

Qualidade da água grau reagente para aplicação em laboratórios de ensaios microbiológicos

Luciana Juncioni de ARAUZ¹, Márcia Liane BUZZO¹,
Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Ellen
Gameiro HILINSKI³

¹Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

²Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

³Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Recebido: 24.10.2024 Aceito para publicação: 14.11.2024

A água proveniente da rede pública de abastecimento é considerada inadequada para a aplicação em ensaios laboratoriais nas áreas química e microbiológica, por apresentar em sua composição impurezas como íons inorgânicos, moléculas orgânicas, materiais particulados, micro-organismos e gases, que podem interferir no resultado final da análise e afetar as reações bioquímicas^{1,2}.

De modo geral, para a obtenção de água com qualidade adequada para a utilização no preparo de soluções, meios de cultura, diluição de culturas microbiológicas de áreas afins, bem como a descontaminação de materiais de laboratório para a execução de análises, torna-se primordial o emprego de equipamentos de produção de água com qualidade adequada para a aplicação nestes tipos de ensaios¹⁻³.

Tais equipamentos produzem águas do tipo grau reagente que são empregadas em laboratórios analíticos e são classificadas de I a IV, em função de requisitos de qualidade como condutância específica, resistividade, teor de silicato, contagem de bactérias e pH. Recomenda-se sua utilização imediatamente após sua produção, a fim de evitar a contaminação por gases do ambiente, bem como o crescimento microbiano².

Desta forma, o monitoramento de substâncias químicas inorgânicas e de micro-organismos em água grau reagente, obtida por

meio de tecnologias de destilação e de ultrapurificação torna-se primordial, uma vez que possíveis contaminações e impurezas podem ser detectadas e acarretar em erros analíticos¹.

Em concentrações elevadas, os compostos inorgânicos podem ser tóxicos para os micro-organismos presentes na água e afetar sua sobrevivência⁴. Por outro lado, pequenas quantidades de elementos traços como cromo, cobre, níquel e zinco (usualmente presentes na forma de íons metálicos), podem ter efeito oposto e fornecer nutrientes ao meio, atuando como cofatores em reações enzimáticas, levando ao crescimento excessivo de bactérias e outros organismos^{1,4}. De modo geral, ocorrem como impurezas e poderão afetar a qualidade da água empregada na preparação de meios de cultura, que devem ser livres de substâncias bactericidas⁵.

As bactérias constituem o principal grupo dos contaminantes microbiológicos e caracterizam um grande desafio ao atendimento dos padrões de qualidade da água por integrarem a própria microbiota da fonte de água. Quando os procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos de purificação são inadequados, podem contribuir para a formação de biofilmes, com liberação contínua de micro-organismos no ambiente aquático, sendo um desafio adicional⁶.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade

química e microbiológica de amostras de água grau reagente obtidas de sistemas de destilação e de ultrapurificação, utilizadas na rotina analítica de cinco laboratórios que efetuam análises microbiológicas, denominados de A a E, do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2013 a 2023, seguindo cronograma estabelecido pelos laboratórios requerentes.

Para três destes laboratórios foram avaliados os níveis de elementos inorgânicos (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn) em atendimento aos parâmetros estabelecidos pelo guia de padronização de métodos *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹; enquanto que para os demais laboratórios, o nível de bactérias heterotróficas foi verificado de acordo com a Farmacopeia Brasileira⁶.

No período considerado, foram avaliadas 216 amostras de água reagente, sendo 19 para a determinação dos elementos inorgânicos (laboratórios A a C) e 197 para a enumeração de bactérias heterotróficas (laboratórios D e E).

As amostras para análise, provenientes de sistemas de destilação ou ultrapurificação, foram coletadas e acondicionadas em frascos de polietileno de alta densidade com capacidade de 250 mL (Nalgene[®]), específicos para cada tipo de análise, fornecidos previamente aos requerentes. Os frascos destinados à coleta de amostra para análise de elementos químicos continham solução de ácido nítrico (HNO₃, 65%, Suprapur[®], Merck), para concentração final a 0,2% (v/v), como conservante. Aqueles destinados à coleta de amostra para avaliação microbiológica cumpriram com o requisito de esterilidade⁷.

