



Utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura na detecção de matérias estranhas em águas envasadas

Scanning Electron Microscopy as a tool to detect and quantify microscopic physical hazards in bottled mineral waters

Celli Rodrigues Muniz¹ , Jaqueline Rabelo de Lima² , Adroaldo Guimarães Rossetti¹ 

¹ Laboratório de Bioimagem, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, CE, Brasil.

² Faculdade de Educação e Ciências Integradas de Crateús, Universidade Estadual do Ceará, Crateús, CE, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: celli.muniz@embrapa.br

Recebido/Received: 03.04.2024

Aceito/Accepted: 11.06.2024

Publicação/Publication: 23.08.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

Este trabalho objetiva averiguar a presença de matérias estranhas presentes em águas minerais envasadas e sugerir a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como técnica adequada para detecção e contagem. Oito amostras de água mineral foram obtidas e subamostras de 100 mL foram filtradas em membranas, que foram secas e recobertas com platina e observadas em MEV. Áreas de 21.025 μm^2 foram focalizadas e as partículas contadas. Realizaram-se análise de variância e o teste de Regwq para a comparação das médias das contagens. Diferentes partículas visualizadas foram registradas sob distintas magnificações. A análise de variância revelou alta significância entre a quantidade de matérias estranhas das amostras, indicando que as amostras diferiram bastante quanto a essa característica. As médias obtidas obedeceram a uma estratificação, mas foram estimadas com grande precisão, sugerindo-se que a subdivisão em 10 grupos de contagem e a extrapolação para o volume de 100 mL é uma estimativa confiável para a contagem de partículas filtradas nesse volume de água. Foi mostrado que o MEV se apresentou como instrumento auxiliar adequado para a contagem de matérias estranhas em amostras de águas minerais envasadas, especialmente quando suas dimensões não permitem sua identificação convencionalmente.

Palavras-chave. Matérias Estranhas, Microscopia, Bebidas, Águas Minerais.

ABSTRACT

This work aims to investigate the presence of microscopic foreign materials in bottled mineral waters and suggest the use of Scanning Electron Microscopy (SEM) as a suitable technique for counting foreign matter. Eight samples of mineral water were obtained, and 100 mL subsamples were filtered through membranes, which were then dried, coated with platinum, and observed under SEM. Areas of 21,025 μm^2 were analysed, and the particles present were counted. Variance analysis was carried out, and the Regwq test was applied to compare the counting averages. Samples of the dirt particles were imaged at different magnifications. The analysis of variance revealed high significance among the samples, indicating substantial differences between them. The averages followed a stratification pattern and were estimated with great precision, suggesting that the subdivision into 10 count groups and the extrapolation to 100 mL volume is a reliable estimate for the count of particles filtered in this volume of water. It was shown that SEM was a suitable instrument for counting and observing foreign matter and dirt in samples of bottled natural mineral waters, especially when their dimensions are too small to be detected by conventional methods.

Keywords. Foreign Particles, Microscopy, Beverages, Mineral Waters.

INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução RDC nº 717/2022¹, estabelece que as águas envasadas compreendem as definições para a água mineral natural, a água natural, a água adicionada de sais e a água do mar dessalinizada potável. Desse grupo, a água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, sendo caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes.

Assim, as etapas de fabricação da água mineral natural não devem produzir, desenvolver e/ou agregar substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor e ou alterem a sua composição original, devendo ser obedecida a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação, devendo atender também aos Regulamentos Técnicos específicos de Características Macroscópicas e Microscópicas. De acordo com o Art. 3º, as águas envasadas não podem ser adicionadas de ingredientes, excetuando-se o dióxido de carbono e sais de grau alimentício, no caso da água adicionada de sais e da água do mar dessalinizada¹.

