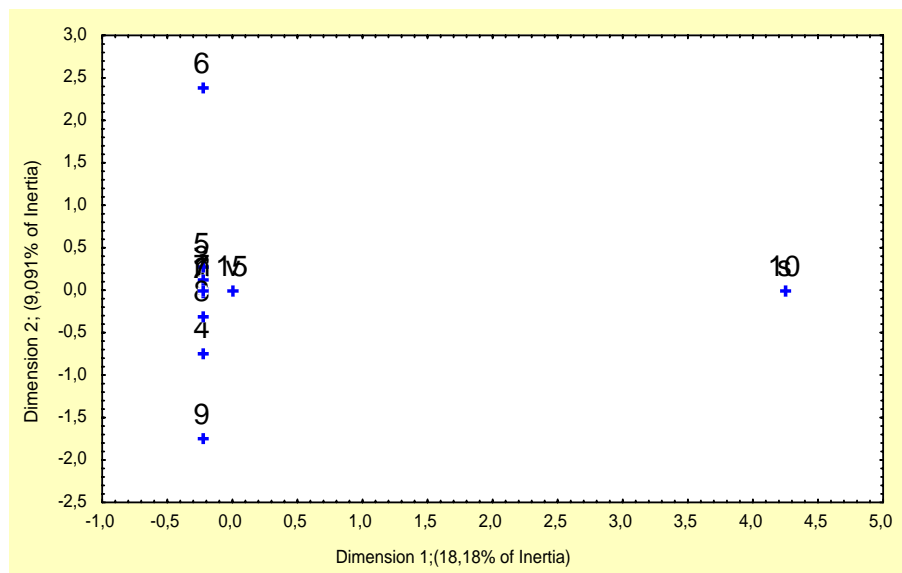


Ilustração 14. Análise multivariada de correspondência múltipla para o comportamento das microalgas (*Microcystis robusta*) para amostras de 20L.

Variáveis: (1) Detergente alcalino clorado 5% com brita + Quat. Amônia 1%,  
 (2) Detergente alc. Clorado 5% com brita+ Quat. Amônia 2%,  
 (3) Detergente alc. Clorado 5% com brita+ Ác. Perac. 0.05%,  
 (4) Detergente alc. Clorado 5% com brita + Ác. Perac. 0.15%,  
 (5) Quat. Amônia 1% com brita,  
 (6) Quat. Amônia 2% com brita,  
 (7) Ác. Perac. 0.05% com brita,  
 (8) Ác. Perac. 0.15% com brita,  
 (9) Detergente alc. Clorado 5% com brita  
 (10) Brita com água,  
 (v) tempo de 5min, (15) tempo de 15min, (s) crescimento de microalgas e (n) não crescimento de microalgas.

Na ilustração 14, observa-se a eficiência dos tratamentos, não sendo evidenciado o crescimento da microalga nas amostras de 20L após a aplicação dos algicidas, demonstrando que apesar de pertencerem ao mesmo grupo das microalgas verde-azuladas, a *Microcystis robusta* possui outras características morfológicas, fisiológicas e hábitos.

Segundo Pires (2002), o fato dos microorganismos responderem de modo levemente diferente às condições de temperatura, de exposição à luz solar e de aeração pode estar relacionado às condições de normalidade ou de injúria em que eles se encontram no início do processo de crescimento.

A menor resistência aos tratamentos químicos, deve-se ao fato dessas microalgas, sem apresório mucilaginoso, apresentarem-se pouco associadas à formação da matriz envolvente (glicocálix) comum às espécies aderidas, mesmo possuindo mucilagem envolvente. Ademais, sua presença em solução atuou favorecendo a ação do algicida (NECCHI; SANT'ANNA, 1986; SMITH, 1955; DESIKACHARY, 1959).

Outro fator que pode ter interferido no resultado diz respeito ao desenho e material utilizado na fabricação do recipiente (BRASIL, 1998; BRASIL, 1999), pois, de acordo com Pires (2002), as alterações drásticas do comportamento da microbiota, quando observadas em águas engarrafadas, podem ser associadas à presença de impurezas nas embalagens. Esta observação torna lícita a hipótese de que quando uma água, previamente aprovada quanto à qualidade microbiológica, for acondicionada em embalagem rigorosamente limpa, sem resíduos de matéria orgânica de qualquer natureza, apresentará curva normal de crescimento da microbiota, de forma que não

comprometerá a qualidade do produto estocado. Essa afirmativa constitui uma importante contribuição para as indústrias engarrafadoras na decisão para a escolha da embalagem que deverá ser utilizada para diferentes tipos de águas.