Para a quantificação dos analitos Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn foi utilizado um Espectrômetro de Massas por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, ELAN DRC-II, Perkin Elmer). As soluções padrão monoelementares dos metais foram preparadas em solução de HNO₃ 0,2% em água desionizada, com resistividade 18,2 MΩ.cm (Millipore, Merck). As faixas de concentração para o preparo da curva analítica foram: 0,0005-0,025 mg/L para Cd, 0,02-1 mg/L para Cu e 0,001-0,05 mg/L para Cr, Ni, Pb e Zn. Os limites de quantificação, calculados como 10 vezes o desvio padrão dos resultados de seis preparações independentes dos analitos, com concentração correspondente ao primeiro ponto

da curva analítica, foram: 0,002 mg/L para Cu, 0,0005 mg/L para Cd e 0,001 mg/L para Cr, Ni, Pb e Zn. Para verificar a exatidão do método, Materiais de Referência Certificados NIST SRM 1643f *Trace elements in water* e NIST SRM 1640a *Trace elements in natural water* foram utilizados no controle interno da qualidade em cada lote de análise.

A avaliação microbiológica foi efetuada através do ensaio de contagem de bactérias heterotróficas, conforme preconizado em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. As amostras de água foram plaqueadas em duplicata, pela técnica de semeadura em profundidade, empregando Ágar R2A e incubação em estufa bacteriológica a 24 ± 4 °C por cinco a sete dias¹.

A validade dos resultados considerou as condições de esterilidade e promoção de crescimento dos micro-organismos no meio de cultura empregado nas avaliações microbiológicas das amostras, bem como o desempenho do respectivo equipamento de incubação.

Os parâmetros empregados na avaliação dos íons metálicos seguiram valor disposto pelo *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater (Table 9020II. Quality reagent water used in microbiology testing)*, que estabelece o limite máximo aceitável (LMA) < 0,05 mg/L¹. Para os ensaios microbiológicos, os resultados foram avaliados considerando o disposto no Capítulo 8.5 Água para uso farmacêutico, da Farmacopeia Brasileira, que preconiza no máximo 100 UFC/mL para a contagem do número total de bactérias heterotróficas⁶.

Conforme indicado na Figura abaixo, os resultados referentes à avaliação das concentrações dos elementos inorgânicos para os Laboratórios A a C (n = 19), demonstraram que as substâncias químicas Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn apresentaram valores inferiores ao LMA, independente do tipo de equipamento utilizado para a obtenção da água. Já com relação à avaliação microbiológica, observou-se que o Laboratório D (n = 116 amostras) obteve 100% de resultados em concordância com a especificação adotada (menor ou igual a 100 UFC/mL)⁶, independentemente do tipo de tratamento que a água tenha recebido, seja

através de equipamentos de destilação ($n = 4$) ou empregando sistemas de ultrapurificação ($n = 112$). Para o Laboratório E ($n = 81$), cujas águas foram todas obtidas a partir de sistemas de ultrapurificação, foi evidenciado um nível de 95% ($n = 77$) de resultados em conformidade.

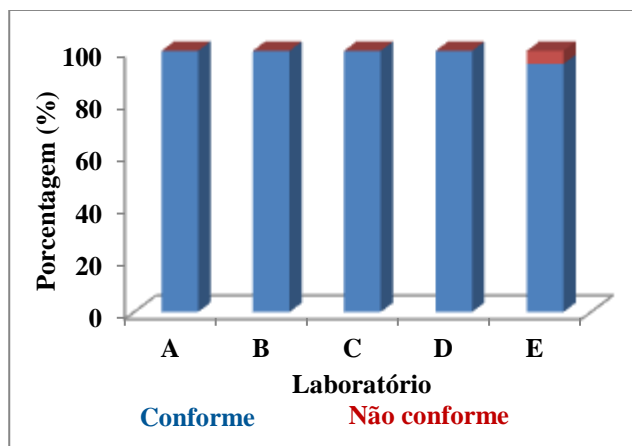


Figura. Porcentagem de resultados conformes e não conformes da água grau reagente para os ensaios químicos (laboratórios A a C) e microbiológicos (laboratórios D e E), realizados no período entre 2013 e 2023