O mercado brasileiro de águas envasadas tem seguido em franca expansão, sendo o sétimo maior produtor do planeta, com crescimentos incrementais anualmente. Em 2021, em um levantamento feito pela Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), o volume de produção do mercado brasileiro de águas minerais foi de aproximadamente 13 bilhões de litros, uma variação de 4,7% em relação ao ano anterior. Já o consumo per capita do mercado brasileiro foi de 62 litros². Com um apelo cada vez mais forte relacionado a um estilo de vida saudável, o consumo desse produto tem crescido bastante, trazendo aliada consigo a ideia de que é um produto inócuo e livre de impurezas³.

Inúmeros trabalhos têm traçado o perfil microbiológico de águas minerais naturais e envasadas⁴⁻⁶, onde esses perfis muitas vezes estão fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor, pela presença de coliformes totais, termotolerantes e até *Escherichia coli*. Apesar da regulamentação específica para a presença de matérias estranhas microscópicas em águas envasadas¹, é praticamente inexistente qualquer estudo relacionando à qualidade microscópica de águas minerais naturais envasadas.

As Resoluções da ANVISA, RDC nº 623/2022⁷ e RDC nº 717/2022¹, estabelecem disposições gerais relacionadas à presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas, indicativas de riscos à saúde humana ou de falhas na aplicação das Boas Práticas na cadeia produtiva de alimentos e bebidas, fixando limites de tolerância, aplicados, inclusive, às águas envasadas. Para esses produtos, os que apresentarem matéria estranha indicativa de falhas das Boas Práticas, serão considerados em desacordo com o regulamento, com exceção da presença de até 5 ácaros mortos e 1,5% de areia (permitidos para alimentos em geral).

Existem matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas ou indicativas de riscos à saúde humana. Algumas matérias estranhas apresentam risco à saúde e podem causar lesões ao consumidor: objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, iguais ou maiores que 7 mm (medido na maior dimensão), fragmentos de osso ou de metal, lasca de madeira e plástico rígido; objetos rígidos, com diâmetros iguais ou maiores que 2 mm (medido na maior dimensão) como pedra, metal, dentes, fragmentos de vidro de qualquer tamanho ou formato. Outras matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana, por poderem carrear agentes patogênicos, incluem: insetos, tais como baratas,

formigas, moscas, bem como barbeiros, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes; roedores, inteiros ou em partes; outros animais, tais como morcego e pombo, inteiros ou em partes; excrementos de animais, parasitos: helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento, associados a agravos à saúde humana. São consideradas matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas: areia, terra, fungos filamentosos e leveduriformes que não sejam característicos dos produtos; artrópodes considerados próprios da cultura e do armazenamento; filmes plásticos e contaminações incidentais⁷.

Este trabalho objetivou averiguar a presença de matérias estranhas microscópicas presentes nesses produtos, sugerindo a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura, como técnica complementar, descrita a seguir, às técnicas preconizadas na RDC nº 623/2022⁷, para a detecção e contagem de matérias estranhas nessas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas oito (8) amostras de água mineral engarrafadas em embalagens de 500 mL, de distintas marcas, oriundas de comércio ambulante em semáforos ou em supermercados na cidade de Fortaleza-CE, com lacres fechados e não rompidos. Assim que coletadas, foram imediatamente levadas ao laboratório e divididas em igual volume, com auxílio de proveta, em frascos Erlenmeyer esterilizados de 250 mL.

Para cada amostra, subamostras de 100 mL foram filtradas em membranas de acetato de celulose com 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore®, EUA). Após a filtração das amostras, as membranas foram secas em estufa, a 50,0 + 2,0 °C, por um período de 24 horas. As membranas foram então, acondicionadas em placas de Petri, montadas em suporte de alumínio especialmente construído para esse fim e encaminhadas para o aparelho de cobertura metálica, da marca Emitech®, modelo K550, onde receberam um banho de platina para se tornarem condutoras de eletricidade e se tornarem aptas a serem visualizadas em microscópio eletrônico. A seguir, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss® DSM 940A, da Embrapa Agroindústria Tropical, com uma voltagem de aceleração de 15 KV.