Não foi constatada influência nos tempos utilizados (5 e 15 minutos) sobre os diversos tratamentos, não estando portanto esclarecido qual o menor tempo necessário para o contato dos produtos químicos com a microalga desenvolvida no recipiente. Tal observação estimula o desenvolvimento de outros estudos, sendo de grande interesse para os engarrafadores por contribuir com a redução do tempo e da mão de obra utilizada no processo.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e nas condições em que foi realizada a pesquisa pode-se concluir que:

- as microalgas *Stichosiphon* e *Microcystis robusta* podem estar presentes e comprometer as características da água engarrafada;
- não foi constatada a presença de microalgas produtoras de toxinas nas amostras estudadas;
- a microalga *Microcystis robusta* foi mais sensível à ação dos tratamentos realizados;
- não há correlação entre o número de bactérias heterotróficas presentes nas águas de origem profunda e a intensidade de cor verde produzida por microalgas;
- o desenho e o tipo de material utilizado na fabricação das embalagens influenciou no comportamento das microalgas;
- o uso de apenas ação mecânica não é suficiente para eliminar os biofilmes formados por microalgas em recipientes de águas;
- a associação de dois tratamentos: mecânico e químico na limpeza dos recipientes demonstrou ser mais eficiente, portanto a mais indicada;
- as características morfológicas, fisiológicas e o hábito de cada microalga influenciaram na ação dos sanitizantes químicos;

- dentre os agentes químicos utilizados, os mais eficazes foram os que associaram a utilização do detergente alcalino clorado ao quaternário de amônia e ácido peracético.
- O tempo de 5 minutos de contato do algicida com a microalga foi suficiente para inibição do crescimento.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo dessa pesquisa permite concordar que as bactérias aderidas em superfícies apresentam um problema sério nas indústrias engarrafadoras, uma vez que tais microorganismos podem crescer e se multiplicar continuamente no interior do biofilme até que ocorra a sua liberação no ambiente, ocasionando prejuízos de ordem estética em recipientes de água. Como efeito, a contaminação dos produtos onera o setor e sua presença não deve ser negligenciada. Dessa forma, tal trabalho concorda ainda com a afirmativa dos autores Mosteller e Bishop (1993) e Hood e Zottola (1997) no que tange à prevenção como a chave para desencorajar a formação do biofilme. A limpeza mecânica e a aplicação da sanitização mais adequada demonstraram ser o melhor modo de prevenção contra microorganismos aderentes e células livres, pois se constatou, na literatura e no experimento realizado, que uma vez que o biofilme se encontra firmemente estabilizado a limpeza e a sanitização se torna mais difícil.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 14637: embalagem plástica para água mineral e de mesa – garrafão retornável – Requisitos para lavagem, enchimento e fechamento.** Rio de Janeiro, 2001. 05p

\_\_\_\_\_. **NBR 14222: embalagem plástica para água mineral e de mesa – garrafão retornável – Requisitos e métodos de ensaio.**, out, p.1-6, 1998.

ÁGUA: insípida, inodora e incolor. **A granja**. v. 47, n.520, p.14-21, nov., 1991.

AGUETE, E.C. et al. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR, and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. **Talanta**, n.59, p.697-705, 2003.

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1996, 182p.

ANJOS, C. **A Qualidade das Pré-Formas de PET para garrafas de Águas Minerais.** Disponível em: <[www.bahiapet.com.br/Imprensa/Artigobahiapet.doc](http://www.bahiapet.com.br/Imprensa/Artigobahiapet.doc)> Acesso em: 25 mar. 2004 10:21.

**Official Methods Of Analysis.** 17<sup>th</sup> edition. Aerobic plate count in foods, v. 1, n° 990.12, p.11, 2002. chapter 17

BARBOSA, et al. Nova ferramenta para o monitoramento da qualidade da água. **Ciência Hoje**, v. 19, n.110, p.16-17, 1995.

BRANCO, S.M. **Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária.** 3 ed. São Paulo: CETESB, 1986. p.266-267; 127

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 518 / GM em 25 de março de 2004.** Regulamento que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. disponível em: <  
//dtr2001.saúde.gov.Br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>. Acesso em 27 abr. 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução 54 de 15 de junho de 2000.** Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de água mineral natural e água natural. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n.117, seção 1, p.37-38, 19 de jun; 2000.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução 275 de 21 de outubro de 2002.** Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. disponível em: [www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/275\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/275_02rdc.htm) acesso em: 13 out 2003 12:54.