Nos casos em que são detectados valores acima do LMA ou quando níveis superiores de contagem de bactérias heterotróficas são evidenciados na água grau reagente produzida, o laboratório deve efetuar medidas corretivas para sanar os problemas detectados, como execução de limpeza do equipamento e sanitização. Ainda, a realização de manutenção preventiva do equipamento deve ser implementada seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. De modo geral, as orientações contidas em manuais de fabricantes de equipamentos de obtenção de água reagente dizem respeito à sanitização e limpeza das membranas de osmose reversa utilizando, por exemplo, pastilhas de cloro.

A redução do período entre as sanitizações também pode minimizar a ocorrência de contaminações futuras. Foi constatado que, relacionado ao laboratório E, os resultados em desacordo com a especificação adotada⁶ ocorreram, pontualmente, somente nos anos de 2013 e 2016. As avaliações subsequentes demonstraram que as ações preventivas ou de correção empregadas nos equipamentos de produção de água foram eficazes no tratamento da causa raiz da

contaminação, resultando na produção de água em conformidade com o padrão de qualidade necessário para a condução das atividades analíticas do laboratório.

Os resultados alcançados indicaram que os sistemas de destilação e de ultrapurificação de água, utilizados nos cinco laboratórios do Instituto Adolfo Lutz e que efetuam análises microbiológicas, são capazes de produzir água com excelente padrão de qualidade químico e microbiológico. Assim, as amostras foram consideradas adequadas ao uso pretendido para a produção de meios de cultura para fins de diagnósticos clínicos, bem como para a realização de ensaios de controle de qualidade de produtos, em atendimento às demandas de Vigilância Sanitária e Epidemiológica.

Embora resultados em conformidade com os compêndios utilizados^{1,6} tenham sido atingidos, ressalta-se a importância da continuidade da execução do monitoramento periódico, a fim de verificar a ocorrência de contaminação, seja por íons inorgânicos ou por micro-organismos. Assim, é possível fornecer subsídios para a implementação de ações preventivas e/ou corretivas pelos laboratórios quando necessário, visando à melhoria contínua do processo analítico.

Referências

1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation - APHA. Baird RB, Eaton AD, Rice EW. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Part 9000 Microbiological examination. 23rd Edition. Washington, DC, 2017.
2. Krug FJ, Rocha FRP. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2^a edição. Editora *EditSBQ*. 2019. 590 p.
3. Brandelero E, Tessari FD. Controle da qualidade laboratorial: implementação de valores de referência próprios determinados no controle interno. *RBAC*. 2022;54(1):87-93. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202202163>
4. Mendes ME, Fagundes CC, Porto CC, Bento LC, Costa TGR, Santos RA, et al. A

importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(3):217-23.

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000300004>

5. Varesche MB. Metabolismo e fatores que interferem no crescimento microbiano (e-disciplinas). Universidade de São Paulo. 12p. [Acesso 2024 Jul 18]. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5328292/mod_resource/content/1/Metabolismo%20Microbiano.pdf#:~:text=Quatro%20condi%C3%A7%C3%B5es%20f%C3%ADsicas%20principais%20influenciam,e%20de%20condi%C3%A7%C3%B5es%20f%C3%ADsicas%20adequadas

C3%B5es%20f%C3%ADsicas%20adequadas

6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. 2019. 6ª ed. Vol. 1. [Acesso 2024 Ago 15]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>

7. Instituto Adolfo Lutz. Manual para orientação. Análise de água no Instituto Adolfo Lutz. Segunda Revisão. Março 2016. p.29. [Acesso 2024 Set 05]. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_4_25/manual_de_colheita_de_agua.pdf?attach=true