Para cada amostra, foram selecionados, aleatoriamente, dois subgrupos de 10 campos cada, medindo 145 µm de comprimento por 145 µm de largura, perfazendo uma área de 21.025 µm² ou 0,021025 mm², cada campo. Para cada um desses campos, foram contadas as partículas presentes na superfície da membrana.

A área total da membrana é de 1.734,94 mm². Considerando que 100 mL de água atravessaram homogeneamente uma área de 1.734,94 mm², então, cada porção da membrana de 0,021025 mm² filtrou um volume de 1,21 µL de água. Para cada subgrupo de 10 campos avaliados, o total de matérias estranhas refere-se a 12,1 µL de água que atravessou a membrana. Ao fim, para determinar o número de matérias estranhas em 100 mL de água, fez-se o seguinte cálculo:

$$\text{N}^\circ \text{ de matérias estranhas/100 mL (= 100.000 } \mu\text{L) } \text{água} = (M * 10) * 100.000/12,1$$

Onde M é a média do número de matérias estranhas por cada campo de 0,021025 mm².

Na análise estatística, considerou-se a amostragem estratificada, que consiste em dividir uma população em subgrupos, supondo-se que existe heterogeneidade entre as amostras e a homogeneidade dentro dos subgrupos. Realizaram-se análise de variância das amostras das águas e a aplicação do teste de Regwq⁸, a 5% de probabilidade, para a comparação das respectivas médias.

RESULTADOS

Todas as amostras apresentaram matérias estranhas, porém, em quantidades diferentes. As médias obtidas das contagens de matérias estranhas obedeceram a uma estratificação e a análise de variância revelou alta significância entre as amostras quanto à quantidade de matérias estranhas ou diferença entre os estratos, indicando que as amostras diferiram bastante entre si quanto a essa característica. A amostra 7 apresentou a maior quantidade de matérias estranhas, com 3,25 para cada campo visualizado e as outras amostras tiveram valores menores. O coeficiente de variação foi de 63% corroborando a grande variabilidade entre as amostras. Dentro dos subgrupos, porém, não houve diferença significativa nas contagens de matérias estranhas, e os valores das contagens se mantiveram constantes dentro de cada replicata por amostra, ratificando-se assim, a precisão da metodologia aqui apresentada. As médias obtidas foram estimadas com precisão, sugerindo-se que a subdivisão em 10 subgrupos de contagem e a extrapolação para o volume de 100 mL é uma estimativa confiável para a contagem de partículas filtradas nesse volume de água. A quantidade de matérias estranhas encontradas nas amostras indica que estão em desacordo com a legislação, principalmente nas amostras obtidas em semáforos (amostras 7, 4 e 3).

Algumas das matérias estranhas visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura estão ilustradas nas **Figuras 1 e 2**, que mostram distintos campos de 145 µm de comprimento por 145 µm de largura, das membranas de filtração, onde se procederam as contagens de matérias estranhas. Observa-se uma ampla variedade de tipos de partículas encontradas, com diferentes tamanhos e formatos. A **Figura 1** apresenta alguns dos campos visualizados mostrando distintas partículas: esferas perfeitas, grãos esféricos, películas, crostas, entre outras, vistos com ótima resolução e contraste, podendo ter tido origem orgânica ou inorgânica. Na **Figura 1E**, um dos fragmentos possui aspecto semelhante a plástico, pela sua transparência. Porém, todas essas partículas não fazem parte da composição original da água e não deveriam estar presentes no seu meio. Para cobrir essa área de observação, foram escolhidos aumentos em torno de 500 vezes. Esse aumento foi escolhido em virtude de: 1) contemplar a faixa de aumento requerido pelas metodologias oficiais de análise de matérias estranhas em alimentos (AOAC⁹); 2) possuir um aumento suficiente para o observador visualizar as partículas contáveis não muito pequenas e com dimensões que as enquadre como matérias estranhas ao alimento.