**BRASIL PACK água mineral datamark.** p 102-103, 2002. Disponível em: <<http://www.datamark.com.br/Apresentacao/DatamarkSamplePage/BPAguaMineral.PDF>>. Acesso em: 22 mar. 2004 10:39.

BEER, DE D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.12, p.4339-4344, dec. 1994.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R. M. T. **Algas de águas continentais brasileiras.** São Paulo: FUNBEC. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências, 1970. p.13-15; p.27-152

BISCHOFBERGER, T. et al. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. **International Journal Clinical Pharmacology Research**, v. 19, n.2, p.53-56, 1999.

BOE-HANSEN, R. et al. Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. **Water research**, n.36, p.4477-4486, 2002.

BORTOLOTTI, M. et al. Effect of mineral water on gastric emptying of patients with idiopathic dyspepsia. **International Journal Clinical Pharmacology Research**, v.19, n.2, p.53-56, 1999.

CARAVELLI, et al. Modeling of chlorine effect on floc forming and filamentous microorganisms of activated sludges. **Water research**, n.37, p.2097-2105, 2003.

CARVALHO, P. V. V. D. B. C.; SILVESTRE, N., MOURA, E.B. A ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no gênero *cylindrospermopsis* em mananciais de abastecimento público do Estado de Pernambuco/ Brasil – abordagem preliminar. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (**ABES**), v.033, p.3775-3783, 1999.

CAMPO, N. C.; QUIROZ, C. C. **Contaminación en enfriadores y contenedores de água**. Disponível em: <<http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/Basico.pdf>>. Acesso em: 20.mar.2004. 12:10.

CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms**. Wiley intercience publication, 1989. 796p

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequence, monitoring and management**. World health organization. 1999, 416p.

CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food technology**, Fev., p.123-126, 1994.

COOD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering**, n.16, p.51-60, 2000.

DE FILIPPO, R. Impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos. Revista Agropecuária e ambiente. **Informe agropecuário**, Belo horizonte, v.21, n. 202, p.45-53, jan.-fev., 2000.

DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. Indiancouncil of agricultural Research, New Delhi, 1959. 85 e 177p.

DI BERNARDO, L. **Algas e suas influências na qualidade das águas nas tecnologias de tratamento**. Rio de Janeiro: **ABES**, 1995, p.43-65



DUPY, P. et al. Low-salt water reduces intestinal permeability in atopic patients. **Dermatology**, v. 198, n. 2, p.153-155, 1999.

EIROA, M.N.U.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F. de A. Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.16, n.2, jul.-set., p.165-169, 1996.

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

EMTIAZI, F. et al. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. **Water research**, n.38, p.1197-1206, 2004.

FELIPPO, R. Impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos. **Informe agropecuário**, v.2, n.202, p.45-53, jan./fev., 2000.

FLEMING, L.E. et al. Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. **Harmful algae I**, p.157-168, 2002.

FORLIN, F.J.; FARIA, J. A. F. Considerações sobre a reciclagem de embalagens plásticas. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 12, n.1, p.1-10, 2002.

FUJIKAWA, et al. Contamination of microbial foreign bodies in bottle mineral water in Tokyo, Japan. **Journal of applied Microbiology**, n.82, p.287-291, 1997.

GARDNER, J.W. et al. An electronic nose system for monitoring the quality of potable water. **Sensore and actuators B**, v.69, p.336-341, 2000.

GONZALEZ,C.; GUTIERREZ, C.; GRANDE, T. Bacterial flora in bottle uncarbonated mineral drinking water. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.1120-1125, 1987.

GORINI, A. P. F. Mercado de água (envasada) no Brasil e no mundo. **BNDES setorial**, Rio de Janeiro, n.11, p.123-152, mar., 2000. Disponível em: <[www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1107.pdf](http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1107.pdf)> Acesso em: 20 abr 2004 11:55

GRANT, M.A. Analysis of bottle water for *Escherichia coli* and total coliforms. **Journal of food protection**, v. 61, n.3, p.334-338, 1998.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International of food microbiology**, n.37, p.145-153, 1997.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing (review). **Food Control**, v.6, n.1, p.9-18, 1995.

HUMBERG, M.E. **Cuidando do Planeta Terra: uma estratégia para o futuro da vida**. São Paulo: CL-A cultural, 1992. 149p.