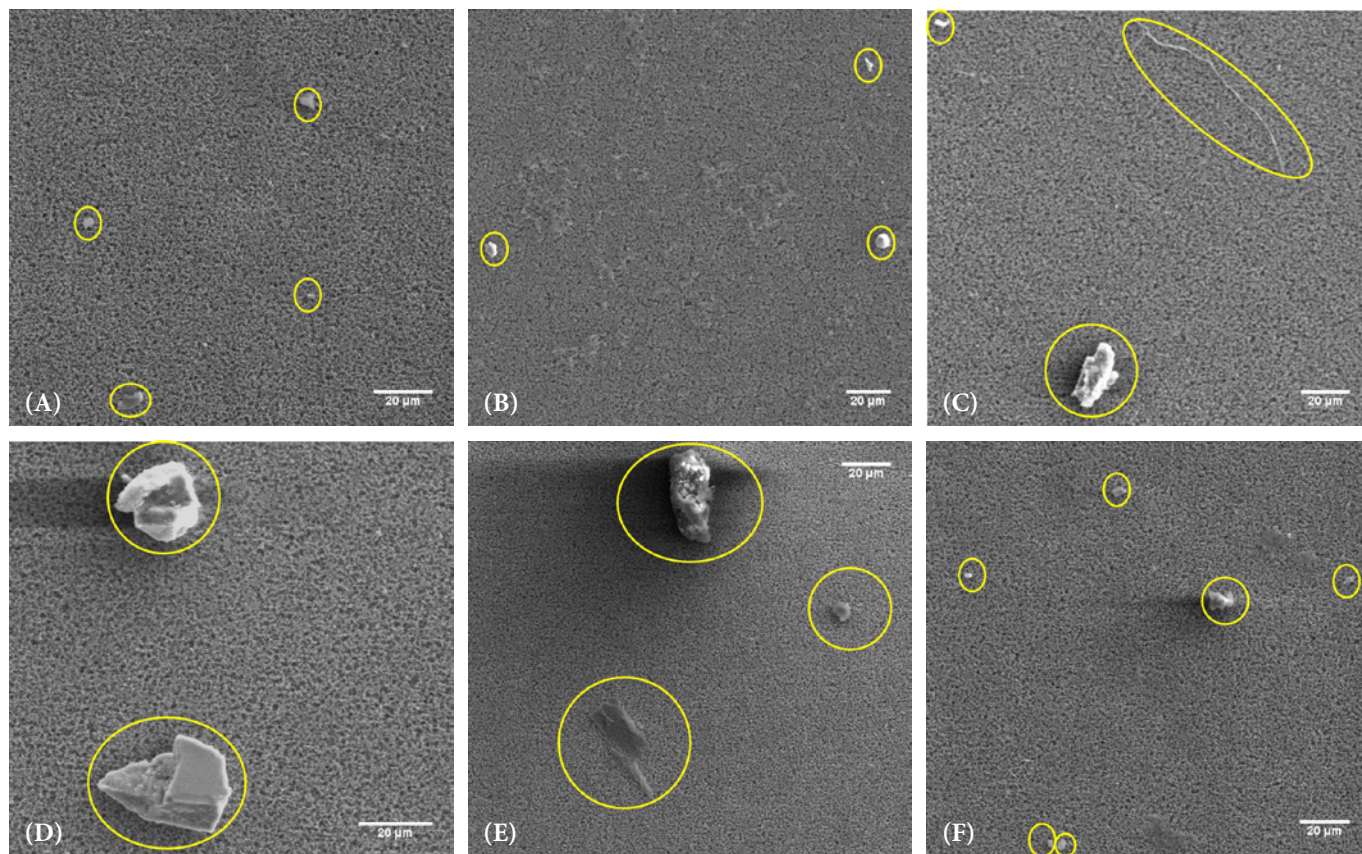


Figura 1. Imagens em MEV de alguns campos de 145 µm de comprimento x 145 µm de largura, das membranas de filtração, com detalhes das matérias estranhas retidas em diferentes tamanhos e formatos. (A – Amostra 1, B – Amostra 2, C – Amostra 3, D – Amostra 4, E – Amostra 5, F – Amostra 6) – Aumentos de 500x