JOLY, A. B. **Gênero de algas de água doce da cidade de São Paulo e arredores**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1963. 186p

JONES et al. **The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles**. **Journal of applied microbiology**, v. 86, p.917-927, 1999.

KILLESTIJN, K. PET is it. **Food packaging technology international**, 1989/1990. p.59-64

LAWTON, L.A., CORNISH, B.J.P.A., MACDONALD, A.W.R. Removal of cyanobacterial toxins (microcystins) and cyanobacterial cells from drinking water using domestic water filters. **Water Research**, v. 32, n.3, p.633-638, 1998.

LOMBARDI, F. NETO. Uso dos recursos naturais: solo e água. **Boletim Técnico informativo do Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 46, p.1-3, jan./dez., 1994.

LOMANDER, A. et al.. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresource Technology**, Jan., *article in press*. p.1-9, 2004.

LOPEZ, C.C.B.C. **Variação temporal e espacial da biomassa, composição de espécies e produtividade das algas perifíticas relacionadas com as condições ambientais de riachos da bacia hidrográfica do Ribeirão do Lobo – Itirapina – SP**. São Paulo/SP: USP, 1991, 334f. Originalmente apresentada como Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 1991.

LOZOVEI, A. L.; HOHMANN, E. Principais gêneros de microalgas em biótopos de larvas de mosquitos de Curitiba, Estado do Paraná – Brasil. III. Levantamento e constatação da ecologia. **ACTA Biológica Paranaense**, Curitiba, v.6, p.123-152, 1977.

LUZ, D.S. Brasil 500 anos, a história e a crise de água no terceiro milênio. **Rev. Ceuma perspectiva**, v.4, n.4, p.123-129, 2000.

MACEDO, J.A.B. **Água & águas**. Minas Gerais: ortofarma, 2000. 505p.

MACHADO, I.C.; LOPEZ, A.V.; PORTO, K.C. Algas perifíticas (epifíticas) dos açudes do Vale do Prata In: VASCONCELOS et al. **Reserva ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um remanescente de Mata Atlântica em área urbana**. Recife: Secretaria de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente (SECTMA) Ed. Universitária, UFPE, 1998. p.65-83

MARTINS, C.E. A gestão da água em São Paulo – O feito e o a fazer. In: **Congresso Estadual de Comitês de Bacias Hidrográficas, 1**, 2001, São Paulo. Anais....São Paulo: Fundap, 2001. 28p

MENDES, B. A.; ANJOS, C.A.R. **Embalagens Plásticas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 1980. 26p

MOLICA, R. **IV Encontro do grupo de trabalho regional sobre florações de algas nocivas na América do Sul – (IOC- FANSA)**. Disponível em: <[http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/IV\\_FANSA.pdf](http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/IV_FANSA.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2004 15:10.

MORAIS, P. M. M.V.V. **Estudo da microbiologia de água mineral na emergência e na água engarrafada: ecologia microbiana em águas oligotróficas**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 1992. 214f. Originalmente apresentada como Tese de doutorado em microbiologia, Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade de Coimbra, 1991.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy againsty attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of food protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

NECCHI, JR.O.; SANT'ANNA, C.L. Taxonomic study of some chlamydomonadales (cyanophyceae) from the state of São Paulo, South Eastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 9, p.201-206, 1986.

NISHIHARA, L.; ALABURDA, J.; MAIO, F.D. Características físico-químicas das águas de fontes minerais da Região da grande São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.57, n.2, p.19-25, 1998.

PALHARES, W. A indústria de embalagem de vidro no Brasil. **Engenharia de alimentos**, ano 4, n.18, p.36-38, 1998.

PALMER, C.M. **Algas em abascimientos de água**. Manual ilustrado acerca de la identificación, importancia y control de las algas en los abastecimientos de água. México: editorial interamericana S.A, 1 ed, 1962. 91p

PETRUS, R.R. et al.. Sanificação química de garrafas plásticas. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p.80-90, 2001.

PIGGOTT, J.R. **Statistical procedures in food research**. London: Elsevier Applied Science, 1986, 415p.

PIMENTEL, R. Reserva de água no planeta. **Bahia análise & dados**, v. 9, n.3, p.133-137, dez. 1999.

PIRES, E.F. **Microbiota autóctone de uma água subterrânea**. 2002.70f. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

POPOFF, G. Águas minerais francesas: definição, características e embalagens. **Engarrafador moderno**, nov.-dez., p.37-49, 1996.

REBOUÇAS, A.C. Água na região Nordeste: desperdício e escassez. **Estudos Avançados**, v.11, n. 29, p.127-137, 1997.

RIBEIRO, F. A evolução do PET. **Technic press drinking**. Ano III, n. 08, p.10-12, jun., 1995.

RICHTER; C. A.; AZEVEDO NETTO, J.M. **Tratamento de água. Tecnologia atualizada**. São Paulo: Edgard Blücher , 1998. 331p

RICKARD, A.H. et al. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planctonic communities. **FEMS Microbiology Letters**, n. 220, p.133-140, 2003.

ROSITANO, J. et al. Ozonation of nom and algal toxins in four tread waters. **Pergamon**, v. 35, n.1, p.23-32, 2001.

ROUND, F. E. **Biologia das algas**. São Paulo: Guanabara dois, 1983. Cap.4 ,13

RZAMA et al. Volatile compounds of green microalgae grown on reused waster water. **Phytochemistry**, v. 38, n.6, p.1375-1379, 1995.

SCALABRINO, A.; BUZZELLI, G.; RAGGI, V.C. Clinical epidemiological study of the efficacy of thermal therapy in gastroenterologic diseases. **Clinical Therapy**, v.149, n.2, p.127-130, 2001.

SANDGREN, C.D. **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton**. Cambridge university, 1988. 441p

SMITH, G.M. **Fresh-water algae of the United States**, 2 ed. Macgraw-hillbook company INC, 1950. p.567-571

SMITH, G.M. **Botânica Criptogâmica (algas e fungos)**. v.1, 4ed., Fundação Calouste Guebenkian, 1955. p.276

SMITH,F.; PROENÇA, L.A. **Ocorrência de dinoflagelados do gênero *Dinophysis* (ENRENBORG, 1839) na enseada de cabeçadas (VERÃO E OUTONO DE 1999)**. Normas Técnicas Facimar, v.4, p.49-59, 2000. Disponível em: <<http://Watson.fasesp.Br/Temático/biol/botany.htm>> Acesso em: 12 jun. 2004.

SOUZA, S.A.D. **Águas minerais no Brasil. Água latino América**, set./out., p.42-43, 2002. Disponível em: <[www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/9-10-02mineras.pdf](http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/9-10-02mineras.pdf)>. Acesso em: 07 mar. 2004 7:15

SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER,E. Influence of the adhernt population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiology**, n.16, p.503-515, 1999.

STATSOFT, Inc. **statistica for Windows** (compures program manual), Tulsa, ok: Statsoft, Inc, 2300 East 14. Street, 2002

TEICH, D.H. **Vai valer mais que petróleo.** Consumo excessivo, poluição e crescimento da população mundial ameaçam esgotar as reservas de água doce do planeta. Disponível em: Veja on-line

<[www2.uol.com.br/veja/180902/p\\_074.html](http://www2.uol.com.br/veja/180902/p_074.html)>. Acesso em: 18 set. 2002 13:44

TIFFANY, L.H. **Algae – the grass of many waters.** Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 2 ed., 1958. chapter I-XII.

TOMPKINS et. al. **Culture collection of algae and protozoa catalogue of strains.** Natural Environment Research Council, 1995. 203p

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez.** São Paulo: RiMa, IIE, 2003, cap. 2 e 5

URMENETA, J.; NAVARRETE, A.; SANCHO, J. Isolation and identification of autochthonous microbiota from a granitic aquifer and variation after the bottling process. **Current Microbiology**, v. 41, p.379-383, 2000.

VIDELA, H.A.; CHARACKLIS, W.G. Biofouling and microbially influence corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 29, p.195-212, 1992.

WARTCHOW, D.; FACCIN, M. Potabilização da água: um desafio. **ECOS, revista quadrimestral de saneamento ambiental**, n.9, p.22-27, jan. 1997.

WEBER, P.S. Água, ouro do século XXI. **SANARE: revista técnica do SANEPAR**, v.10, n.10, p.5-7, jul./dez. 1998.

WHITELEY, M.; BROWN, E.; MCLEAN, R.J.C. An inexpensive chemostat for the study of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v.30, p.125-132, 1997.

WHITHIRE, S.J. **Água, eletrólitos e eq. Ac-base** In: MAHAN, L. K. Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia. 9 ed. São Paulo: Roca, 1998. p.167-177

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, v 48, n.7, p.107-114, jul. 1994.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p.125-148, fev. 1994.