Porém, para amostras tais como 3, 4 e 7, aumentos menores que 500x, como 200x (**Figura 2F**) e 300x (**Figura 2D**), foram suficientes para detecção de matérias estranhas. Na **Figura 2B**, feita em aumento de apenas 84 vezes, demonstra-se um campo de observação largo com várias matérias estranhas, de distintos tamanhos, inclusive com um fragmento não identificado bastante extenso, medindo quase 1 mm de comprimento. Em outra amostra (**Figura 2A**), com um aumento mínimo de 25 vezes, o campo de observação do MEV mostra dezenas de fragmentos, com variados tamanhos, filamentosos ou não, na superfície da membrana. Nas **Figuras 2C** e **2E**, veem-se estruturas filamentosas, com detalhe de filamento achatado, que sofreu dobramento (2C) e cilíndrico (2E). Na **Figura 2D**, visualiza-se fragmento filamentoso, com septos ao longo de sua extensão e a **Figura 2F** mostra a presença de distintas partículas. A amostra 8 apresentou fragmento bem distinto e incomum (**Figura 2G**).

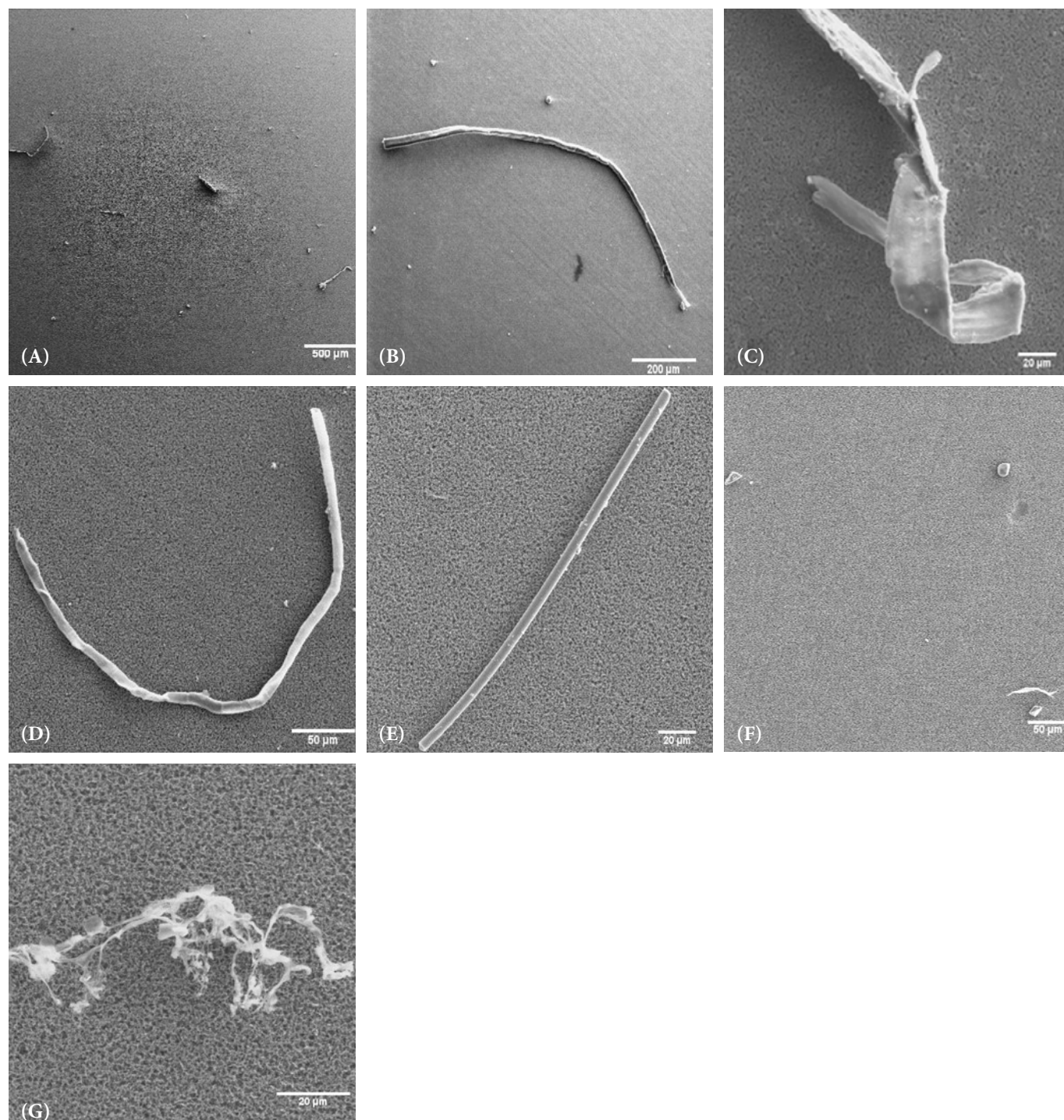


Figura 2. Matérias estranhas encontradas nas amostras de água analisadas. (A) Imagem em aumento de 25x, amostra 7. (B) Imagem em aumento de 84x, amostra 7. (C) Imagem em aumento de 500x, amostra 7. (D) Imagem em aumento de 300x, amostra 4. (E) Imagem em aumento de 500x, amostra 4. (F) Imagem em aumento de 200x, amostra 3. (G) Imagem em aumento de 900x, amostra 8

DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado a presença de contaminação microbiológica em muitas amostras de águas minerais ao longo dos anos¹⁰, relatando-se a incidência de contaminações por coliformes totais e termotolerantes, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros. No entanto, a detecção de matérias estranhas tem sido pouco relatada, como demonstrado no trabalho de Silva et al¹¹, que avaliaram a presença de matérias estranhas em água para consumo humano, onde 69% das amostras estavam em desacordo com a legislação vigente por conter resíduo vegetal, algas verdes, fungos filamentosos, matéria amorfa e protozoários de vida livre.

As matérias estranhas apresentadas na **Figura 1** possuem tamanhos e formatos distintos e indicam a ocorrência de falhas no processo de fabricação do produto. Fragmentos filamentosos, como os apresentados na **Figura 2 (A, B, C, D, E, F, G)**, indicam claramente falhas nas Boas Práticas de Fabricação do produto, podendo trazer riscos à saúde do consumidor. Especificamente na **Figura 2D**, a presença de septos ao longo da extensão do filamento, sugere fortemente uma possível origem biológica. O filamento cilíndrico mostrado na **Figura 2E** tem origem duvidosa, podendo ser orgânico ou inorgânico, e também apresenta extenso tamanho. Outra preocupação aqui colocada se refere à possível presença de microplásticos, definidos como quaisquer partículas plásticas sólidas insolúveis em água com dimensões entre 1 µm e 1.000 µm, dimensões compatíveis com as matérias estranhas aqui apontadas.

Montagner¹² relataram que os microplásticos exercem potenciais riscos aos seres humanos e podem ser vetores de transporte de outros contaminantes químicos ou biológicos. Sua ocorrência, portanto, em água envasada para consumo humano é inadmissível. De acordo com a Resolução RDC nº 717/2022¹, a tolerância para essas partículas é ausência total, não devendo conter contaminantes químicos, biológicos ou matérias estranhas que representem risco à saúde do consumidor. Assim, as matérias estranhas encontradas nesta investigação estão em desacordo com a legislação vigente.

Algumas vantagens de utilização do emprego do MEV como instrumento de contagem e observação das matérias microscópicas em águas minerais naturais envasadas podem ser listadas: 1) permite a observação de fragmentos grandes e pequenos; 2) para os fragmentos pequenos, aumentos maiores do que os permitidos pela microscopia óptica convencional como 2.500, 3.000 ou 5.000 vezes, permitem o exame minucioso da matéria estranha encontrada, provendo a chance de uma inferência sobre a origem da partícula encontrada; 3) a metalização realizada no preparo da membrana antes de ser levada ao MEV provê nítido contraste das partículas sobre o fundo 'cinza escuro' da membrana, pois aparecem mais claras e nitidamente observáveis e contáveis. No caso da observação em instrumentos comuns de óptica, algumas matérias estranhas claras e com baixa refração da luz, podem ser invisíveis ao observador, causando um 'falso' resultado; 4) o preparo da amostra é bastante rápido, devendo-se apenas filtrar a amostra em uma membrana, metalizá-la e levá-la para a visualização; e por último, 5) matérias estranhas transparentes e diáfanas, tais como microplásticos, difíceis de serem visualizadas em microscopia óptica, são facilmente detectadas em MEV. Esse método necessitaria, porém, de aprimoramento no que se refere à identificação e diagnóstico das estruturas visualizadas.

CONCLUSÃO

Foi mostrado que o microscópio eletrônico de varredura (MEV) apresentou-se como instrumento adequado para auxiliar na determinação, contagem e observação de matérias estranhas em amostras de

águas minerais naturais envasadas, estatisticamente confiável e capaz de detectar materiais opacos e também, transparentes e diáfanos. Seria um método em complementação aos métodos convencionais (filtração e leitura em microscópio estereoscópico e óptico), na identificação de matérias estranhas de difícil diagnóstico.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria Tropical pela manutenção e calibração constantes e permanentes de seu microscópio eletrônico de varredura.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores participaram da concepção, planejamento, análise e interpretação dos dados e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Não declarado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 717, de 01 de julho de 2022. Dispõe sobre os requisitos sanitários das águas envasadas e do gelo para consumo humano. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 jul 2022. Seção 1(126):190-1.
2. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante e de Bebidas não Alcoólicas – ABIR. Águas minerais. Volume de produção do mercado brasileiro de águas minerais dos anos de 2010 a 2021. [acesso 2024 Abr 02]. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/aguas-minerais/>
3. Coletti GF. Mercado de bebidas no Brasil e no mundo. 193 p. Editora Senac São Paulo, 2022.
4. Castro LRS, Carvalho JS, Vale VLC. Avaliação microbiológica de diferentes marcas de água mineral. Rev B S Pública. 2010;34(4):835-44. <https://doi.org/10.22278/2318-2660.2010.v34.n4.a76>
5. Gomes TP, Santana JS, Carvalho LR. Avaliação microbiológica de água mineral comercializada no município de Itabuna-Bahia. Electronic Journal of Pharmacy. 2015;12(4):65-72. <https://doi.org/10.5216/ref.v12i4.36762>

6. Margalho GC, Castro CSCN, Costa GS, Miranda HB, Quemel GKC. Análises físico-químicas e microbiológicas da água mineral comercializada em galões de 20 litros na Cidade de Belém-Pará. Res, Soc Dev. 2021;10(14):e186101417294.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.17294>
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 623, de 9 de março de 2022. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 mar 2022. Seção 1(51):119-21.
8. Omer SO. Use of REGWQ multiple comparisons of qualitative data. Journal of Mathematics and System Science. 2013;3:246-50. [acesso 2024 Jul 10]. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/313879992_Use_of_REGWQ_Multiple_Comparisons_of_Qualitative_Data
9. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 945.75. Extraneous materials (foreign matter) in products. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, USA. 2016.
10. Massago M, Leite RH, Conegero CI. Perfil das bactérias patogênicas nas águas minerais comercializadas no Brasil: um panorama de 2010 a 2019. Rev Bras Pesq Saúde. 2022;23(3):81-9.
<https://doi.org/10.47456/rbps.v23i3.35797>
11. Silva AM, Nogueira MD, Marciano MAM, Mattos EC, Atui MB. Ocorrência de matérias estranhas em água para consumo humano. Resumos do IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz – I Simpósio Internacional de Vigilância e Resposta Rápida. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012;71(Suplemento 1). Disponível em:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/39443>
12. Montagner CC, Dias MA, Paiva EM, Vidal C. Microplásticos: ocorrência ambiental e desafios analíticos. Quim Nova. 2021;44(10):1328-52.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170791>